



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

FISIOLOGÍA DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* ADAPTADAS A TEMPERATURA ELEVADA Y pH ÁCIDO

T E S I S

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

IBT. ARTURO IVAN MONTES DE OCA MIRANDA

Director:

DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA

CUERNAVACA, MORELOS, OCTUBRE 2019

A **Nory** por su compañía durante esta etapa tan importante en mi vida. Por caminar a mi lado y por todo su apoyo. Por ser una gran mujer, una gran madre y sobre todo un gran ser humano.

A mi hija **Sofia** que me ha enseñado tanto de mí mismo y por compartirme parte de toda su energía traducida en motivación.

La investigación reportada en esta tesis se realizó en el Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) UAEM, en el Laboratorio de Biología Sintética e Ingeniería Metabólica y en el Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Departamento de Biología Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección del Dr. Luis Caspeta Guadarrama.

Se agradece el apoyo financiero de los proyectos: Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP), donativo: DSA/103.5a/14/10703, y del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT (CB-2015-1 NÚMERO 257945) otorgado a la LGM, para realizar el presente trabajo.

Se agradece también al CONACYT por el apoyo económico otorgado a través de una beca de posgrado.

Por su participación en el comité tutorial a la Dra. María del Refugio Trejo Hernández, a la Dra. Lidia Gonzales Morales, al Dr. Otto Geiger y al Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa.

Agradecemos a Lorena Chávez, José Santillán, Simón Guzmán y Jorge Ramírez, de la unidad de Microarrays de ADN del Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas, por su apoyo técnico en la tinción e hibridación de ADNc en microarrays de ADN, y por el análisis parcial de los cambios en la expresión génica.

A la QFB. Lourdes Martínez Aguilar por su apoyo técnico durante los ensayos de TLC en el Laboratorio de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM.

A Caheri Salas Navarrete por su apoyo técnico durante los experimentos y revisión de resultados.

Resumen

El problema para la producción de bioetanol de segunda generación es la acumulación de factores estresantes para *Saccharomyces cerevisiae* (comúnmente utilizada para convertir azúcares en etanol) que afectan los rendimientos de producción, especialmente a temperaturas \geq a 40°C y concentraciones de hasta 10 g/L de ácido acético a pH < de 4. Una estrategia que se ha utilizado con éxito para la generación de cepas de levadura resistentes a condiciones estresantes es someterlas a un proceso de evolución adaptativa en laboratorio (EAL). Anteriormente se seleccionó una cepa termotolerante (TT23) de un proceso de EAL con capacidades mejoradas para crecer a 40°C. En este trabajo se estudió la fisiología de esta cepa termotolerante y encontramos que generó “trade-off” cuando se cultiva en condiciones óptimas ancestrales (30°C y pH 5), ya que disminuyó entre 10 y 15% su productividad de etanol y su tasa de crecimiento, respectivamente. Un análisis por microarreglos reveló que la causa fue por un aumento en la expresión del gen *pma1* que codifica una ATPasa de membrana. También se seleccionaron dos cepas ácido tolerantes de una experimento de EAL con la capacidad de crecer en medios de cultivo con 12 g/L de ácido acético y pH 4, una de ellas partió de la cepa silvestre S288c y se denominó silvestre ácido tolerante 22 (SAT22) y la otra de la cepa termotolerante TT23 y se le denominó termo ácido tolerante 12 (TAT12). Se estudió la fisiología de estas cepas y encontramos que no generan “trade-off” ya que la cepa SAT22 no presentó deficiencias en sus parámetros cinéticos comparados con los de su cepa parental S288c, mientras que la cepa TAT12 aumentó su rendimiento de biomasa por sustrato consumido y en su capacidad de crecimiento comparado con su cepa parental TT23. El análisis por microarreglos sugirió que estas cepas acumulan trehalosa y chaperonas moleculares, además de generar energía mediante glucólisis y producción de etanol. También se encontró que ninguna de las cepas seleccionadas por EAL tiene duplicaciones cromosomales, por lo que son genéticamente estables para utilizarse en un proceso de producción.

Abstract

A problem to produce second-generation bioethanol is the accumulation of stressors which reduce the performance of *Saccharomyces cerevisiae*, which is commonly used to convert sugars into ethanol. This affects production yields, especially at temperatures > at 40 ° C and concentrations up to 10 g / L of acetic acid at pH < 4. One strategy that has been used successfully for the generation of yeast strains resistant to stressful conditions is to undergo an adaptive evolution process in the laboratory (EAL). Previously, a thermotolerant strain (TT23) was selected from an EAL process with improved capacities to grow at 40 °C. In this work the physiology of this thermotolerant strain was studied and we found that it generated “trade-off” when cultivated in optimal ancestral conditions (30 °C and pH 5), since this decreased 10% and 15% its productivity of ethanol and rate of growth, respectively. A microarray analysis revealed that the cause was due to an increase in the expression of the *pma1* gene that encodes a membrane ATPase. Two tolerant acid strains were also selected from an EAL experiment with the ability to grow in culture media with 12 g / L acetic acid and pH 4, one that started from the wild strain S288c which was called wild tolerant acid 22 (SAT22) and another generated from the thermotolerant strain TT23, which was called thermo acid tolerant 12 (TAT12). The physiology of these strains was studied, and we found that they do not generate “trade-off” since the SAT22 strain did not show deficiencies in its kinetic parameters compared to those of its parental strain S288c, while strain TAT12 increased its biomass yield per substrate consumed and its growth compared to its parental strain TT23. Microarray analysis suggested that these strains accumulate trehalose and molecular chaperones, in addition to generate energy through glycolysis and ethanol production. It was also found that none of the strains selected by EAL have chromosomal duplications, hence they are genetically stable for use in a production process.

CONTENIDO

RESUMEN	III
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
<i>II.1. Los biocombustibles en la actualidad</i>	2
<i>II.2. Retos en los procesos de producción comercial de etanol de segunda generación</i>	3
<i>II.3. Estrés durante la fermentación</i>	6
<i>II.4. Mecanismos de respuesta de S. cerevisiae a los diferentes tipos de estrés presentes en el proceso de producción de etanol</i>	7
<i>II.5. Respuesta celular al estrés térmico</i>	10
<i>II.6. Respuesta al estrés osmótico</i>	11
<i>II.7. Respuesta a estrés oxidativo</i>	12
<i>II.8. Respuestas a compuestos inhibidores encontrados en los hidrolizados</i>	14
<i>II.9. Evolución adaptativa y generación de levaduras tolerantes al estrés</i>	15
<i>II.10. Pared celular y membrana plasmática de S. cerevisiae</i>	17
III. ANTECEDENTES	18
IV. JUSTIFICACIÓN	22
V. HIPÓTESIS	23
VI. OBJETIVO GENERAL	23
<i>VI.1. Objetivos específicos</i>	23
I. METODOLOGÍA	24
<i>VII.1. Cepas de S. cerevisiae utilizadas en los experimentos de evolución adaptativa</i>	24
<i>VII.2. Medios de cultivo</i>	24
<i>VII.3. Evolución adaptativa de laboratorio (EAL) y selección de cepas evolucionadas</i>	26
<i>VII.4. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ)</i>	27
<i>VII.5. Extracción de RNA total para el análisis transcriptómico</i>	27
<i>VII.5. Análisis de expresión génica</i>	28
<i>VII.6. Caracterización cinética de los cultivos con las cepas evolucionadas</i>	29
<i>VII.7. Extracción de lípidos de células de levadura</i>	30
<i>VII.8. Separación de lípidos de membrana por TLC</i>	30
II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
<i>VIII.1. Caracterización cinética de la cepa TT23 a 30°C</i>	31

VIII.2. Análisis transcriptómico de la cepa termo tolerante TT23 a 30 °C	33
VIII.3. Pre-adaptación de la cepa TT23 a otras condiciones estresantes.	37
VIII.3. Experimento de EAL para la obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> capaces de crecer a altas concentraciones de ácido acético y pH por debajo del pKa	39
VIII.4 Selección de cepas evolucionadas resistentes a ácido acético y pH ácido.	40
VIII.5 Caracterización cinética de las cepas SAT22 y TAT12 a 30 °C	44
VIII.6 Análisis transcriptómico de las cepas ácido-tolerantes obtenidas por evolución	47
V. Análisis de lípidos de membrana por TLC	54
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS	56
BIBLIOGRAFIA	57

LISTA DE TABLAS

Tabla III-I. Comparación de velocidades específicas de crecimiento (μ) y producción de etanol y glicerol entre las cepas termotolerantes y su parental de los trabajos Luis Caspeta <i>et al.</i> , 2016 y Luis Caspeta, <i>et al</i> , 2019.....	19
Tabla VII-I. Composición del medio mínimo Delft.....	25
Tabla VIII-I. Parámetros cinéticos de las cepas S288c y TT23 cultivadas en medio Delft a 30°C y 200 rpm.	32
Tabla VIII-II. μ de las poblaciones de las cepas S288C y TT23 al inicio y después de 100 generaciones de la EAL.....	40
Tabla VIII-III. Parámetros cinéticos de las cepas evolucionas SAT y TAT en medio Delft con 12 g/L de ácido acético, pH 4, 30°C y 200 rpm.....	44
Tabla VIII-IV. Parámetros cinéticos de las cepas S288C, TT23, SAT22 y TAT12 cultivadas en medio Delft a 30 ° C y 200 rpm sin ácido acético y a pH 5.0.....	46
Tabla VIII-V. Número de cambios transcripcionales entre las cepas S288c, TT23, SAT22 y TAT12.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura II-I. Condiciones adversas observadas en las operaciones unitarias para el proceso de producción de etanol de segunda generación.	6
Figura II-II. Actividad de la vía de RAS-cAMP a altas y bajas concentraciones de glucosa.	8
Figura II-III. Respuesta al estrés por calor en <i>S. cerevisiae</i>	11
Figura II-IV. Actividad de la vía de HOG en presencia y ausencia de estrés osmótico.	13

Figura II-V. Esquema general de la evolución adaptativa en laboratorio y selección de cepas evolucionadas.....	16
Figura III-I. Estructuras tridimensionales del ergosterol y del fecosterol.....	20
Figura III-II. Vía de síntesis de esteroides en <i>S. cerevisiae</i>	21
Figura VIII-I. Curvas de crecimiento y producción de metabolitos de fermentación de las cepas S288C y TT23.	32
Figura VIII-II. Análisis de duplicaciones cromosómicas.	35
Figura VIII-III. Principales cambios en la expresión génica de la cepa TT23 cuando se cultiva a 30°C.	36
Figura VIII-IV. Velocidades de crecimiento de las cepas S288C y TT23 en cultivadas en medio Delft a pH 3 y concentraciones de ácido acético desde 0 g/L a 4 g/L. 38	
Figura VIII-V. Velocidad específica de crecimiento de las cepas S288c y TT23 en diferentes condiciones.....	39
Figura VIII-VI. Experimento de EAL de las cepas S288C y TT 23.	42
Figura VIII-VII. Cinéticas de crecimiento de las cepas aisladas del experimento de EAL.	43
Figura VIII-VIII. Títulos máximos de biomasa etanol y glicerol a las 12 horas de las cepas SAT 22 y TAT 12 en medio Delft con 12 g/L de ácido acético a pH 4.	45
Figura VIII-IX. Cinéticas de crecimiento de las cepas S288C, TT23, SAT22 y TAT12. 46	
Figura VIII-X. Análisis de duplicaciones cromosómicas de las cepas SAT22 y TAT12.	50
Figura VIII-XI. Tabla comparativa de expresión génica I.	52
Figura VIII-XII. Tabla comparativa de expresión génica II.	53
Figura VIII-XIII. TLC de lípidos de membrana de las cepas S288C, TT23, SAT 22 y TAT 12.	55

I. INTRODUCCIÓN

La creciente preocupación por el calentamiento global, causado por la quema de combustibles fósiles, está impulsando el desarrollo de nuevas tecnologías para mejorar la producción de biocombustibles a partir de fuentes renovables como la biomasa (compuestos lignocelulósicos). A pesar de que el uso de biomasa presenta muchas ventajas para la disminución de las emisiones de CO₂ en la atmósfera, el proceso de conversión de ésta a etanol combustible presenta varios retos para las levaduras, las cuales son comúnmente utilizadas para la conversión de los azúcares a etanol. Dichas levaduras deben enfrentar: altas concentraciones de azúcares fermentables (>250 g/L), presencia de compuestos tóxicos generados en la etapa de pretratamiento y temperaturas mayores a 40°C; complicaciones que ocasionan pérdidas en el rendimiento y la productividad del proceso de producción, lo cual causa un incremento en los costos de producción.

Dado lo anterior, es importante generar levaduras que puedan operar a estas condiciones para disminuir los costos de producción de etanol de segunda generación. Una estrategia que se ha utilizado con éxito para el diseño y obtención de microorganismos resistentes a condiciones estresantes de los procesos de producción de compuestos de interés comercial es la evolución adaptativa en laboratorio (EAL). La EAL consiste en modificar gradualmente o mantener las condiciones subóptimas de crecimiento de una cepa a las condiciones deseadas y realizar subcultivos de las poblaciones de dicha cepa para que se adapten a las nuevas condiciones. De estas poblaciones evolucionadas se seleccionan las estirpes más resistentes, mismas que se caracterizan para evaluar su valía en los procesos de producción. El análisis transcriptómico de las cepas seleccionadas proporciona información valiosa para entender los cambios genéticos generados en una cepa evolucionada; entender estos cambios es necesario para la mejora de cepas mediante manipulación genética, mismas que se utilizan para mejorar un proceso de producción.

Recientemente se han generado y estudiado cepas de *S. cerevisiae* termotolerantes obtenidas por EAL con capacidad de crecer a altas temperaturas, alta osmolaridad y producir altas concentraciones de etanol. Estos estudios también han proporcionado indicios de mutaciones puntuales que le confieren a la cepa parental el 86% de la termotolerancia (Caspeta *et al.*, 2016). En este trabajo se utilizó la EAL para seleccionar

cepas resistentes a altas concentraciones de ácido acético y pH ácido partiendo de una cepa silvestre y una termotolerante obtenida, con el fin de obtener información sobre el camino metabólico y los cambios estructurales que realiza *S. cerevisiae* para resistir a estas condiciones adversas en dos diferentes puntos de partida (cepas silvestre y evolucionada en elevada temperatura). Esta estrategia nos sirvió para generar información básica sobre las respuestas al estrés y para generar estrategias racionales para el diseño de una cepa que sea capaz de mejorar los rendimientos de producción de bioetanol lignocelulósico.

II. MARCO TEÓRICO

II.1. Los biocombustibles en la actualidad

El problema creciente del calentamiento global, causado principalmente por la quema de combustibles fósiles, aunado a los aumentos de precios de los mismos, es un tema preocupante que ha motivado el desarrollo de procesos alternativos a los actualmente utilizados basados en petróleo; como son la energía solar, nuclear, geotérmica, eólica y los que derivan de la biomasa como materia prima para la producción de biocombustibles (Chu & Majumdar, 2012). Las tecnologías concernientes en biomasa consisten en convertir ésta en energía utilizable, a través de la combustión para la generación de calor o electricidad, la pirolisis, la transesterificación de aceites vegetales o la hidrólisis de lignocelulosa que libera azúcares fermentables para producir biocombustibles como el etanol, butanol y biodiesel (Caspeta *et al.*, 2013). Dado que estos últimos son la mejor opción para sustituir a los combustibles líquidos basados en petróleo (gasolina y diesel), se están buscando estrategias para aumentar su producción (Barber, 2009; Caspeta & Nielsen, 2013). Una de ellas es la producción de bioetanol de segunda generación que, comparada con la de primera generación, la cual reside en el uso de azúcares, melazas y almidones, ésta tiene como materia prima los materiales lignocelulósicos. Éstos requieren un mayor procesamiento antes de poder ser fermentados a etanol. Sin embargo, la lignocelulosa o biomasa está llamada a ser la materia prima prioritaria para la producción de etanol ya que presenta algunas ventajas: 1) es más abundante; 2) su uso compite menos con las materias primas que se requieren para producir alimentos; 3) se puede encontrar en todas partes pudiendo evitar los conflictos geopolíticos ocasionados por el uso del petróleo; 4) su generación contribuye a la disminución del CO₂ atmosférico; 5) es un importante residuo agroindustrial; como ejemplos los bagazos, los rastrojos y cascaras,

así como los desechos sólidos municipales y papeles de desecho (Caspeta *et al.*, 2013). Finalmente, la biomasa se puede regenerar en la tierra a una tasa de alrededor de 100,000 billones de toneladas por año, de los cuales aproximadamente el 6.5% puede ser utilizada para la producción de biocombustibles, equivalente a 3.2 billones de litros de etanol al año (Barber, 2009; Caspeta & Nielsen, 2013).

II.2. Retos en los procesos de producción comercial de etanol de segunda generación

El etanol de segunda generación trae consigo varios retos que se deben superar para mejorar el proceso de producción. Estos retos aparecen durante las etapas utilizadas para producir etanol lignocelulósico, las cuales se enuncian enseguida (Figura II-1):

Pretratamiento: El principal objetivo de esta etapa es facilitar el acceso de las enzimas celulasas a los polímeros de azúcares fermentables de la lignocelulosa (celulosa y hemicelulosa), con la finalidad de mejorar la hidrólisis enzimática y aumentar los rendimientos de obtención de azúcares fermentables (g de azúcar por g de biomasa) (Caspeta *et al.*, 2014). Entre todos los métodos disponibles, los más eficientes y económicos son los termoquímicos, que consisten en cocer la biomasa en presencia de agentes químicos como el ozono, álcalis, disolventes orgánicos, peróxido de hidrógeno y ácidos (HCl y H₂SO₄). Sin embargo, cuando se realizan estos tratamientos químicos se generan también subproductos como ácido acético, 5-hidroxi-metil furfural (HMF), compuestos fenólicos, aldehídos, compuestos alifáticos, ácido fórmico y levulínico, los cuales generan pH ácido en los hidrolizados (pH <4) y tienen un efecto negativo en las células. Por ejemplo el HMF, furfural y los compuestos fenólicos provocan cambios en la cromatina, daño al ADN, cambios en la expresión de algunas enzimas glucolíticas (Banerjee *et al.*, 1981), así como efectos negativos en las funciones de señalización (Keweloh *et al.*, 1990).

La toxicidad de los ácidos acético, fórmico y levulínico depende del pH del medio y de su constante de disociación ácida (pKa) la cual está entre 3.75 y 4.76. A pH por debajo de su pKa, los ácidos se encuentran en su forma no disociada la cual es liposoluble y tienen la capacidad de atravesar la membrana celular por difusión pasiva (Casal *et al.*, 1996). Una vez dentro, a causa del pH intracelular cercano a la neutralidad, los ácidos se disocian causando una disminución en el pH intracelular y una acumulación excesiva de protones. Esta acumulación debe ser bombeada fuera de la célula. El principal mecanismo de

bombeo de protones depende de la hidrólisis de ATP y es realizada por el sistema de translocación de protones de la membrana plasmática H⁺-ATPasa (Carmelo *et al.*, 1997; Holyoak *et al.*, 1996; Pampulha *et al.*, 200), lo cual causa una disminución en la velocidad de crecimiento debido a que el ATP destinado a tal proceso se desvía al mantenimiento celular; siendo esta una de las principales razones de la toxicidad de los ácidos (Pampulha & Loureiro Dias, 2000). Es importante mencionar que el ácido débil más abundante en los hidrolizados de lignocelulosa es el ácido acético, llegando a superar los 10 g/L (Tahezadeh *et al.*, 1997).

Debido a los daños celulares que causan los compuestos tóxicos, se han generado estrategias para removerlos (ver figura II-1) (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000), pero las operaciones adicionales afectan de forma negativa al balance energético e incrementan el costo de producción (Caspeta *et al.*, 2015).

Sacarificación: En esta etapa se liberan los azúcares fermentables de los polisacáridos liberados en el pretratamiento. Esto se realiza mediante hidrólisis enzimática utilizando xilanasas, endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas (Talebnia *et al.*, 2010). Las endoglucanasas y xilanasas actúan sobre regiones de baja cristalinidad de la celulosa y la transforman en cadenas de extremos libres. Las exoglucanasas actúan sobre los extremos libres, removiendo unidades de celobiosa que posteriormente son transformadas en glucosa por las β -glucosidasas. Estas enzimas generalmente tienen una actividad máxima a temperaturas mayores a 40 °C y a pH ácidos entre 3 y 5 (Vohra *et al.*, 2014). Las celulasas también presentan inhibición por altas concentraciones de sustrato y de producto final (glucosa o celobiosa), limitando la liberación de glucosa y consecuentemente afectando el rendimiento del proceso (Talebnia *et al.*, 2010).

Fermentación: En esta etapa se lleva a cabo la conversión, en etanol, de los azúcares fermentables generados en la etapa anterior. La fermentación de la glucosa se puede realizar con bacterias o levaduras. En bacterias, el piruvato puede ser convertido en etanol, ácido láctico y ácido acético; pero en *S. cerevisiae*, éste es convertido principalmente a etanol. Otra ventaja de esta levadura es que puede tolerar concentraciones altas de etanol (mayores a 120 g/L), donde pocas bacterias pueden operar (Luong, 1985). Sin embargo, concentraciones de etanol superiores a 120 g/L pueden ser necesarias para reducir los costos de operación (Caspeta *et al.*, 2014; Caspeta *et al.*, 2014; Caspeta *et al.*, 2015). Las levaduras también presentan ventaja

respecto al pH ácido resultado del pretratamiento (3 o 5), ya que sus condiciones óptimas de crecimiento oscilan entre 4 y 5, pero pueden resistir hasta 2.5. Sin embargo, *S. cerevisiae* difícilmente tolera temperaturas superiores a 37°C.

Actualmente se busca optimizar el proceso de producción de etanol evitando que las etapas de sacarificación y fermentación se realicen de manera independiente, trayendo como ventajas un mejor rendimiento en la liberación de azúcares fermentables, y por lo tanto, de producción de etanol (Vohra *et al.*, 2014). Al liberar la glucosa en el medio de cultivo y convertirla enseguida a etanol, se evita la inhibición por sustrato causada por altas concentraciones de glucosa, tanto de las enzimas como del microorganismo. Por lo tanto, también se evita que se añadan más enzimas con el fin de no disminuir el rendimiento del proceso. Por otro lado, cuando se realiza la sacarificación a 50°C, la temperatura debe ser disminuida a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, lo que genera un aporte energético extra en esta operación de enfriamiento, lo cual también eleva el costo de producción. Sin embargo, para que estas dos etapas puedan llevarse a cabo de manera simultánea se requieren de microorganismos que sean capaces de crecer a altas temperaturas, alta osmolaridad, resistentes a pH ácido (<4), compuestos tóxicos y que mantengan una productividad alta de etanol (Vohra *et al.*, 2014).

En la etapa de fermentación se usa primordialmente a la levadura *S. cerevisiae* (95% de las fermentaciones utilizan esta levadura), la cual debe ser expuesta a múltiples condiciones de estrés que se generan durante el pretratamiento de la lignocelulosa y las altas concentraciones de azúcares fermentables (>250 g/L), las cuales se deben asegurar para lograr concentraciones superiores a los 120 g/L de etanol. Estas condiciones regularmente son letales para la levadura, ocasionando que el rendimiento (g de etanol/g de biomasa) y la productividad (g de etanol/volumen de cultivo/tiempo) del proceso de producción disminuyan, y por lo tanto se incrementen los costos. Sin embargo, *S. cerevisiae* tiene estrategias metabólicas para contender con las condiciones estresantes que se presentan en su entorno, dichas estrategias metabólicas se describen a continuación.

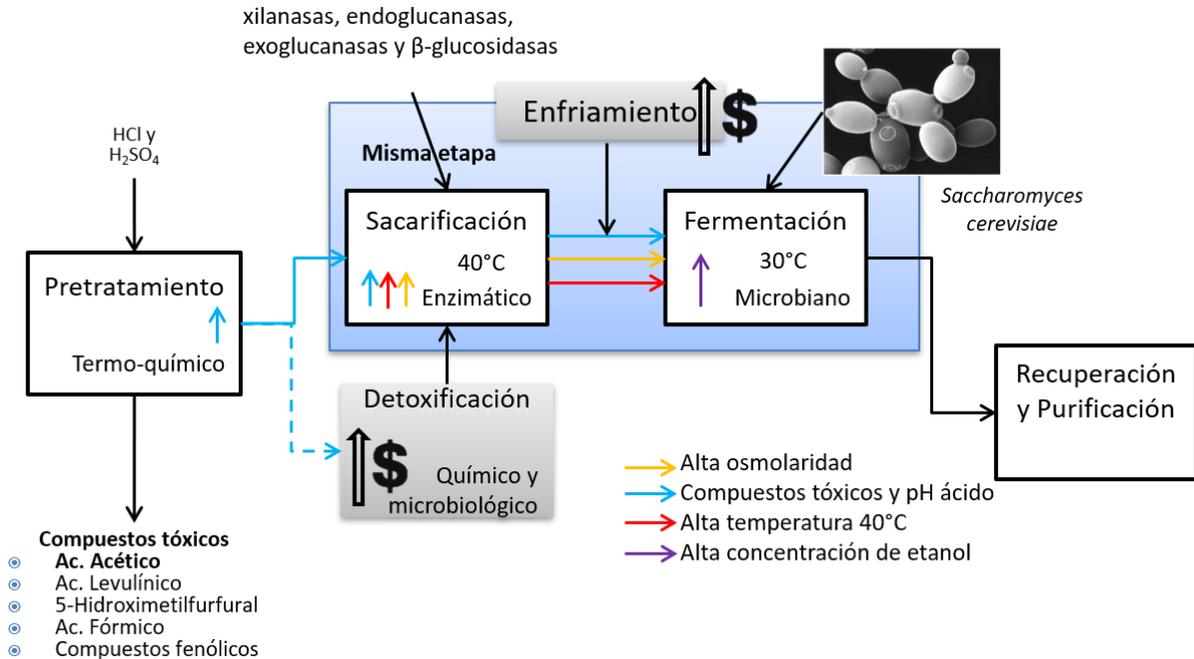


Figura II-I. Condiciones adversas observadas en las operaciones unitarias para el proceso de producción de etanol de segunda generación.

Durante este proceso se acumulan diferentes condiciones estresantes para *S. cerevisiae* reduciendo los rendimientos de producción de etanol (las flechas de colores indican el momento de aparición de dichas condiciones). Las operaciones sombreadas de negro son algunas estrategias para aumentar los rendimientos de producción, sin embargo, implican un gasto energético adicional, y por lo tanto económico ya que aumentan los costos de operación. La etapa sombreada en azul es una estrategia prometedora para disminuir los costos de operación y aumentar los rendimientos de producción de bioetanol lignocelulósico. Sin embargo, requiere de cepas de levaduras con la capacidad de crecer a las condiciones estresantes acumuladas hasta esta etapa.

II.3. Estrés durante la fermentación

En principio, *S. cerevisiae* es más susceptible al estrés en su periodo de crecimiento activo, a comparación de los periodos en fase estacionaria, donde son más resistentes a los cambios en su ambiente externo. En la fase lag de crecimiento en medio líquido con glucosa, las células de esta levadura ajustan su metabolismo para llevar a cabo división celular. En la fase exponencial alcanza su máxima velocidad de duplicación, al mismo tiempo aumenta la temperatura y se produce etanol que afecta a la membrana celular. Posteriormente, la célula entra en fase diáuxica después de agotarse la glucosa disponible y durante un breve periodo de tiempo deja de dividirse y cambia de un metabolismo fermentativo a respiratorio (ej. metaboliza el etanol). En la etapa diáuxica, las células utilizan el etanol producido en la fase logarítmica como principal fuente de carbono y utilizan el oxígeno molecular como último aceptor de electrones, provocando estrés oxidativo por la acumulación de especies reactivas de oxígeno. Gradualmente se presenta

la fase estacionaria provocada por la disminución de nutrientes en el medio. En esta última etapa, las células se enfrentan a estrés por inanición y acumulan carbohidratos de reserva, como trehalosa y glucógeno, su pared celular se hace más gruesa y resistente (Folch Mallol *et al.*, 2004).

Estas modificaciones metabólicas causadas por el entorno se asocian a repuestas moleculares conocidas como respuestas celulares al estrés ambiental. Dichas repuestas se dividen en dos: 1) una respuesta global que se activa ante muchas perturbaciones ambientales; y 2) una respuesta particular que se activa ante una perturbación específica (Caspeta & Nielsen, 2015; Folch Mallol *et al.*, 2004; Sauer, 2001).

II.4. Mecanismos de respuesta de *S. cerevisiae* a los diferentes tipos de estrés presentes en el proceso de producción de etanol

La resistencia en *S. cerevisiae* se puede presentar como una respuesta general que le permite adaptarse a diferentes tipos de estrés; es por esto que se dice que esta levadura tiene una protección cruzada (Folch Mallol *et al.*, 2004). Por ejemplo, cuando la levadura se expone a 10 o 15 °C por arriba de su temperatura óptima de crecimiento (30°C), su expresión génica cambia para adaptarse a dicha condición; pero también se vuelve resistente a elevadas concentraciones de peróxido de hidrogeno y de etanol (Kurtz *et al.*, 1986). Otro ejemplo es cuando se encuentra en un déficit de nutrientes (estrés por inanición), condición que induce un mayor número de transcritos de los genes que codifican para proteínas de choque térmico HSP (por sus siglas en inglés - Heat Shock Proteins), las cuales también se inducen por choque osmótico y choque hiperoxidante (Werner-Washburne *et al.*, 1989). Esto puede ser una consecuencia de lo que se llama domesticación de la levadura, pues estas perturbaciones se presentan en ese orden durante el proceso de producción de vino (Mitchell *et al.*, 2009).

A estas repuestas se les conoce como repuestas al estrés celular (REC), esta respuesta es global con el posible fin de disminuir el gasto energético. La REC engloba funciones celulares específicas como el control del ciclo celular, la estabilización y reparación de proteínas, ADN y cromatina, la estabilización de la membrana celular y otros aspectos metabólicos (Kültz, 2003; Kültz, 2005). Esta respuesta se ha encontrado en diferentes organismos incluidos los humanos, levaduras, eubacterias y arqueas; esto se demostró al analizar 300 proteínas altamente conservadas entre los organismos; de las cuales 44 cambian su abundancia al presentarse un estrés (Kültz, 2003). Estudios

transcriptómicos y proteómicos demostraron que las REC se presentan de forma general bajo condiciones de estrés específicas, mientras que otras son específicas a un estrés. Lo anterior se observó al analizar un conjunto de 900 genes que mostraron cambios similares al exponer a la levadura a diferentes tipos de estrés (Gasch *et al.*, 2000; Kültz, 2003; Kültz, 2005).

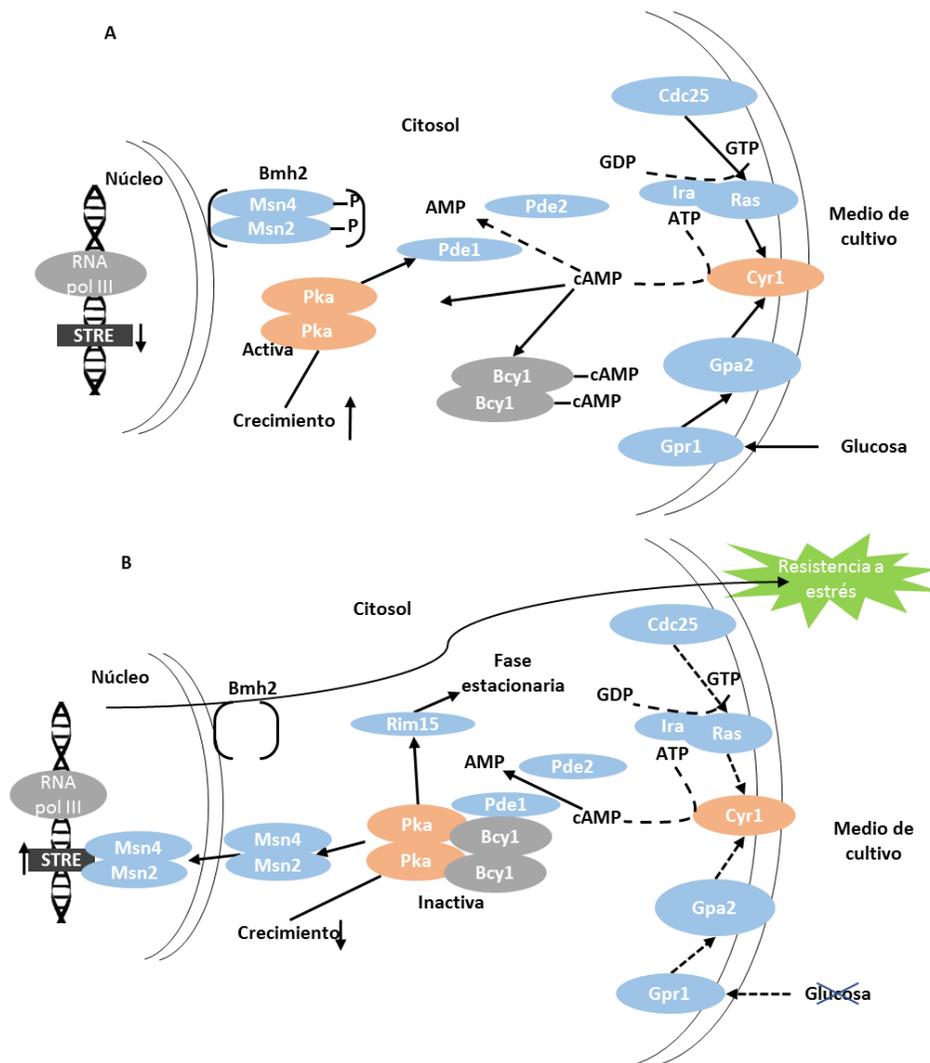


Figura II-II. Actividad de la vía de RAS-cAMP a altas y bajas concentraciones de glucosa.

La adenilato ciclasa (Cyr1) puede ser activada por el sistema Gpr1-Gpa2 cuando hay glucosa en el medio y por las proteínas Ras que a su vez están reguladas por Cdc25 mediado por GTP. La concentración de cAMP también depende de la fosfodiesterasa Pde1 (A). En presencia de glucosa se sintetiza cAMP y se une a la subunidad reguladora Bcy1 desacoplándola de los sitios catalíticos de Pka, quedando activa y así pueda fosforilar a los factores transcripcionales Msn2/4, los cuales una vez fosforilados son capturados por Bmh2 en el citoplasma. La fosfodiesterasa de baja afinidad Pde1 controla los niveles de cAMP, provocando que la célula entre a fase de crecimiento y disminuya sus mecanismos de resistencia al estrés (B). A bajas concentraciones de glucosa, las proteínas Ira controlan la actividad de Cdc25, la fosfodiesterasa Pde2 degrada el cAMP y no permite que Bcy1 se desacople del sitio activo de la Pka dejándola inactiva y a su vez provocando que la célula entre en fase estacionaria (por la activación de Rim15). Los factores Msn2/4 al no estar fosforilados no son capturados por Bmh2 y se translocan al núcleo para activar a los genes regulados por STRE y se detenga el crecimiento aunado a una mayor resistencia al estrés.

La respuesta al estrés celular se controla principalmente por los niveles intracelulares de AMP cíclico (cAMP), que a través de la proteína cinasa A (Pka) transmite señales del medio ambiente, regulando funciones importantes en la célula, entre ellas el metabolismo del glucógeno, glucosa, lípidos y la división celular (Thevelein, 1994) (Figura II-). El cAMP es sintetizado por la adenilato ciclasa a partir de ATP. Esta enzima está codificada por los genes *CYR1/CDC35* y está regulada positivamente por las proteínas Ras (codificadas por los genes *ras1* y *ras2*), pertenecientes a la familia de proteínas G monoméricas. También está regulada por el sistema Gpr1-Gpa2, que pertenecen a una familia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales actúan cuando hay glucosa en el medio. Estos activan a la proteína Gpa2 de la familia de proteínas G α heterotriméricas, que a su vez activan a la adenilato ciclasa (Colombo *et al.*, 1998). Para elevar la concentración de cAMP se necesita agregar glucosa en el medio y/o la acidificación intracelular (Thevelein *et al.*, 2000). La importancia de la vía RAS-cAMP en el crecimiento celular y la respuesta al estrés queda demostrada cuando ésta se activa constitutivamente. En esta condición, la célula es incapaz de detener su ciclo celular en la fase G1, la cual se activa por falta de nutrientes; por lo que las células muestran poca tolerancia al estrés y pierden viabilidad al entrar en fase estacionaria, ya que no acumulan trehalosa ni glucógeno (Figura II-II). Por el contrario, la inactivación de Pka, muestra un fenotipo muy tolerante al estrés; tiempos de duplicación largos causados por un retraso en la fase G1 del ciclo celular; y una acumulación de trehalosa citosólica y glucógeno en su pared celular, aun en la fase de crecimiento exponencial (Thevelein & de Winde, 1999).

Para coordinar estos sistemas complejos de respuesta al estrés, la célula utiliza blancos comunes en genes que codifican para funciones necesarias que puedan hacer frente a una perturbación (Marchler, Schüller, Adam, & Ruis, 1993a). En este contexto, trabajos anteriores han demostrado que existe una secuencia nucleotídica AGGGG en los promotores de los genes inducidos por estrés, la cual ha sido denominada secuencia de los elementos de regulación de respuesta al estrés (SERE), los cuales están presentes en alrededor de 200 genes que codifican para proteínas transportadoras, proteasas y proteínas que protegen de diferentes tipos de estrés (Marchler *et al.*, 1993b). Las SERE son reconocidas por los factores de transcripción Msn2 y Msn4, que tienen capacidad de unirse a éstas *in vivo* e *in vitro* (Martinez-Pastor *et al.*, 1996). La localización celular de estos factores está regulada por fosforilación y por la proteína Bmh2, la cual captura a los factores Msn2 y Msn4 fosforilados y los retiene en el citoplasma, por lo que la transcripción de los genes blanco, a través de las SERE disminuye. Cuando la célula está

en estrés, estos factores se transportan al núcleo para transcribir los genes de respuesta general a estrés (Beck & Hall, 1999). La fosforilación de estos factores de transcripción depende de la vía de RAS-cAMP; cuando la levadura está creciendo en condiciones óptimas se incrementa la concentración de cAMP que a su vez activa a Pka e induce la hiper-fosforilación de los factores Msn2 y Msn4 (Görner *et al.*, 1998). Por el contrario, un incremento de la temperatura óptima de crecimiento de la levadura induce la disminución en los niveles de cAMP y la inactivación de Pka, por lo que se evita la hiperfosforilación de los factores Msn2 y Msn4, provocando que Bmh2 los libere y un receptor nuclear de exportación (codificado por el gen *msn5*) los transporte al núcleo para que puedan activar a los genes que cuentan con las SERE (Garreau *et al.*, 2000).

Si la perturbación ambiental perdura por un periodo largo de tiempo, entonces ocurren modificaciones más específicas al estrés. Estas modificaciones se les conoce como respuestas particulares al estrés (RPE) (Sauer, 2001).

II.5. Respuesta celular al estrés térmico

La respuesta celular a estrés por calor en esta levadura consiste principalmente en la síntesis de las HSPs; de las cuales la mayoría de las proteínas de este grupo son proteasas y chaperonas moleculares, cuyas funciones consisten en impedir la desnaturalización o inducir la renaturalización de proteínas, degradar proteínas desplegadas o mal plegadas por calor, evitar el consumo excesivo de ATP y evitar la formación de agregados de proteínas desnaturalizadas. En *S. cerevisiae* existen diferentes familias de HSP, entre las más importantes se encuentran las Hsp40, Hsp70, Hsp90 y Hsp104 involucradas en la renaturalización y la reactivación de proteínas desplegadas por efecto del calor (Lindquist, 1992; Jakrel *et al.*, 2010).

La transcripción de genes inducidos por calor depende de dos elementos regulatorios: el SERE, y los elementos de choque térmico HSE (por siglas en inglés Heat Shock Element) (Santoro *et al.*, 1998). La estructura de este último consta de tres copias de la secuencia nGAAn (donde n puede ser cualquier nucleótido) arreglados en orientaciones alternadas. Estos elementos son reconocidos por el factor transcripcional de choque térmico Hsf1 (por sus siglas en inglés Heat Shock Factor) bajo el control de Hsf1 (Sorger, 1991); dicho factor se mantiene inactivo cuando se une a Hsp70. Con el choque térmico, se generan proteínas mal plegadas como consecuencia del aumento de temperatura, y con esto la demanda de Hsp70 causa la disociación del complejo Hsp70-Hsf1, para que Hsp70 se

utilice en el plegamiento correcto de las proteínas y Hsf1 para inducir a la expresión de las *hsp's* (Shi & Morimoto *et al.*, -1998). A su vez, el aumento de la síntesis de proteínas Hsp70 ocasiona la reasociación del complejo Hsp70-Hsf, dando lugar a una respuesta típicamente transitoria (Sorger, 1991) (figura II-3).

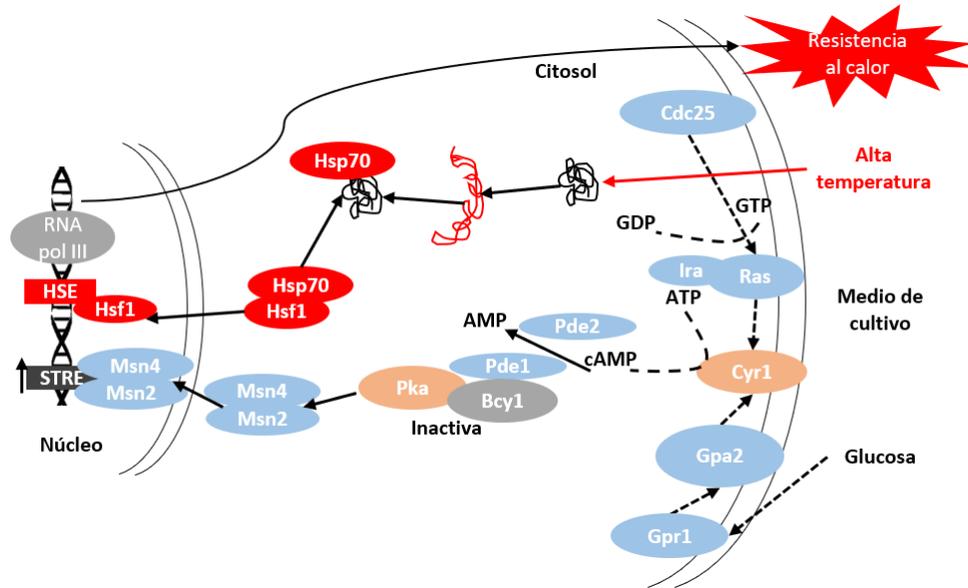


Figura II-III. Respuesta al estrés por calor en *S. cerevisiae*.

La alta temperatura provoca el aumento de proteínas desplegadas, y el complejo Hsf1-Hsp70 se desacopla; Hsf70 participa en el plegamiento de proteínas desplegadas y Hsf1 se transloca al núcleo para inducir la expresión de los genes que cuentan con el HSE, y que responden al aumento de temperatura.

II.6. Respuesta al estrés osmótico

El estrés por elevada osmolaridad se presenta cuando el agua se desplaza hacia fuera de la célula, ocasionado por la presencia de altas concentraciones de soluto en el medio de cultivo. Un proceso transitorio para contrarrestar el desplazamiento de agua intracelular modifica el potencial eléctrico de la membrana al cambiar las concentraciones de iones de la misma (Tao *et al.*, 2009). En este proceso de adaptación a la alta osmolaridad, la levadura realiza un reajuste metabólico para sobrevivir al estrés (Tao *et al.*, 2009). Dicho reajuste consiste principalmente en la acumulación de glicerol que actúa como un osmolito (Ansell *et al.*, 1997; Hohmann, 2002b). Esta respuesta se ejerce por medio de la vía HOG (High Osmolarity Glycerol por sus siglas en inglés) (Figura II-4). Esta vía forma parte de la vía MAP quinasa y controla eventos importantes en la célula como el crecimiento, la proliferación y las respuestas a estrés provocados por estímulos ambientales, factores de crecimiento o citocinesis (Hohmann, 2002b). Consiste en una

cascada de señalización de tres MAP cinasas secuenciales, la MAP cinasa-cinasa-cinasa (MAPKKK) que fosforila y activa a las MAP cinasa-cinasa (MAPKK) y que, a su vez fosforila y activa a la MAP cinasa (MAPK), la cual se dirige hacia el núcleo donde fosforila y regula aproximadamente 150 genes de respuesta a estrés por medio de los factores transcripcionales MSN2/4 (Molin, 2009). Esta vía está regulada por las proteínas Sln1p y Sho1, localizadas en la membrana plasmática, Sho1 se une a la MAPKK (Pbs2p) y recluta a las proteínas Ste11p, Ste20p y Ste50p, una vez fosforilada Pbs2p, este complejo se separa y fosforila a Hog1p (Ammerer *et al.*, 2000). La MAPKKK está compuesta por Ssk2 y Ssk22, la MAPKK es Pbs y la MAPK es Hog1. Una vez fosforilado Hog1, éste entra al núcleo y activa a ocho factores transcripcionales, entre ellos Tup1, Ssn6 y Sko1, que activan a diferentes proteínas involucradas en las REC y en el estrés osmótico. Las enzimas Gpd1 y Gpp2 están reguladas por la vía de HOG y son las responsables de sintetizar glicerol a partir de gliceraldehído-3-fosfato, un intermediario de la glicólisis (Ansell *et al.*, 1997).

II.7. Respuesta a estrés oxidativo

Durante el crecimiento aeróbico de *S. cerevisiae*, en el que utiliza oxígeno molecular (O_2) como último aceptor de electrones, se forman moléculas muy reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas moléculas, además de regular varios procesos celulares, también resultan nocivas para la célula cuando se acumulan en altas concentraciones (estrés oxidativo) (Storz *et al.*, 1987). El mecanismo de acción de *S. cerevisiae* ante el estrés oxidativo es la activación de los sistemas de defensa antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos (Collinson & Dawes, 1995). Los no enzimáticos consisten principalmente en la acumulación de moléculas que sirven en la captura de algunas de las ROS, éstas pueden ser: Glutatión (GSH), poliaminas, ácido eritro-ascórbico, metalotioneínas, flavo-hemoglobinas, glutarredoxinas y tiorredoxinas. Los enzimáticos incluyen enzimas que son capaces de remover ROS, como las catalasas que transforman el H_2O_2 en O_2 y H_2O ; las superóxido dismutasa, que convierten el radical superóxido (O_2^-) a H_2O_2 y O_2 (Gralla & Valentine, 1991; Jamieson *et al.*, 1994); tres enzimas de la ruta de las pentosas fosfato, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf1), la transcetolasa (Tkl1) y la ribulosa-5-fosfato epimerasa (Rpe1), que son enzimas cruciales para la producción de poder reductor celular en forma de NADPH (Juhnke *et al.*, 1996); glutatión reductasa que es la enzima responsable de la reducción de glutatión oxidado (Gssg) y, por lo tanto, del mantenimiento de la proporción Gsh/Gssg intracelular (Collinson

& Dawes, 1995); la tiorredoxina peroxidasa reduce el H₂O₂ e hidroperóxidos de alquilo con ayuda de la tiorredoxina reductasa y NADPH (Garrido & Grant, 2002), hidroperóxidos orgánicos o peroxinitritos. Los genes que codifican para estas enzimas están regulados por los factores transcripcionales *yap1*, *yap2* y *gcn4*, los cuales se vuelven activos cuando la célula se encuentra bajo estrés oxidativo (Schnell *et al.*, 1992).

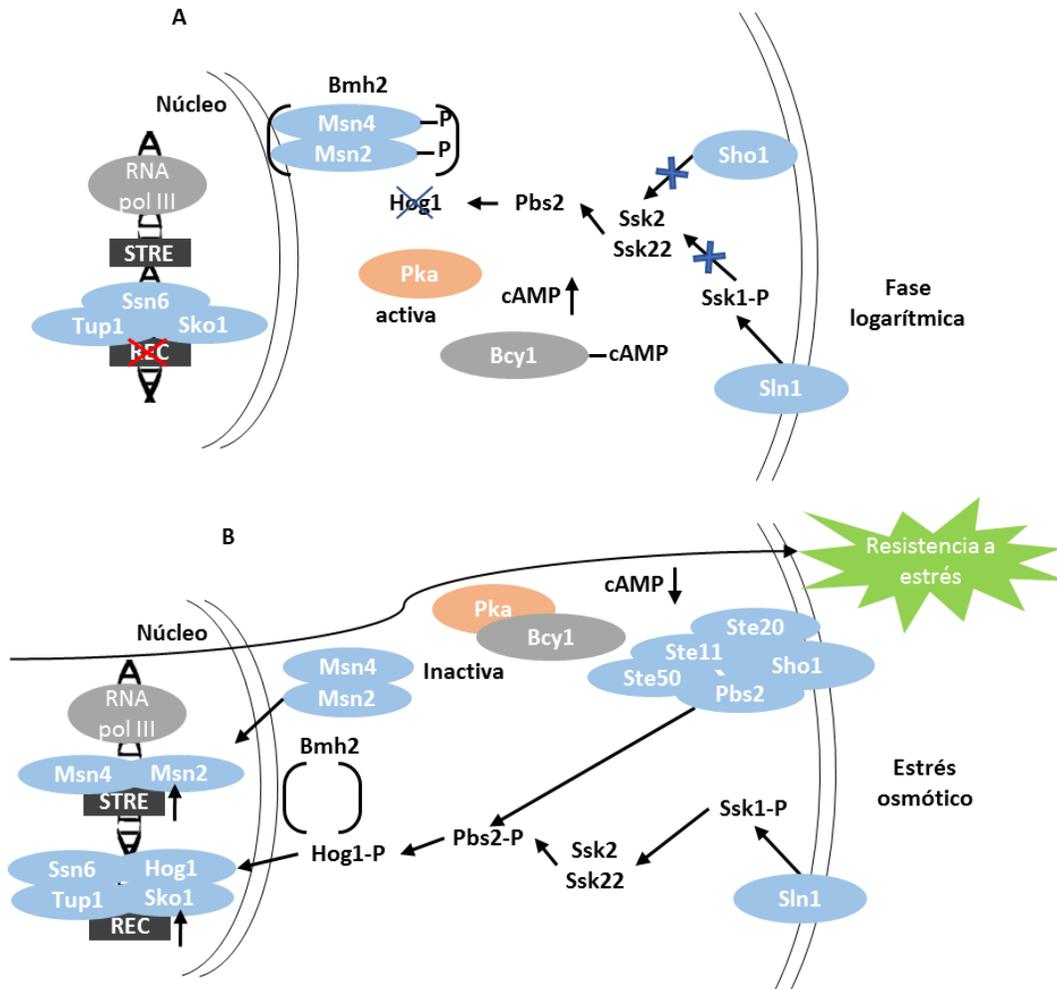


Figura II-IV. Actividad de la vía de HOG en presencia y ausencia de estrés osmótico.

(A) Bajo condiciones óptimas de crecimiento la proteína Sln1 fosforila a Ssk1 impidiendo la fosforilación de la MAPKKK (Ssk2 y Ssk22) y con esto la activación de la vía MAPK, MAPKK (Pbs2) y MAPK (Hog1), evitando también la fosforilación el complejo Sko1-Tup1-Ssn6 unido las secuencias CRE en el núcleo. **B** En condiciones de estrés osmótico Sln1 deja de fosforilar a Ssk1 permitiendo la fosforilación de MAPKKK y activando la vía MAPK. Sho1 recluta y forma el complejo Sho1-Pbs2-Ste11-Ste20-Ste50 fosforilado y se desacopla para fosforilar a MAPK (Hog1), permitiendo la fosforilación el complejo Sko1-Tup1-Ssn6 unido las secuencias CRE en el núcleo y la expresión de estos genes.

II.8. Respuestas a compuestos inhibidores encontrados en los hidrolizados

La presencia de compuestos inhibidores en el medio de cultivo como furfural y HMF causa cambios en la expresión genética (Ask *et al.*, 2013). Los mecanismos de resistencia a estos compuestos involucran también la sobreexpresión de genes involucrados en el equilibrio redox, estrés oxidativo y salino, así como los factores transcripcionales Msn2 / Msn4, Yap1 y Hsf1, que están involucrados en la RGE y específicamente la sobreexpresión de *yap1* y *msn2* (Lin *et al.*, 2009). Se sabe también que la actividad de la vía MAPK de la respuesta a la integridad de la pared celular aumenta la tolerancia a HMF y que el metabolismo redox y energético se activa cuando la levadura está expuesta a hidrolizados que contienen furanos, ácidos y/o compuestos fenólicos (Larsson *et al.*, 1999). Esta exposición afecta también la expresión de genes que están involucrados en la termo tolerancia, al sobre expresar a *hsp78*, que codifica para una chaperona mitocondrial necesaria para contrarrestar el estrés por calor; así como también la sobreexpresión de algunos genes relacionados con el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Lin *et al.*, 2009). Curiosamente, las proteínas implicadas en el ciclo de TCA se regulan positivamente, mientras que las enzimas de la síntesis de glicerol se regularon negativamente (Caspeta *et al.*, 2015).

Dado lo anterior, sabemos que *S. cerevisiae* tiene la capacidad de sobrevivir a las condiciones estresantes que se presentan en su entorno presentando una ventaja para el proceso de producción de etanol lignocelulósico, pero también se sabe que, si las perturbaciones ambientales se presentan en periodos largos de tiempo, se pueden generar mutaciones con el fin de que la célula cambie su metabolismo de manera permanente y así presentar una respuesta al estrés de manera constitutiva (Sauer, 2001). Esto puede generar cepas más estables genéticamente, requisito muy buscado para la industria; a este proceso de adaptación permanente se le conoce mejor como evolución adaptativa. Sabiendo que las células son capaces de evolucionar con el fin de adaptarse a las nuevas condiciones presentadas en su entorno, entonces podemos forzar a que una cepa evolucione a las condiciones que un proceso de producción requiera, a esto se le conoce como evolución adaptativa en laboratorio.

II.9. Evolución adaptativa y generación de levaduras tolerantes al estrés

La evolución de un organismo se da gracias a la variedad y complejidad de ambientes encontrados en la biosfera, y los organismos presentes actualmente, son las variantes biológicas más aptas para sobrevivir a su entorno particular, el cual impone diferentes perturbaciones a lo largo del tiempo (Sauer, 2001). En el laboratorio, las perturbaciones celulares se han definido como las condiciones que provocan un daño en las macromoléculas y una desestabilización metabólica, que afecta también el crecimiento óptimo de una población celular. Estos daños pueden ser ocasionados directamente a la membrana celular, al sistema de síntesis de proteínas, al potencial redox de la célula, a su información genética y, en general a su metabolismo. *S. cerevisiae* y otros microorganismos son capaces de reorganizar su expresión genética y por lo tanto su metabolismo, con el fin de adaptarse a las perturbaciones que se presentan en su entorno (Mitchell *et al.*, 2009; Tagkopoulos *et al.*, 2008). Estos reordenamientos genómicos y metabólicos que se generan con los cambios ambientales se analizan actualmente mediante herramientas globales de análisis como: citometría de flujo, genómica, proteómica, fluxómica y transcriptómica (Piper, 1993; Sauer, 2001). Mediante estas herramientas se pueden identificar las modificaciones en las redes de señalización y la reprogramación de la expresión genética de las células evolucionadas; así como su efecto en los flujos metabólicos que mantienen la homeostasis celular, aun en presencia de una perturbación (Aguilar *et al.*, 2012; Caspeta *et al.*, 2016). El estudio de estas repuestas ante ambientes específicos como los encontrados en la producción de etanol es importante para aumentar el conocimiento básico del funcionamiento de la levadura y proponer soluciones directas al problema de la tolerancia a ambientes de producción comercial.

La evolución adaptativa en laboratorio (EAL) se ha utilizado con éxito para el diseño y obtención de microorganismos resistentes a condiciones estresantes de los procesos de producción de compuestos de interés comercial (Sauer, 2001). La EAL consiste en modificar gradualmente o mantener las condiciones subóptimas de crecimiento de una cepa a las condiciones deseadas y realizar subcultivos de las poblaciones de dicha cepa para que se adapten a las nuevas condiciones (Figura II-V). Esta adaptación depende, en primer lugar, de la diversidad genética que tiene la población celular; en dicha diversidad se presentan mutaciones al azar de su material genético, lo que permite eliminar funciones celulares o exacerbar otras, esperando que una de ellas resulte favorable para adaptarse a las nuevas condiciones. Sin embargo, la probabilidad de generar un cambio

favorable a una condición específica es baja a comparación de todas las oportunidades que tiene la célula de generar mutaciones a lo largo de todo su genoma. Esta problemática puede ser disminuida de dos maneras: la primera es por recombinación, que brinda la posibilidad de eliminar mutaciones neutrales o perjudiciales, así como preservar las mutaciones útiles; la segunda es mediante la selección continua de poblaciones que han evolucionado durante muchas generaciones, lo cual evita la selección de un solo fenotipo como nuevo punto de partida para cada ciclo, con la ventaja de seleccionar en muchas generaciones, por su corto tiempo de replicación (Sauer, 2001). El tiempo que se requiere para que una población encuentre más rápido un fenotipo óptimo depende de la frecuencia de las mutaciones, sabiendo que una sobre-mutación mata a las células y una sub-mutación, no genera variabilidad y por lo tanto no se adapta (Sauer, 2001).

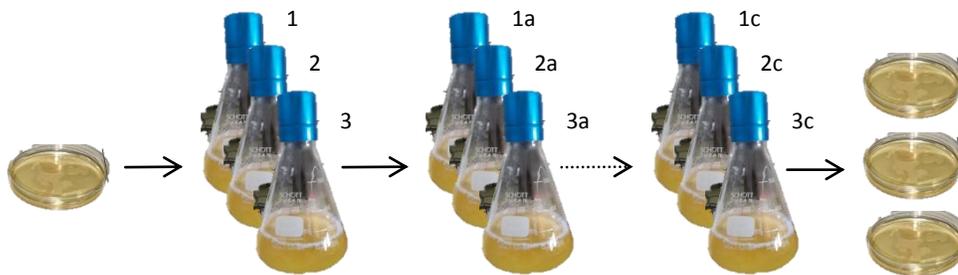


Figura II-V. Esquema general de la evolución adaptativa en laboratorio y selección de cepas evolucionadas.

Las cepas cultivadas en los primeros matraces (a condiciones subóptimas) permanecen ahí hasta un cierto número de generaciones, posteriormente se transfieren a medio de cultivo nuevo cada determinado periodo de tiempo. Este ciclo se repite hasta que las poblaciones celulares muestran mejoría en alguna respuesta fisiológica, como la velocidad de crecimiento.

La condición para seleccionar una cepa mediante EAL debe simular las condiciones más relevantes para un proceso, por ejemplo, aireación, limitación o abundancia de sustrato, pH ácido, elevada osmolaridad, estrés mecánico, densidad celular y altas o bajas temperaturas, etc. Esto con el fin de evitar las variantes nulas (las que no tienen ningún efecto positivo para adaptarse a las condiciones deseadas). Debe tenerse en cuenta que la cepa óptima se genera en función de la competencia entre las variantes que están presentes en las condiciones dadas y esta propiedad no está bajo el control del experimentador (Parekh *et al.*, 2000). Para simplificar la selección, un fenotipo deseado se puede distinguir fácilmente por el aumento en la capacidad específica de crecimiento, lo cual demuestra un incremento en la tolerancia a dichas condiciones (Parekh *et al.*, 2000).

Después de la selección de un fenotipo deseado, éste se debe caracterizar. Se ha demostrado que el análisis de los flujos metabólicos proporciona información importante para entender los cambios genéticos realizados en una cepa evolucionada; entender estos cambios es necesario para la mejora de cepas mediante manipulación genética y así poder mejorar un proceso (Sauer *et al.*, 1997). Recientemente se ha utilizado la EAL para generar levaduras resistentes a pH ácido (Yona *et al.*, 2012), elevada temperatura (Caspeta *et al.*, 2016), títulos altos de ácido acético (Geng *et al.*, 2017; González-Ramos *et al.*, 2016), altas concentraciones de HMF (Heer *et al.*, 2009), y múltiples estreses (Çakar *et al.*, 2005).

Estos antecedentes nos sugieren la posibilidad de generar levaduras que puedan operar a altas temperaturas, pH ácido, alta osmolaridad, presencia de compuestos tóxicos (principalmente ácido acético) y altas concentraciones de etanol (Caspeta & Nielsen, 2015).

II.10. Pared celular y membrana plasmática de *S. cerevisiae*

La pared celular de *S. cerevisiae* es la responsable de dar forma, estructura y protección a la célula y está constituida por polisacáridos y proteínas, de los cuales el 58% es β -glucanos, 40% proteínas y 2% quitina (Gamzazade *et al.*, 1997; Klis, 1994).

Las proteínas están asociadas a glúcidos por enlaces O ó N, formando glicoproteínas que son parte del sistema de protección de la célula; participan en la absorción de moléculas, en la transmisión de señales al citoplasma y en la síntesis y remodelación de los componentes de la pared celular (Bowman & Free, 2006).

La quitina se encuentra en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplásmica. Ésta tiene un rol importante en la morfología y el ciclo celular, también es la responsable de la formación de la cicatriz durante la separación de la célula madre e hija (gemación) (Lipke & Ovalle, 1998).

Los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3 y β -1,6, responsables de mantener la forma y rigidez a la célula, además favorecen la resistencia a los cambios osmóticos y mecánicos. Estos polímeros se sintetizan de manera ramificada por las enzimas glucano sintetasa (codificadas por los genes *fks1* y *fks2*) ubicadas en la membrana plasmáticas. Estas ramificaciones se unen a otros

glucanos, a la quitina y a las glicoproteínas, formando una estructura rígida y compleja que proporciona gran resistencia mecánica para la protección celular.

La membrana plasmática de *S. cerevisiae* está constituida por fosfolípidos, moléculas anfipáticas formadas por una cola de hidrocarburos (hidrofóbica) y una cabeza con un grupo fosfato (hidrofílica). Debido a la anfipaticidad de los fosfolípidos, el agua forma una estructura de bicapa entre ellos con la parte hidrofóbica encontradas entre sí (Granseth *et al.*, 2005). Dentro de la bicapa lipídica se encuentran embebidas diferentes tipos de moléculas, como carbohidratos y proteínas. También se sabe que dentro de la bicapa de fosfolípidos existen micro dominios de lípidos, también denominados balsas lipídicas. Estas balsas son ricas en ergosterol y en cadenas saturadas de lípidos, como se encuentran en los esfingolípidos, y podrían estabilizarse por fuerzas débiles, como los enlaces de hidrógeno y las interacciones de van der Waals. La fluidez de la membrana se ve afectada por la relación, la composición y la estructura de los esteroides que se encuentran en ella (Lingwood & Simons, 2010; Simons & Gerl, 2010). Es por eso que la regulación del tipo y la cantidad de esteroides tiene un rol importante que puede servir como una respuesta adaptativa a los cambios ambientales (Dufourc, 2008). Las balsas lipídicas también poseen una composición de proteínas distinta, lo que favorece el desarrollo de la transducción de señales o el tráfico de membrana (Simons & Gerl, 2010).

III. ANTECEDENTES

Se realizaron experimentos de evolución adaptativa en laboratorio de donde se aislaron cepas termo tolerantes (TTS) de *S. cerevisiae* cepa CEN.PK113-7D (Caspeta *et al.*, 2016). Estas cepas crecieron en promedio 1.91 ± 0.12 veces más rápido que la cepa parental cuando se cultivaron a 39.5°C ; en esta condición, consumieron glucosa en promedio 1.50 ± 0.2 veces más rápido y excretaron etanol y glicerol en promedio 1.6 ± 0.09 y 1.3 ± 0.08 veces más rápido que la cepa parental. Estas cepas se evaluaron en la producción de etanol con altas concentraciones de glucosa (elevada osmolaridad) y alta temperatura (39.5°C). El resultado fue que las cepas termotolerantes producen etanol a mayor productividad, lo que reduce los costos de producción en 0.5 USD el galón (Caspeta & Nielsen, 2013).

Utilizando la misma estrategia de EAL, recientemente se desarrollaron cepas tolerantes a altas temperaturas a partir de la cepa parental S288c mediante la técnica de transferencia continua a medio de cultivo fresco (Caspeta *et al.*, 2019); en este trabajo se aislaron 9

cepas termo tolerantes denominadas TT 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2 y 3.3, las cuales se evaluaron y compararon con su cepa parental S288C y con las TTS evolucionadas a partir de la cepa CEN.PK113-7D en la producción de etanol bajo las condiciones de alta osmolaridad (2 Osm) y elevadas temperaturas (39.5°C), los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla III-I. Comparación de velocidades específicas de crecimiento (μ) y producción de etanol y glicerol entre las cepas termotolerantes y su parental (Caspeta <i>et al.</i>, 2016 y Caspeta, <i>et al.</i>, 2019.							
Condiciones de cultivo	40°C				40 °C y 2 Osm		
Cepa	μ	Y _x	Q _e	Y _g	Q _s	μ	Q _e
CEN.PK113	0.12	0.07	9.7	0.11	9.6	-	-
Termotolerante derivada de CEN.PK113	0.16	0.10	15.0	0.15	12.0	-	-
S288c	0.11	0.08	9.5	0.07	7.0	0.06	9.6
Termotolerante derivada de S288c	0.16	0.08	15.8	0.07	13.0	0.16	15.0

*Notas: Las velocidades específicas de crecimiento (μ) están dadas en 1/h, las velocidades específicas de consumo y producción (Q) estas dadas en mmol/gPS/h y los rendimientos en g/g. En todos los casos, la variación de los valores promedio fue menor al 5%. Los experimentos se realizaron por triplicado.

A nueve de las cepas termotolerantes derivadas de CEN.PK113-7D se les secuenció su genoma y se les evaluó su perfil transcripcional durante el crecimiento exponencial en glucosa, utilizando bioreactores, a $40 \pm 0.1^\circ\text{C}$. En la evaluación del genoma se encontraron 30 variaciones únicas de nucleótidos (SNV) en 18 genes, de los cuales la mayoría fue en genes que afectan la composición y estructura de la membrana, la respiración, la reparación del ADN y la replicación. De los SNV detectados, el 26% de estos originaron codones de paro y el 66% fueron en genes que incluyeron a *atp3* y *erg3* que codifican la subunidad γ del complejo F1 de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial y la esterol desaturasa C-5 respectivamente. Al realizar estas mutaciones puntuales en las cepas silvestres se encontró que la mutación de *atp3* afecta negativamente la termotolerancia, mientras que la mutación en *erg3* (mutación al azar en el aminoácido

185, reemplazando a Tyr185 con un codón de término) confería el 86% de la tasa de crecimiento específica de las termotolerantes aisladas. Se observó también que las termotolerantes y la mutante específica en *erg3* acumularon el esteroles fecosterol, que es un esteroles “con una insaturación” (figura III-I), lo cual sugiere que el aumento de la presencia de fecosterol (a diferencia de los esterol saturados como el esterol), podría conferir termo tolerancia en las cepas de *S. cerevisiae* evolucionadas.

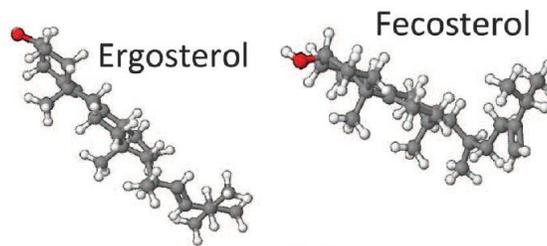


Figura III-I. Estructuras tridimensionales del ergosterol y del fecosterol.

Algunas condiciones estresantes como la oxidación, la disponibilidad de hierro y la acumulación de etanol pueden promover la expresión de genes de biosíntesis de esterol. Bajo condiciones hipóxicas, actúan los factores de transcripción Ecm22 y Upc2 uniéndose al elemento regulador de esterol (ERS por sus siglas en inglés) induciendo la expresión de genes de biosíntesis de esterol por medio de la vía del mevalonato (figura III-II). Upc2 también induce la expresión de los genes *aus1* y *pdr11* que inducen a la levadura a metabolizar los esterol presentes en el medio ambiente (Hu *et al.*, 2017).

La mutación puntual en el gen *erg3* indujo la sobreexpresión: 1) Del gen *acs2* que codifica para la acetil-CoA sintetasa del citosol, que cataliza la reacción: Acetato + ATP + Coenzima A → Acetil-CoA + pirofosfato + AMP. Poniendo a disposición más Acetil-CoA para que se dirija a la síntesis de ergosterol; 2) Los genes *arg10* y *hmg1* de la vía del mevalonato; y 3) El factor transcripcional Upc2

Interesantemente, no se modificó el contenido de esterol en las TTS y de las que tenían la mutación puntual en *erg3* comparado con la cepa silvestre (Caspeta *et al.*, 2014; Caspeta & Nielsen, 2015).

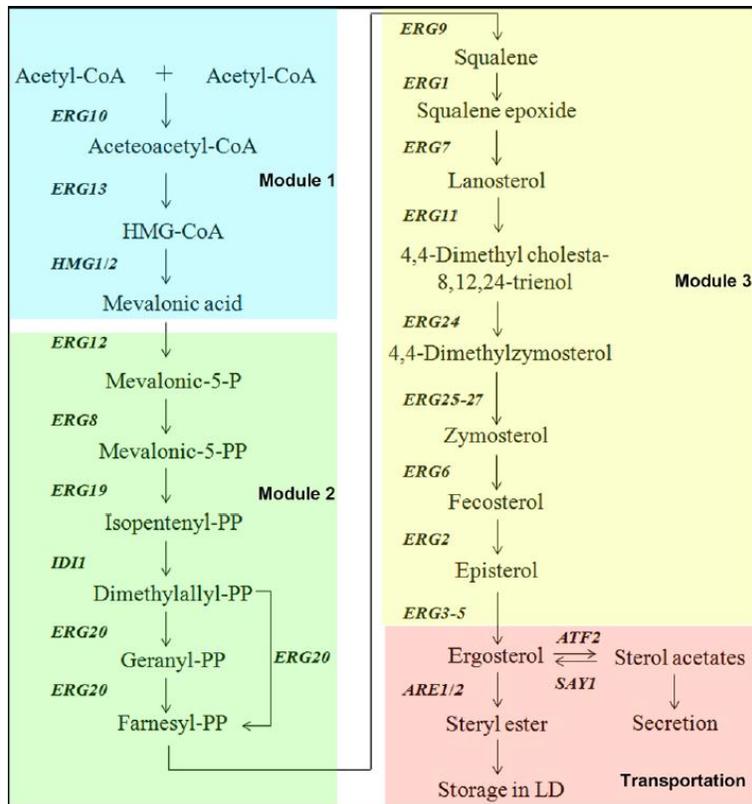


Figura III-II. Vía de síntesis de esteroides en *S. cerevisiae*.

Síntesis de intermediarios, productos finales y enzimas involucradas en la síntesis de ergosterol. Tomada de Hu *et al.*, 2017.

Esto sugiere que, bajo la mayoría de las condiciones estresantes, *S. cerevisiae* tiende a modificar su membrana, ya que es esta la primera en estar en contacto con el medio estresante y es el principal escudo de protección de la levadura; es por eso que Hu *et al.* (2017) estudiaron como es que *S. cerevisiae* regula la síntesis de ergosterol modificando la ruta del mevalonato y concluyeron que:

1. La mutación de *erg6* no es letal, pero da como resultado un fenotipo de crecimiento y desarrollo gravemente deficiente;
2. La sobreexpresión de *erg6* aumenta el contenido de ergosterol;
3. La mutante *erg3* no es letal, pero la cepa no puede crecer en medios sin una fuente de carbono fermentable, mientras que otros mutantes *erg3* son sensibles a la baja temperatura, pero insensibles a los inhibidores de la síntesis de esterol.

Si bien las mutaciones de los genes no esenciales no afectan la supervivencia de la levadura, cambian la composición de la membrana celular, lo que también afecta el potencial de membrana, la tolerancia a la sal y la resistencia a químicos (Hu *et al.*, 2017).

De hecho, las cepas termotolerantes de *S. cerevisiae* generadas por la exposición a corto plazo a 54°C o la adaptación para crecer a 40°C, también adquirieron un fenotipo respiratorio acompañado con la falta de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables. La incapacidad para crecer en fuentes de carbono no fermentativas en las cepas de levadura termotolerantes es una compensación indeseable, ya que esto aumenta los costos asociados con la propagación de la levadura durante el proceso industrial. Sin embargo, la cepa con la mutación puntual en el gen *erg3*, que tiene un fenotipo termotolerante, ha mantenido la capacidad de crecer en fuentes de carbono no fermentables y muestra un crecimiento diaúxico típico (Caspeta & Nielsen, 2015; Hu *et al.*, 2017).

IV. JUSTIFICACIÓN

El etanol de segunda generación es una fuente de energía importante y una alternativa que puede ayudar a la disminución de las emisiones de CO₂ a la atmósfera, ya que la biomasa, de la cual se puede producir, se regenera a una tasa de 100 mil millones de toneladas al año a partir de la energía solar, CO₂ y agua, y su combustión libera un 60% menos CO₂ que los combustibles fósiles.

La conversión de biomasa en etanol involucra condiciones de proceso que son desfavorables para la fermentación. Sin embargo, realizar la sacarificación y la fermentación en una sola etapa es una estrategia prometedora para elevar los rendimientos de liberación de azúcares fermentables y, por lo tanto, de producción de etanol. Pero se requieren de levaduras que sean tolerantes a altas temperaturas, pH ácido, alta osmolaridad, concentraciones elevadas de etanol y compuestos tóxicos.

La EAL permite la obtención de cepas de levadura tolerantes a las condiciones desfavorables, pero necesarias para la liberación de una mayor cantidad de azúcares fermentables, que puedan no sólo resistir si no también crecer a velocidades mayores y que, además, conviertan la glucosa a etanol tan rápido como lo harían en fase exponencial de crecimiento.

El estudio del metabolismo mediante la expresión genética de las cepas evolucionadas bajo condiciones estresantes nos permite dilucidar los mecanismos naturales que realiza una célula para evolucionar hacia una condición desfavorable y entenderlos para ser capaces de diseñar estrategias directas de modificación genética o del proceso de

fermentación con el fin de mejorar procesos de producción de metabolitos de interés industrial como lo es el bioetanol de segunda generación.

La obtención de cepas tolerantes por EAL, donde la presión de selección sea elevada temperatura y/o pH ácido, es una estrategia prometedora, ya que gracias a la RCE de *S. cerevisiae* que confiere protección cruzada, se generarían cepas que sean resistentes a la mayoría de las condiciones desfavorables del proceso de producción de etanol.

En este trabajo se seleccionaron cepas de *S. cerevisiae* capaces de resistir a temperaturas de 40°C y altas concentraciones de ácido acético a pH bajo mediante EAL. Además de que sean también resistentes a alta osmolaridad (2 Osm) y concentraciones altas de etanol (> 120 g/L); se caracterizó su metabolismo a través de la expresión genética para entender los mecanismos naturales de una evolución a esas condiciones de presión y así poder diseñar estrategias directas para mejorar el proceso de producción de etanol.

V. HIPÓTESIS

El estudio de la fisiología de cepas de *S. cerevisiae* evolucionadas a temperaturas subóptimas y a pH bajo nos permitirá comprender los principales cambios que realizan las cepas después de un proceso de EAL.

VI. OBJETIVO GENERAL

Entender las principales modificaciones que realiza *S. cerevisiae* durante una evolución adaptativa en laboratorio a altas temperaturas y altas concentraciones de ácido acético a pH ácido.

VI.1. Objetivos específicos

1. Analizar el transcriptoma a 30°C de la cepa termotolerante TT23 con el fin de comprender los cambios metabólicos que surgieron durante la EAL a altas temperaturas.

2. Diseñar y realizar un experimento de EAL para la obtención de cepas resistentes a altas concentraciones de ácido acético y pH bajo.
3. Analizar el transcriptoma de las cepas evolucionadas con el fin de comprender los cambios metabólicos que surgieron durante la EAL a altas concentraciones de ácido acético y pH bajo.
4. Estudiar la composición de los lípidos de membrana de las cepas evolucionadas para comprender cuales son los cambios estructurales de la membrana que ayudan a estas cepas a resistir las condiciones desfavorables.

VII. METODOLOGÍA

VII.1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en los experimentos de evolución adaptativa

La cepa de *S. cerevisiae* utilizada en este estudio fue la S288c (MAT α SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6; (Mortimer & Johnston, 1986), amablemente donada por la Dra. Alicia González del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México. Seleccionamos esta cepa porque se ha usado ampliamente para estudios de laboratorio, se puede cultivar con requisitos nutricionales mínimos y se ha utilizado en proyectos de secuenciación sistemática.

La TT23 es una cepa termotolerante proveniente de la S288c, seleccionada por (Caspeta *et al.*, 2019) de un experimento de EAL, donde la temperatura de cultivo se mantuvo a 39.5 °C durante 1200 generaciones.

VII.2. Medios de cultivo

El medio de cultivo mínimo utilizado en este trabajo fue el medio Delft, el cual está formulado a base de sales, metales traza, vitaminas y glucosa como fuente de carbono. La composición del medio y las cantidades para la preparación de un litro de medio de cultivo se muestran en la tabla VII-1.

Las soluciones de glucosa 100X, sales 4X y elementos traza 1000X se esterilizan por separado en una autoclave a 121°C y 15 libras/pulgada cuadrada (PSI), por 15 minutos. La solución de vitaminas 1000X se esteriliza por filtración con filtros de 0.2 μ M. Los

elementos traza se almacenan en un frasco ámbar porque algunos de sus componentes son foto sensibles.

El medio de cultivo rico utilizado en este trabajo fue el medio “extracto de levadura-peptona-dextrosa” o YPD (por sus siglas en inglés). Este medio contiene 20 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de dextrosa y 15 g/L de agar. Para prepararlo, se mezclan estos componentes en un matraz y se esteriliza en autoclave.

Para preparar medio mínimo sólido con ácido acético a pH menores a su pKa (4.76). Se preparó un medio con 40 g/L de agar y medio Delft 2X con el doble de la concentración final requerida de ácido acético, este último se ajusta al pH deseado. Ambas soluciones se esterilizan por separado. Se deben mezclar volúmenes iguales de cada solución antes de verter en cajas de Petri.

Tabla VII-I. Composición del medio mínimo Delft.		
Formula	Descripción	Cantidad
Glucosa 100X		100 mL
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucosa	200 g/L
Sales 4X (pH 6)		250 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio	20 g/L
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	15 g/L
MgSO ₄ *7H ₂ O	Sulfato de magnesio	2 g/L
Elementos traza 1000X (pH 4)		1 mL
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	15 g/L
ZnSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de zinc	4.5 g/L
MnCl ₂ . 2H ₂ O	Cloruro Manganeso	0.84 g/L
CoCl ₂ . 6H ₂ O	Cloruro de cobalto	0.3 g/L
CuSO ₄ . 5H ₂ O	Sulfato de cobre	0.3 g/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio	0.4 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de Calcio	4.5 g/L
FeSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de hierro	3 g/L
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	1.0 g/L
KI	Ioduro de potasio	0.10 g/L
Vitaminas 1000X (pH 6.5)		1 mL
	Biotina	0.05 g/L
	Ácido p-amino benzoico	0.2 g/L
	Acido nicotínico	1 g/L
	Ca-pantothenato	1 g/L
	pyridoxina-HCl	1 g/L
	thiamina-HCl	1 g/L
	myo-inositol	25 g/L
Agua estéril		cbp 1 L

VII.3. Evolución adaptativa de laboratorio (EAL) y selección de cepas evolucionadas

El experimento de EAL se realiza tomando como punto de partida las cepas S288c y TT23 en medio Delft con la mayor concentración de ácido acético que pueden soportar. A partir de un cultivo saturado de cada cepa, se inocularon tres matraces con 10 mL de medio Delft con ácido acético. A partir de entonces se realizaron pases cada 24 horas comenzando siempre en la misma densidad óptica (D.O.) y cuidando que después de este tiempo el medio de cultivo aun tuviera glucosa.

Para calcular el inóculo del siguiente pase se utilizó la siguiente fórmula:

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1}$$

Donde V1 es el volumen de la muestra a tomar para inocular el siguiente matraz, C2 es la concentración a la que queremos que inicie el matraz a inocular, V2 es el volumen del medio de cultivo fresco (10 mL) y C1 es la concentración final del matraz después de 24 horas.

También se midió la D.O. a 600 nm inicial (D.O. i) y final (D.O. f) en cada pase para calcular el número de generación por día con la siguiente formula:

$$N \text{ (número de generaciones)} = \frac{\ln(D.O.f) - \ln(D.O.i)}{\ln(2)}$$

Y para estimar la π con la siguiente fórmula:

$$\pi = \frac{\ln(D.O.f) - \ln(D.O.i)}{\text{horas}}$$

Se realizaron cultivos en paralelo cada 50 generaciones con concentraciones mayores de ácido acético para detectar una mayor resistencia al mismo (ej. mayor velocidad de crecimiento). Se realizó el ajuste de la concentración de ácido acético en caso de resistir y se continuaba la EAL.

Para aislar las cepas evolucionadas, se tomó una muestra de cada matraz para inocular una caja de Petri con las mismas condiciones que la EAL y se incubaron por 8 días. Se seleccionaron 3 unidades formadoras de colonias (UFC) al azar por cada caja de Petri y

se usaron para inocular tubos de ensayo con 3 mL de medio de cultivo para incubar por tres días a las mismas condiciones de EAL. De los cultivos saturados, se tomó una alícuota de cada cepa para guardar en crio-congelación a -70 °C con 40% de glicerol y otra para inocular tres pocillos de una placa de 96 pozos.

Se realizó una cinética en un lector de placas SpectraMax iD3 de la marca MOLECULAR DEVICES de todas las cepas seleccionadas por triplicado a las mismas condiciones de EAL por dos días, midiendo la D.O. a 600 nm cada 40 min. Estos datos se usaron para calcular la π y seleccionar aquella cepa con la mejor π de cada matraz para realizar una caracterización cinética.

VII.4. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ)

Para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ) cada 50 generaciones, las cinéticas se comienzan a una DO_{600nm} de 0.3 aproximadamente (utilizando agua como blanco), la cual se mide con un espectrofotómetro equipado con lámpara de luz visible. Se toman muestras del medio cada hora realizando diluciones de las muestras para ajustar la DO_{600nm} siempre a valores menores de 0.4. Estos valores se grafican con respecto al tiempo con ayuda de una hoja de cálculo de Excel y se toman los puntos correspondientes a la fase exponencial para calcular la μ por medio de la ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

De donde la biomasa (X) es en DO_{600} y t es el tiempo en horas que, por integración, se obtiene la siguiente ecuación:

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

En esta ecuación sustituimos la concentración de biomasa a un tiempo determinado del cultivo, y la concentración de biomasa al inicio del cultivo o a un tiempo menor, para ajustar la X_0 .

VII.5. Extracción de RNA total para el análisis transcriptómico

Se tomaron muestras de 1.5 mL en la fase exponencial de un cultivo en matraces con medio Delft a 30 °C. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 2 min y se desechó el sobrenadante. El RNA total se extrajo de los concentrados celular por medio del kit

YeaStar RNA de Symo Research, el cual se basa en una lisis enzimática por zimoliasa y una recuperación y limpieza del RNA utilizando columnas de afinidad.

VII.5. Análisis de expresión génica

Las muestras de RNA se procesaron en el instituto de fisiología de la UNAM. Se utilizó el análisis por SWAP (cambio de marcaje). Los triplicados de la muestra y su control se mezclaron y se tiñeron e hibridaron en ambos sentidos (control vs problema y problema vs control) de acuerdo con los protocolos descritos en <http://www.grc.nia.nih.gov/branches/rrb/dna.htm>. Para el análisis por SWAP se debe cumplir la premisa de que un gen que aumente su expresión en el chip 01 debe estar expresado en sentido contrario en el chip02 y viceversa. Los microarreglos se expusieron a pantallas de phosphorimager durante 1 a 3 días. Las pantallas luego se escanearon en un Molecular Dynamics STORM PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) a una resolución de 50 µm. Se usó el software ImageQuant (Molecular Dynamics) para convertir las señales de hibridación en la imagen en valores de intensidad, y los datos así generados se transfirieron a las hojas de cálculo de Microsoft Excel, prediseñadas para asociar el formato de datos de ImageQuant a las identidades genéticas correctas.

La normalización global se realizó utilizando el programa GenArise en el que se partió de la intensidad bruta para cada experimento. Se normalizaron los datos calculando primero la intensidad promedio para cada conjunto de datos individual, y luego calculando el promedio de los promedios. Este gran promedio se utilizó como base para el cálculo de los factores de normalización que se aplicaron posteriormente a cada experimento. El promedio de todos los datos normalizados a partir de entonces fue igual al gran promedio.

Los datos de intensidad bruta para cada experimento se transformaron en \log_{10} y luego se utilizaron para el cálculo de las puntuaciones Z. Las puntuaciones Z se calculan restando la intensidad génica promedio general (dentro de un solo experimento) de los datos brutos de intensidad para cada gen, y dividiendo ese resultado por la desviación estándar de todas las intensidades medidas, de acuerdo con la fórmula:

$$\text{puntuación } Z = \frac{\text{Intesidad } G - \text{Intensidad promedio } G1 \dots Gn}{SD \ G1 \dots Gn}$$

donde G es cualquier gen en la micro matriz y G1 ... Gn representa la medida agregada de todos los genes. Los cálculos de relación de cambios significativos en la expresión

génica derivados de datos normalizados globalmente se realizaron simplemente calculando la relación del promedio de todas las mediciones de una condición a otra. Comúnmente se asigna importancia a los genes cuya proporción es mayor o igual a 2.0 o menor o igual a 0.5.

VII.6. Caracterización cinética de los cultivos con las cepas evolucionadas

Las cepas evolucionadas y las parentales se cultivaron en matraces de 125 mL con 20 mL de medio de cultivo. Se tomaron muestras de dos mL cada dos horas. Un mL se utilizó para medir densidad óptica (DO) del cultivo en un espectrofotómetro a 600 nm para determinar su crecimiento; y un mL se centrifugó y filtró para su análisis por HPLC o almacenamiento a -20 °C.

Para determinar las velocidades de consumo de la fuente de carbono y las de producción de metabolitos de fermentación se midió la concentración de glicerol, etanol, acetato y glucosa en un equipo de HPLC con detectores de arreglo de fotodiodos (UV), e índice de refracción (IR). Para esto se utilizó una columna Aminex c18 con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min. Los metabolitos se cuantificaron mediante una curva estándar utilizando patrones de las sustancias puras. Utilizando las áreas bajo la curva del pico correspondiente al metabolito a cuantificar, según el tiempo de retención de su curva estándar. Esta área se divide entre el valor absoluto de la pendiente obtenida en la curva estándar:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Area } (\mu\text{v} * \text{sec}) * 4}{m}$$

Para el cálculo de los rendimientos de biomasa, etanol y glicerol por glucosa consumida, la biomasa se midió por DO a 600 nm y los gramos de peso seco (GPS) se calcularon usando el factor de conversión 0.5 GPS/DO_{600nm}. Se graficó la concentración de biomasa, etanol y glicerol en el eje Y y la concentración de glucosa en el eje X. El rendimiento se calculó como el inverso del valor absoluto de la pendiente de la curva. Tomando en cuenta sólo los valores correspondientes a la fase exponencial de la curva de crecimiento.

El cálculo de las productividades de etanol (Q_e), glicerol (Q_g) y consumo de glucosa (Q_s), se realizaron graficando la concentración de dichos metabolitos en el eje de las Y y los gramos de biomasa en el eje de las X. La pendiente de estas gráficas (tomando en cuenta

sólo los puntos correspondientes a la fase exponencial) se multiplica por la μ y se convierten los gramos de cada metabolito a milimoles (mmol) con su peso molecular.

VII.7. Extracción de lípidos de células de levadura

La extracción de lípidos de membrana se realizó de la siguiente manera. Se tomó una muestra de aproximadamente 10 – 15 mg de peso seco de biomasa de levadura obtenida de cultivos en fase exponencial. A esta muestra se añadieron 20 μ L de EDTA 10 mM, 100 μ L de metanol frío y 1 g de perlas de vidrio y luego se mezclaron por 5 min con intervalos de 1 min en hielo. Se llevaron a cabo 5 extracciones con cloroformo-metanol v/v (2: 1), (2: 1), (1: 1) y (1: 2), respectivamente. Se recuperaron las fracciones y se lavaron dos veces con KCl (0,88% p / v) en agua desionizada. Se recuperó la fase orgánica y se evaporó a temperatura ambiente por 24 horas. Las muestras se suspendieron con cloroformo-metanol (2:1 v/v) y se recuperaron en un tubo eppendorf para su análisis por TLC (Borrull *et al.*, 2015).

VII.8. Separación de lípidos de membrana por TLC.

Los extractos lipídicos de cada una de las cepas se colocaron en una placa de sílica 60F₂₅₄ (10 x 20 cm, 25 μ m) a una distancia de 1.5 cm del borde de la placa y 1.5 cm de separación entre ellas. Posteriormente se realizaron 3 migraciones con diferentes fases móviles: 1) la primera con 50 ml de hexano, 50 ml de metil terbutil éter (MTBE) y 2 ml de ácido acético glacial; 2) la segunda con 80 ml de hexano, 20 ml de MTBE y 1 ml de ácido acético glacial; 3) la tercera con 100 ml de hexano. El tiempo de cada migración fue de 15 min y un tiempo de secado de la placa de 15 min entre cada migración. Las cámaras de TLC se dejaron saturando con la fase móvil 1 hora antes de su uso. La visualización se realizó sumergiendo la placa en una solución de 10% p/v de sulfato de cobre en 3% v/v de ácido fosfórico y calentando por 10 min en un horno a 150°C. Los lípidos fueron identificados por comparación con una solución estándar de cada uno de ellos en diferentes concentraciones (Borrull *et al.*, 2015).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1. Caracterización cinética de la cepa TT23 a 30°C

La evolución adaptativa en laboratorio (EAL) de la cepa de *S. cerevisiae* S288c a temperatura elevada de 40°C se realizó previo a este trabajo. Durante este proceso, que duró casi un año y generó cerca de 1200 generaciones, se aislaron 9 cepas de levadura tolerantes. Una de estas cepas fue la TT23, la cual mostró un mayor crecimiento y producción de etanol cuando se cultivó a 40°C (Caspeta *et al.*, 2019). Dado que esta cepa se utilizó, junto con la cepa S288c, como cepas parentales para el proceso de EAL descrito en este trabajo, el primer objetivo de éste fue realizar la caracterización de la cepa TT23 bajo condiciones óptimas de crecimiento ancestrales ($T = 30^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH} = 5.0$). Esta caracterización se utilizó como referencia para evaluar su tolerancia a elevadas concentraciones de ácido acético y pH ácido y proceder a la EAL en estas condiciones. Esta evaluación también se realizó para la cepa S288c, pero se reporta más adelante.

Los resultados del consumo de glucosa y producción de biomasa de las cepas S288c y TT23 cultivadas a 30°C y pH inicial de 5.0 en medio Delft se muestran en la Figura VIII-I. La cepa TT23 muestra un ligero aumento en su fase de adaptación al crecimiento (lag), el cual tuvo una duración de 4 horas aproximadamente, comparado con 2 horas observadas en la cepa S288c. También se observa que a la hora 12, ambas cepas se encontraban ya en fase estacionaria de crecimiento (figura VIII-I). Como se puede predecir observando la biomasa producida por ambas cepas, la cepa TT23 tiene un rendimiento menor de biomasa respecto a la glucosa consumida que la que se observa para la cepa parental. También se puede distinguir que el consumo de glucosa en la cepa TT23 es más lento, ya que está se agotó casi dos horas antes en la cepa S288c.

Del cálculo de los parámetros estequiométricos y cinéticos presentados en la tabla VIII-I se deriva que la cepa TT23 creció un 10% menos rápido que su parental. Sin embargo, esta disminución en la velocidad de crecimiento no se asoció a una disminución de la velocidad específica de consumo de glucosa (Q_s), la cual es un 9% mayor que la cepa S288c. Esto se asoció a una menor tasa de producción de etanol en la cepa TT23. Esta menor producción de etanol se vio también asociada a un mayor rendimiento de conversión de glucosa a glicerol (tabla VIII-I).

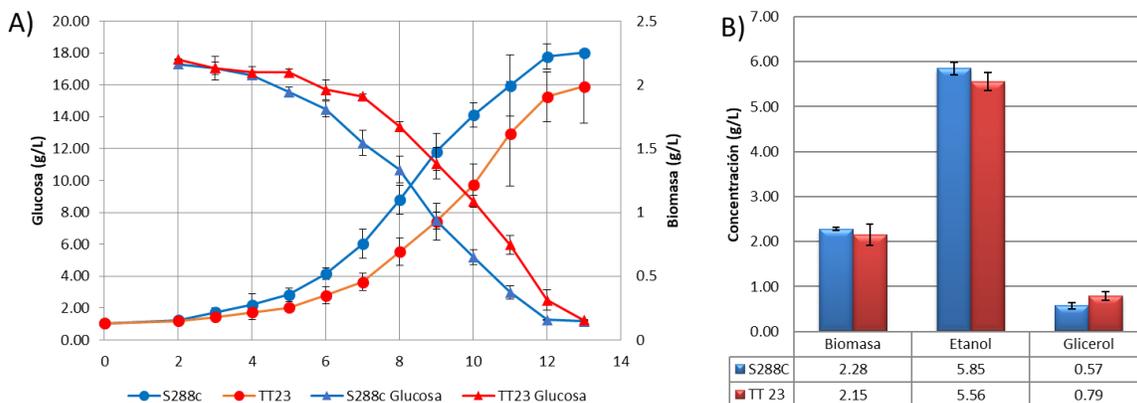


Figura VIII-I. Curvas de crecimiento y producción de metabolitos de fermentación de las cepas S288c y TT23.

A) Los cultivos se realizaron en medio Delft a 30 °C y los B) títulos finales de productos de fermentación se midieron a las 12 horas.

Tabla VIII-I. Parámetros cinéticos de las cepas S288c y TT23 cultivadas en medio Delft a 30°C y 200 rpm.

Cepa	S288c	TT23
μ (h ⁻¹)	0.32 ± 0.037	0.29 ± 0.012
Q_s (mmol/g _{PS} h)	14.32 ± 0.297	15.32 ± 2.078
Q_e (mmol/g _{PS} h)	17.25 ± 1.212	16.51 ± 0.057
Q_g (mmol/g _{PS} h)	0.76 ± 0.234	1.26 ± 0.485
$Y_{e/s}$ (g/g)	0.307 ± 0.058	0.28 ± 0.001
$Y_{g/s}$ (g/g)	0.03 ± 0.006	0.04 ± 0.016
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.12 ± 0.010	0.11 ± 0.018

Los resultados mostrados en esta sección sugerían que la cepa TT23 habría disminuido su capacidad de crecer a las condiciones óptimas ancestrales. Dicho comportamiento, conocido como “trade-off” se observa en poblaciones evolucionadas en condiciones adversas. Éste consiste en mejorar su capacidad de crecer en la condición de estrés mientras que su habilidad de crecer en la condición óptima ancestral disminuye a consecuencia de los cambios genéticos adquiridos durante la evolución. Para indagar más sobre las consecuencias de la evolución en la fisiología de la cepa TT23 se analizaron los perfiles transcripcionales de ésta en comparación con los de su cepa parental.

VIII.2. Análisis transcriptómico de la cepa termo tolerante TT23 a 30 °C

Es importante mencionar que parte de la estrategia evolutiva empleada por Caspeta (2019) fue extender el tiempo de evolución de 300 generaciones, empleado por Caspeta *et al.* (2014) a 1200 generaciones para evitar la presencia de duplicaciones cromosómicas (Figura VIII-II). Estas duplicaciones sirven como un método rápido de adaptación el cual consiste en aumentar el nivel de expresión de un mayor número de genes, muchos de los cuales pueden ser benéficos a las condiciones de estrés. Sin embargo, estas duplicaciones desaparecen después de periodos extendidos de evolución cuando aparecen modificaciones genéticas más específicas (Yona *et al.*, 2012).

En la figura VIII-II se muestra el perfil de expresión de genes de las cepas TT23 a lo largo de todos los cromosomas. De encontrarse duplicaciones cromosomales, éstas se verían como líneas continuas en un valor cercano a uno en el eje "Y", a lo largo de un cromosoma completo. Por lo tanto, de la figura se concluye que la cepa TT23 no presenta duplicaciones cromosomales y, por lo tanto, dicha cepa no presentaría inestabilidades al momento de cultivarse por periodos prolongados, por ejemplo, en los cultivos para producir etanol, los cuales pueden durar varios ciclos (varios días).

También se evaluaron los cambios en la expresión genética en las cepas TT23 y S288c cultivadas a 30 °C. Los cambios transcriptómicos más importantes que muestran las diferencias fisiológicas en las cepas evolucionada y parental se resumen en la figura VIII-III. En general, el análisis sugiere que la cepa TT23 aumentó su actividad glucolítica, lo cual también se intuye del consumo específico de glucosa reportado en la tabla VIII-I.

Específicamente, se encontró que los genes *tdh3* y *pyk2* que codifican para las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y piruvato quinasa están sobre expresados 1.53 y 1.5 veces respectivamente. Estas reacciones son de especial interés ya que en ellas se genera energía y poder oxidante.

También disminuyó el nivel de transcripción de genes que codifican para enzimas que participan en las reacciones reductivas y oxidativas de la vía de las pentosas fosfato y producción de glicerol respectivamente. Asimismo, se incrementó la transcripción de los genes *adh4* y *ald2*, que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de etanol y acetato (figura VIII-III). El incremento en los flujos de carbono a través de la glicólisis puede asociarse a la acidificación del citosol de las células. Lo anterior sugiere un

aumento en el transporte extracelular de iones H^+ . Además, también se detectó una regulación a la baja en la expresión de los genes que codifican para funciones de la cadena de transporte de electrones, el ciclo de Krebs y los genes que codifican a los transportadores que internalizan el piruvato a la mitocondria (*mpc1* y *mpc3*). Esta disminución de actividades mitocondriales supone dificultades para controlar gradientes intracelulares de protones y pH interno.

La posible acidificación del citosol de la cepa TT23, debido al aumento en la Q_s , se asocia al aumento en la expresión del gen *pma1* que codifica una ATPasa de membrana, cuya función es el mantenimiento del pH citosólico cercano a un valor de 7. Esto también concuerda con la regulación a la baja del gen que codifica para la chaperona Hsp30, ya que esta enzima es un regulador negativo de la actividad de Pma1.

El transporte de protones al exterior de la célula se asocia a un aumento en la acidificación del medio de cultivo, que, al final de las cinéticas, resultó en un valor de pH de 2.53 en el cultivo de la TT23, comparado con un pH de 2.66 de la cepa parental S288c. Sin embargo, un aumento en la actividad de esta bomba de protones implica un mayor gasto energético. Esto se debe a que su funcionamiento depende de la hidrólisis de ATP para exportar los protones. Se ha reportado que estos cambios confieren resistencia a altas temperaturas (Lam *et al.*, 2014; Meena *et al.*, 2011). No obstante, también provocan un compromiso con la energía de mantenimiento, la cual se incrementa causando una disminución de la μ cuando la cepa evolucionada se cultiva a 30 °C (Pampulha & Loureiro-Dias, 2000) (Tabla VIII-I).

Por otro lado, la sobre expresión 1.7 veces mayor del gen *adh4* en la cepa evolucionada, el cual codifica la enzima alcohol deshidrogenasa, sugiere un aumento en la producción de etanol. De manera similar, la disminución de 1.9 veces la expresión del gen *gpd1*, el cual codifica la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, sugeriría una disminución de la producción de glicerol. Sin embargo, los parámetros de velocidad específica de producción de estos 2 metabolitos, presentados en la tabla VIII-I nos muestran lo contrario. Esto puede ser debido a diferencias en regulaciones postraduccionales o de actividad catalítica.

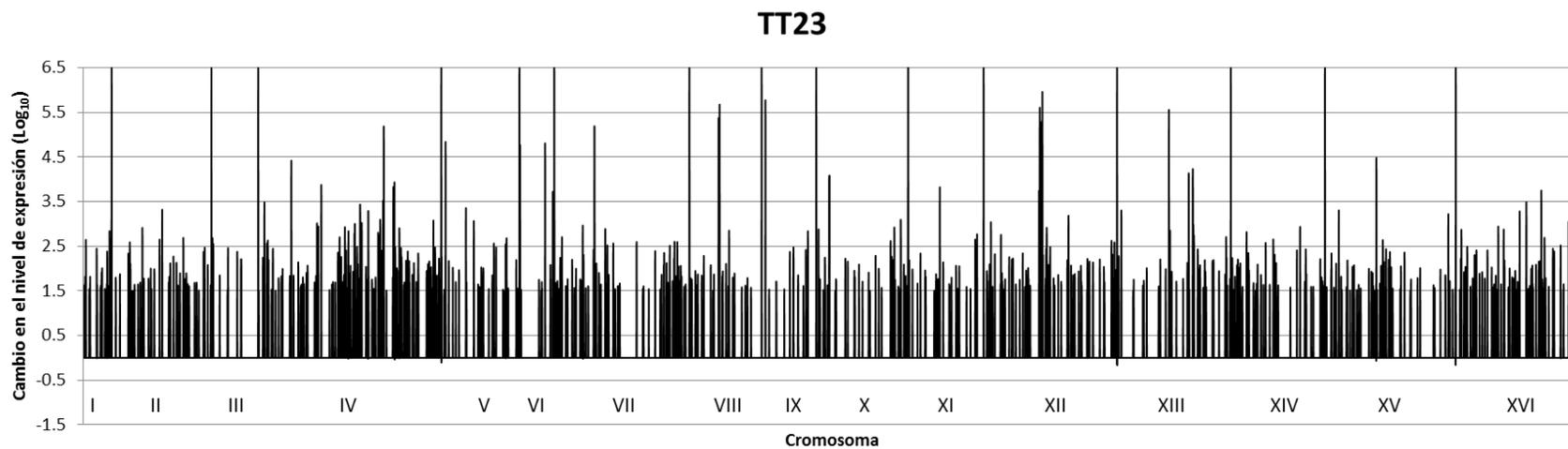


Figura VIII-II. Análisis de duplicaciones cromosómicas.

Las líneas paralelas al eje y que se extienden completamente dividen la expresión genética correspondiente a cada cromosoma. En el análisis de micro arreglos se observa que la cepa TT23 no tiene duplicaciones cromosómicas (ej. secciones con cambios continuos en la expresión de genes contiguos).

Las diferencias en la expresión genética y el metabolismo expuestas en los apartados anteriores son parte de la estrategia de *S. cerevisiae* para contender con elevadas temperaturas durante el periodo de evolución. Estos comprometen su desempeño cuando se cultivan a las condiciones óptimas ancestrales; por ejemplo, a 30 °C. Sin embargo, también podrían ser una ventaja para otras condiciones de estrés como la alta osmolaridad, ya que la acumulación de glicerol protege a las células de la deshidratación al regular la salida de agua intracelular. También, el aumento en expresión del gen *pma1* presupone una resistencia al pH ácido y a la presencia de ácidos orgánicos (ej. ácido acético) que se encuentren en su forma no disociada en el medio de cultivo.

VIII.3. Preadaptación de la cepa TT23 a otras condiciones estresantes.

La adaptación de cepas evolucionadas a otros estreses además de la condición de evolución del experimento de EAL se le llama preadaptación (Caspeta *et al.*, 2016; Mitchell *et al.*, 2009). En este estudio se encontró que la cepa TT23 produce 1.38 veces más glicerol que su cepa parental cuando se cultiva en medio Delft a 30 °C. Caspeta *et al.* (2019) demostraron que el aumento en la producción de glicerol genera mayor resistencia en medios de cultivo con altas concentraciones de glucosa y altas temperaturas. Por otro lado, la sobreexpresión de *pma1* afecta negativamente la producción de etanol en la cepa TT23 cuando se cultiva a 30 °C (Lam *et al.*, 2014), pero supone una preadaptación a pH ácido en presencia de ácidos orgánicos.

Para probar esta hipótesis se realizaron cultivos de las cepas S288c y TT23 en medio Delft con 2, 3 y 4 g/L de ácido acético a pH 3. Cuando ambas cepas se cultivaron en medio Delft con 2 g/L de ácido acético, se observó una disminución de su μ del 47% y 33%, respectivamente, comparado con una disminución del 75% y 70% cuando se cultivan con 3 g/L de ácido acético. También se observó que una concentración de 4 g/L de ácido acético ejerce una presión de estrés tan alta que no se observó crecimiento para ambas cepas. Por lo tanto, la concentración de ácido acético más alta a la que ambas cepas son capaces de crecer en medio mínimo a pH = 3 fue de 3 g/L (figura VIII-IV). Con estos cultivos observamos que el aumento en la concentración de ácido acético disminuye la capacidad de crecimiento, aunque en menor medida para la cepa TT23 comparado con su cepa parental (figura VIII-IV).

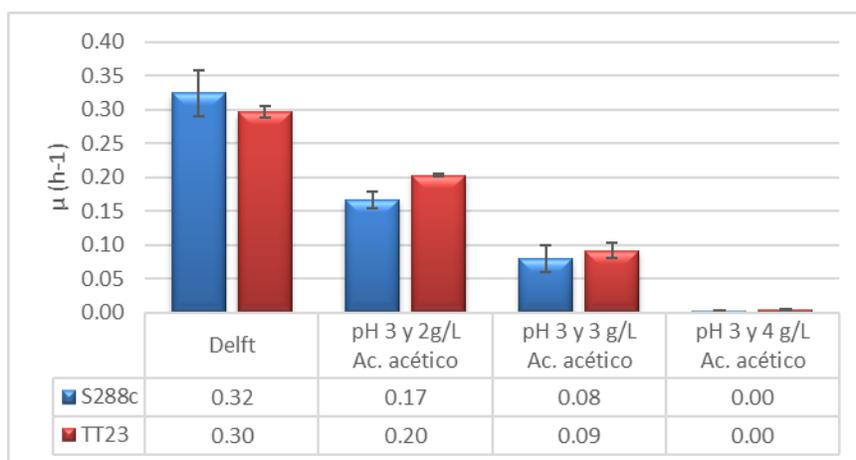


Figura VIII-IV. Velocidades de crecimiento de las cepas S288C y TT23 en cultivadas en medio Delft a pH 3 y concentraciones de ácido acético desde 0 g/L a 4 g/L.

Para confirmar la toxicidad del ácido acético a pH por debajo de su pKa, se cultivaron ambas cepas con 3 g/L de ácido acético a pH 3 y 6, así como ajustando el pH a 3 solamente (figura VIII-V). Con este experimento se observó que sólo la disminución del pH del medio de 5 a 3, redujo un 47% y 30% la μ en las cepas S288C y TT23 respectivamente, y que la presencia de ácido acético provocó un efecto tóxico aditivo a la disminución del pH a 3. Además, no se observaron cambios en la capacidad de crecimiento cuando ambas cepas se cultivaron en medio con 3 g/L de ácido acético a pH 6 (VIII-V). Esto indica que el ácido acético sólo tiene un efecto tóxico cuando se encuentra en su forma no disociada. También se comprueba la hipótesis de la preadaptación a pH ácido causado por la sobre expresión del gen *pma1* y la regulación a la baja de su represor Hsp30.

La preadaptación a pH ácido en presencia de ácido acético es algo deseable para mejorar el proceso de producción de bioetanol de segunda generación, por lo que la cepa TT23 se sometió a un experimento de EAL para potenciar esta característica ventajosa.

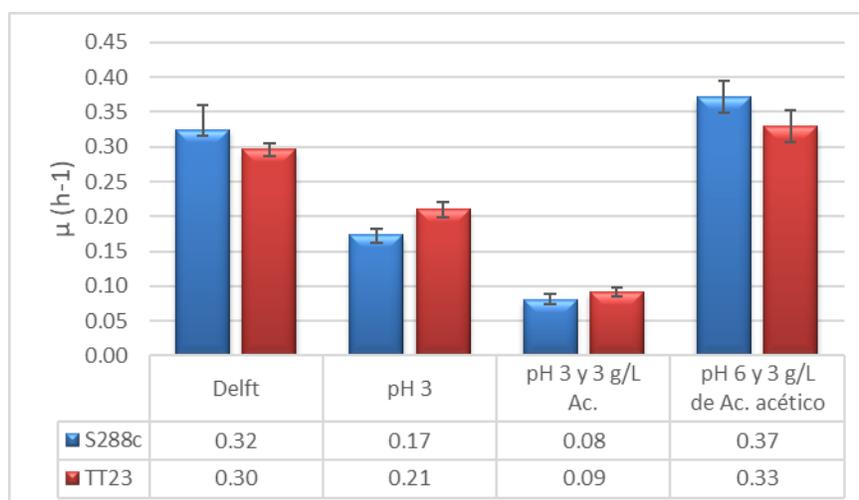


Figura VIII-V. Velocidad específica de crecimiento de las cepas S288c y TT23 en diferentes condiciones.

Las velocidades se calcularon de cinéticas en medio Delft a 30°C y 200 rpm por triplicado.

VIII.3. Experimento de EAL para la obtención de cepas de *S. cerevisiae* capaces de crecer a altas concentraciones de ácido acético y pH por debajo de su pKa

Las cepas S288c y TT23 se sometieron a un proceso de EAL donde las condiciones iniciales fueron 3 g/L de ácido acético, pH 3, 30°C y 200 rpm. Este proceso de evolución se realizó en medio mínimo Delft. Tras 100 generaciones aproximadamente, las poblaciones celulares de ambas cepas mostraron un incremento de 2.7 y 2.2 veces, respectivamente, en su μ en comparación con el inicio de la EAL (tabla VIII-II). En estudios anteriores se determinó que la tasa de mutación de una cepa de *S. cerevisiae* cuando se sometió a EAL a temperaturas de 40 °C fue de 2.5 mutaciones cada 100 generaciones, razón por la cual se midió su capacidad de crecimiento después de este número de generaciones, ya que después de este tiempo se esperan al menos dos mutaciones (Caspeta *et al.*, 2016).

Como parte de la estrategia de evolución, las poblaciones sometidas a EAL se evaluaron a concentraciones mayores de ácido acético cada 50 generaciones. Si las cepas eran capaces de crecer, las condiciones de EAL se cambiaban a condiciones más astringentes. Siguiendo este procedimiento, logramos aumentar la concentración de ácido acético a 4 y 5 g/L después de 150 y 50 generaciones respectivamente (figura VIII-VI).

Las poblaciones permanecieron aproximadamente 350 generaciones con una concentración de 5 g/L de ácido acético a pH 3 sin poder soportar concentraciones mayores. Se decidió incrementar el pH del medio de cultivo a 4 para disminuir el estrés por pH, pero conservando una relación elevada del ácido acético en su forma no disociada (figura VIII-VI). Con este ajuste de pH, las poblaciones celulares fueron capaces de crecer en presencia de hasta 12 g/L de ácido acético. Interesantemente, se observó un incremento en su μ después de permanecer 200 generaciones a estas condiciones (figura VIII-VI). Asimismo, observamos que durante los cultivos con ácido acético observamos precipitados celulares posiblemente por la formación de agregados celulares (estos datos no se muestran), probablemente a causa de dificultades en la separación de la célula madre e hija durante la citocinesis, ya que una mutación en *ace2*, el cual es un factor de transcripción que promueve la expresión de genes que codifican enzimas necesarias para la separación de la célula madre de la hija durante la citocinesis, fue la característica en común que se reportó para la resistencia al ácido en diferentes ensayos de EAL y en presencia de ácidos orgánicos (ácido láctico) y ácidos inorgánicos (HCl), así como también con diferentes fuentes de carbono (Fletcher *et al.*,2017).

Condiciones	S288 C (1)⁺	S288 C (2)⁺	S288 C (3)⁺	TT23 (1)⁺	TT23 (2)⁺	TT23 (3)⁺
Delft a pH 3 y 3 g/L de Ac. acético	0.08			0.09		
> 100 generaciones de EAL Delft a pH 3 y 3 g/L de Ac. acético	0.21	0.22	0.21	0.20	0.20	0.20

⁺Los números entre () indican el número de réplica de EAL para cada cepa.

En resumen, se realizaron tres aumentos en las condiciones estresantes del medio de cultivo durante la EAL con un promedio de 800 generaciones para todas las poblaciones celulares.

VIII.4 Selección de cepas evolucionadas resistentes a ácido acético y pH ácido.

Al final de la EAL, cuando las 6 poblaciones evolucionadas incrementaron en promedio un 15-10% su velocidad de crecimiento en 12 g/L de acetato y pH 4, se tomó una muestra de

cada población para inocular una caja de medio sólido conservando las mismas condiciones de evolución. De estas cajas se aislaron 3 colonias al azar, para un total de 18 cepas, nueve provenientes de la cepa S288c y nueve provenientes de la cepa TT23. Las primeras se denominaron Silvestre-Ácido Tolerantes (SAT); mientras que las segundas se denominaron Termo-Ácido Tolerantes (TAT), respectivamente. Posteriormente se realizaron cultivos en placas de 96 pozos a las mismas condiciones de la EAL para calcular su μ y seleccionar las que presentaran un valor mayor.

Los perfiles cinéticos de crecimiento de las 18 cepas cultivadas en placas de 96 pozos se muestran en la figura VIII-VII. De este experimento se aislaron 6 cepas, 3 provenientes de S288c y 3 provenientes de TT23, las cuales mostraron mayores velocidades de crecimiento.

Las 6 cepas seleccionadas se cultivaron en matraces de 125 mL con 20 mL de medio de cultivo Delft a las mismas condiciones de la evolución. Durante estos experimentos, la cepa SAT11 presentó dificultades para crecer por lo que decidimos descartarla. Los parámetros cinéticos y estequiométricos del cultivo de las 5 cepas restantes se presentan en la tabla VIII-III. Dado que las cepas SAT22 y TAT12 mostraron valores ligeramente superiores de tasa de crecimiento y de producción de etanol, se eligieron para realizar los experimentos que se muestran posteriormente. También observamos que las μ calculadas en estas cepas son menores a las calculadas en el último punto de la EAL (ver figura VIII-VI). Esto puede ser debido a que en la EAL se encuentra una población de células con diferentes genotipos y fenotipos, en el que al crecer en conjunto unas podrían mostrar velocidades de crecimiento mayores y que en promedio la velocidad de crecimiento poblacional sea superior.

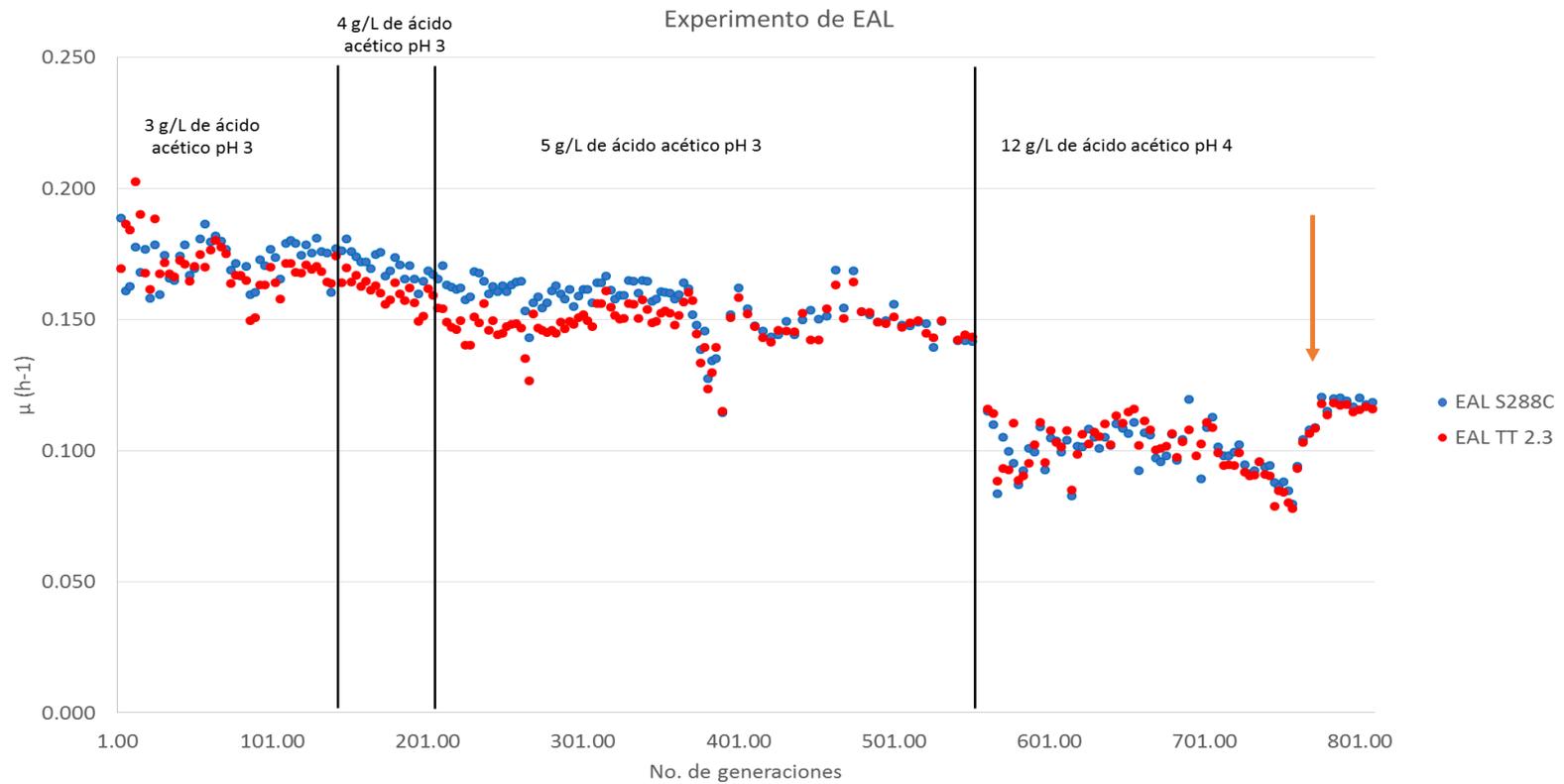


Figura VIII-VI. Experimento de EAL de las cepas S288C y TT 23.

En esta grafica se muestran los promedios de las μ de las tres poblaciones sometidas al experimento de EAL por cada cepa. Se marca con líneas negras los periodos en los que las poblaciones permanecieron en las mismas condiciones. La flecha roja indica un aumento notorio de la μ en las poblaciones evolucionando con 12 g/L de ácido acético.

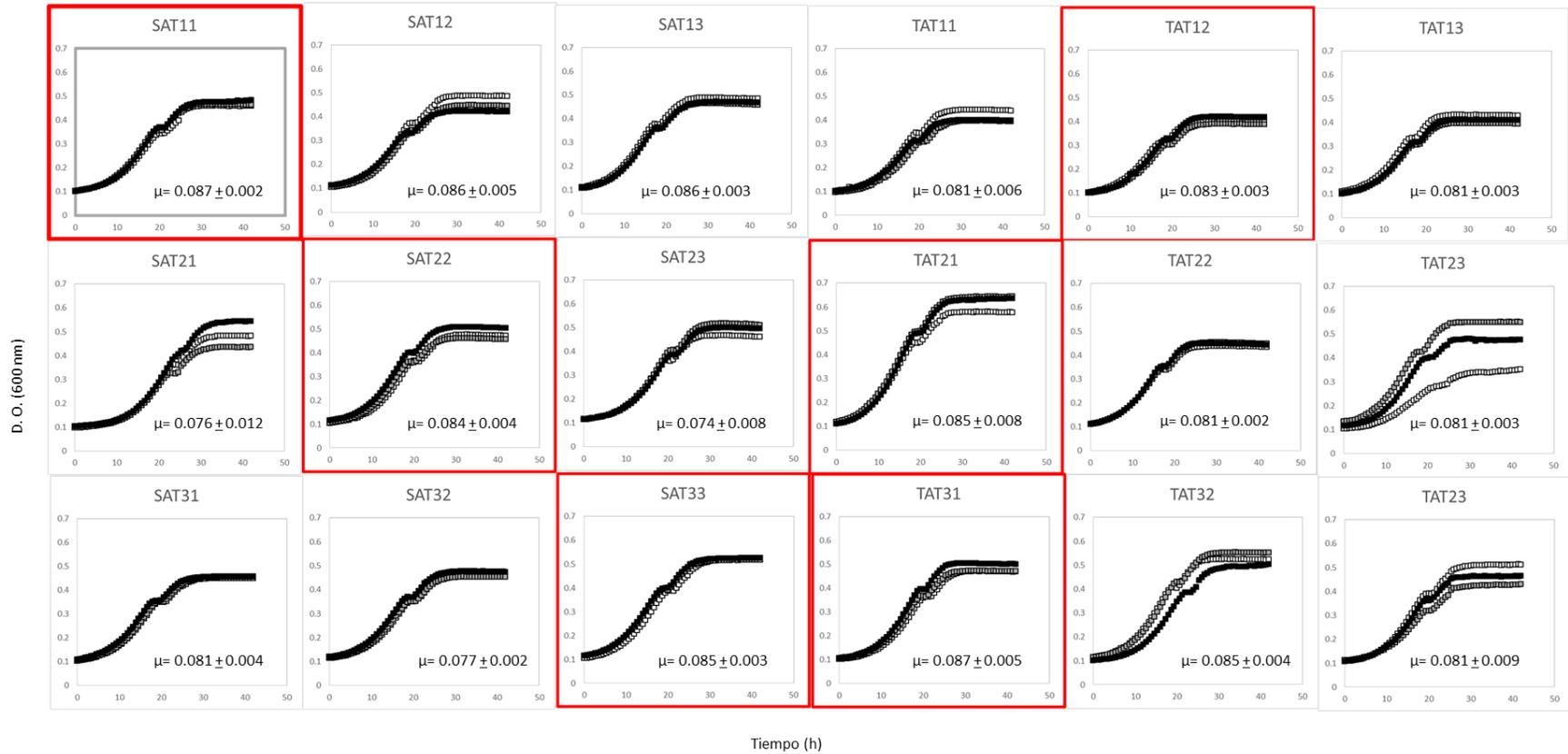


Figura VIII-VII. Cinéticas de crecimiento de las cepas aisladas del experimento de EAL.

Las primeras tres columnas del panel son las gráficas correspondientes a las cepas provenientes de la cepa silvestre S288C y las últimas tres de las provenientes de la cepa termo tolerantes TT23. En cada fila se pueden identificar las poblaciones provenientes de cada cepa parental. Los cultivos se realizaron en las mismas condiciones que la evolución. La μ de cada recuadro es el promedio de los tres cultivos graficados en el mismo. Las cinéticas marcadas con contorno rojo representan a las cepas evolucionadas que fueron seleccionadas por presentar las velocidades de crecimiento mayores.

Tabla VIII-III. Parámetros cinéticos de las cepas evolucionadas SAT y TAT en medio Delft con 12 g/L de ácido acético, pH 4, 30°C y 200 rpm.

Cepa	SAT 22	SAT 33	TAT 12	TAT 21	TAT 31
μ (h ⁻¹)	0.083 + 0.001	0.049 + 0.025	0.088 + 0.012	0.077 + 0.01	0.085 + 0.002
Q_s (mmol/g _{PS} h)	20.2 + 1.8	14.3 + 9.0	16.7 + 1.5	17.2 + 4.5	17.3 + 2.3
Q_e (mmol/g _{PS} h)	31.6 + 4.3	21.1 + 12.4	27.0 + 1.0	27.2 + 6.4	25.9 + 3.8
Q_g (mmol/g _{PS} h)	0.66 + 0.11	0.56 + 0.35	0.65 + 0.12	0.65 + 0.16	0.60 + 0.03
$Y_{e/s}$ (g/g)	0.40 + 0.02	0.38 + 0.02	0.42 + 0.05	0.41 + 0.01	0.38 + 0.01
$Y_{g/s}$ (g/g)	0.017 + 0.001	0.020 + 0.000	0.020 + 0.002	0.019 + 0.000	0.018 + 0.003
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.023 + 0.002	0.020 + 0.003	0.029 + 0.001	0.026 + 0.010	0.027 + 0.004

A pesar de que los valores de μ y rendimiento de biomasa con respecto a sustrato de las cepas evolucionadas fueron bajos (0.08-0.09 1/h, comparado con 0.33 1/h de S288c), éstas presentan valores superiores de rendimiento de etanol con respecto a la glucosa. Esto también se reflejó en los títulos máximos de etanol después de 12 h; los cuales son aproximadamente 10 g/L, casi el doble de lo que produce la cepa parental S288C en condiciones sin estrés (figura VIII-VIII). La baja generación de biomasa puede ser una desventaja para el proceso de producción de bioetanol, ya que se requieren altas concentraciones iniciales de inóculo para iniciar los procesos de producción industrial de etanol. Por otro lado, también observamos que, a pesar de la poca biomasa generada durante el crecimiento a condiciones estresantes, las cepas SAT22 y TAT12 aumentaron su velocidad de consumo de glucosa comparado con las condiciones sin estrés de las cepas S288c y TT23 (tablas VIII-I y VIII-III). Estas características pueden ser debido a la alta demanda energética requerida para el mantenimiento del pH interno en las condiciones de estrés por pH, la cual se obtiene por actividad glucolítica y producción de etanol.

VIII.5 Caracterización cinética de las cepas SAT22 y TAT12 a 30 °C

Las cepas SAT12 y TAT12 se evaluaron en las condiciones óptimas ancestrales (ej. pH 5.0 y temperatura de 30 °C). Las cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa para las cepas evolucionadas y parentales se muestran en la figura VIII-IX. En esta caracterización observamos que la cepa SAT22 tiene un comportamiento cinético similar al de su cepa parental S288c (descrito anteriormente), con los mismos tiempos de duración en las fases de adaptación y exponencial respectivamente. También, su consumo de glucosa y producción de etanol son similares, mientras que la cepa TAT12 difiere su comportamiento cinético con el de su cepa parental TT23, por ejemplo, su fase de

adaptación dura una hora menos y su fase exponencial concluye dos horas más tarde. También se observa que el consumo de glucosa es mayor para la cepa TAT12 comparado con el de su cepa parental TT23, ya que ésta se termina una hora antes. La fase exponencial de la cepa TAT12 dura dos horas más que la fase exponencial de las demás cepas, lo que le permite acumular mayor cantidad de biomasa después de 11 horas y por consiguiente tener un rendimiento mayor de biomasa por glucosa consumida (figura VIII-IX).

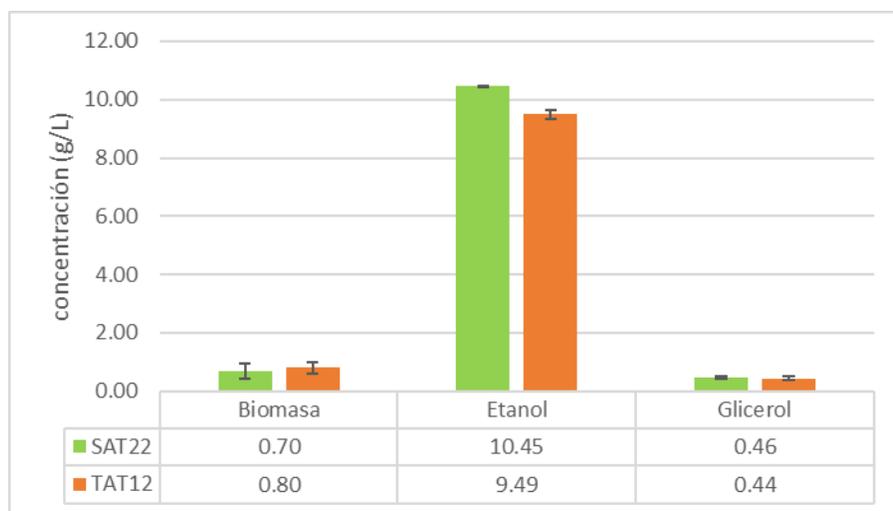


Figura VIII-VIII. Títulos máximos de biomasa etanol y glicerol a las 12 horas de las cepas SAT 22 y TAT 12 en medio Delft con 12 g/L de ácido acético a pH 4.

Del cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos presentados en la tabla VIII-IV se observa que la velocidad de crecimiento de la cepa SAT22 no cambió con respecto a su cepa parental S288c cuando se cultivó en condiciones ancestrales (30°C y pH 5). Tampoco se observan cambios notorios en cuanto al consumo de glucosa y productividad de etanol. Interesantemente la cepa TAT12 aumentó casi 15% su capacidad de crecimiento con respecto a su parental TT23, incluso hasta igualar la velocidad de crecimiento de la cepa S288c en las mismas condiciones de cultivo. El aumento en el rendimiento de biomasa por glucosa consumida no se asoció a un aumento en el rendimiento producción de glicerol por glucosa consumida ni en la velocidad de consumo de glucosa.

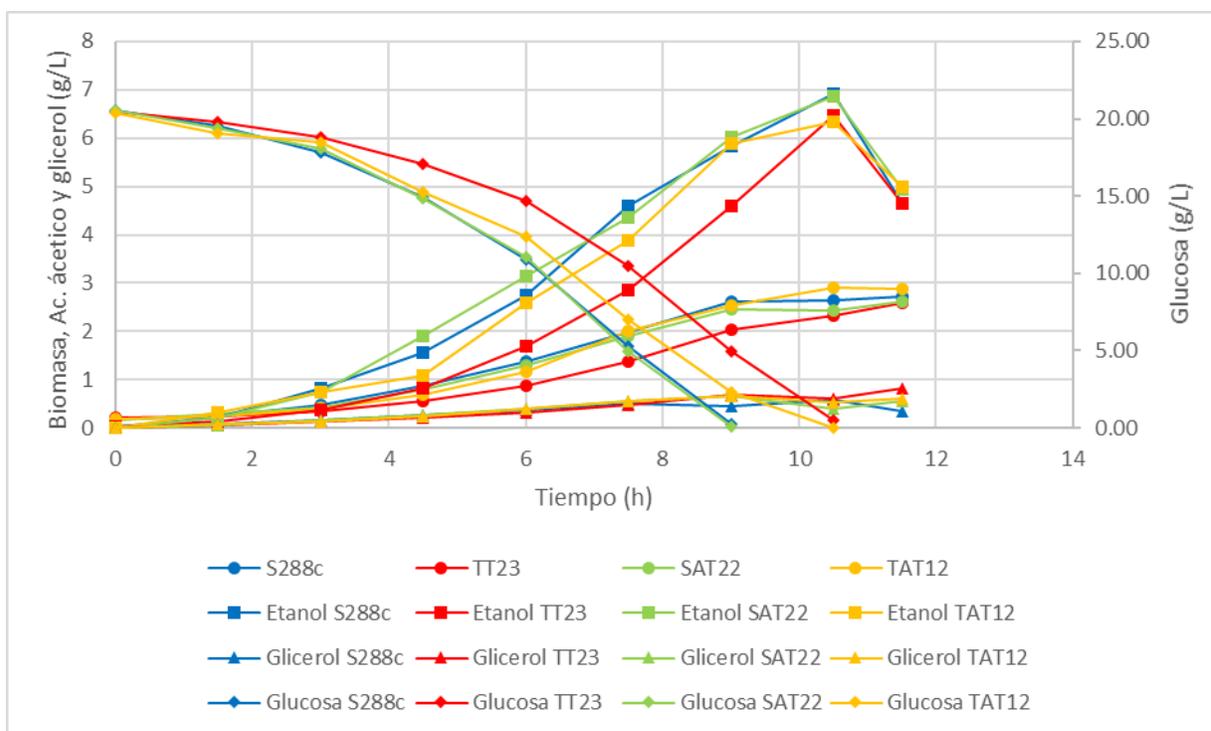


Figura VIII-IX. Cinéticas de crecimiento de las cepas S288C, TT23, SAT22 y TAT12.

Los cultivos se realizaron en medio Delft a 30 °C y pH 5. En la gráfica se muestra la biomasa generada, glicerol y etanol producidos. Así como también la glucosa consumida en el tiempo de fermentación.

La cepa ácido tolerantes SAT22 parece no tener “trade-off” cuando se cultiva en condiciones óptimas ancestrales después del proceso de EAL, ya que no se ve disminuida su velocidad de crecimiento ni su productividad de etanol con respecto a su parental S288c. Incluso parece estar pre adaptada a condiciones de alta osmolaridad, ya que se observa un aumento del 18% en su productividad de glicerol.

Tabla VIII-IV. Parámetros cinéticos de las cepas S288C, TT23, SAT22 y TAT12 cultivadas en medio Delft a 30 ° C y 200 rpm sin ácido acético y a pH 5.0.				
Cepa	S288c	SAT22	TT23	TAT12
μ (h⁻¹)	0.33	0.33	0.29	0.33
Qs (mmol/gPS h)	15.15	15.97	13.04	12.99
Qe (mmol/gPS h)	17.66	18.15	15.44	15.05
Qg (mmol/gPS h)	0.94	1.11	1.05	1.04
Ye/s	0.30	0.29	0.30	0.30
Yg/s	0.03	0.04	0.04	0.04
Yx/s	0.12	0.11	0.12	0.14

*Notas: Los parámetros cinéticos y estequiométricos se calcularon en un solo cultivo.

La EAL para la resistencia a pH ácido y altas concentraciones de ácido acético (segunda evolución) permitió que la cepa TAT12 recuperara la velocidad de crecimiento que había sido afectada durante la EAL para la resistencia a altas temperaturas (primera evolución). Sin embargo, los cambios adquiridos durante la primera evolución no le permitieron recuperar la productividad de etanol, que como ya observamos, no se ve afectada en la resistencia a pH ácido y altas concentraciones de ácido acético como se demostró para la cepa SAT22. Pero si se afecta durante la evolución para la resistencia a altas temperaturas para el caso de la cepa TT23. Para entender los cambios moleculares que surgieron durante la evolución a pH ácido en presencia de ácido acético, se analizaron los perfiles de expresión genética de las cepas SAT22 y TAT12 y sus cepas parentales S288c y TT23, respectivamente (ver Metodología). Así como el perfil de expresión genética de la doble evolucionada TAT12 con respecto a la cepa silvestre S288c.

VIII.6 Análisis transcriptómico de las cepas ácido-tolerantes obtenidas por evolución

VIII.6.1 Análisis Global

El análisis transcriptómico se realizó en muestras de biomasa obtenidas de la fase exponencial de cultivos realizados a pH 5.0 y sin ácido acético (ver Metodología). En la Tabla VIII-V se describen los datos más relevantes respecto a los cambios en la expresión global de genes entre las cepas evolucionadas y las cepas parentales. Los cambios menores o mayores a 1.5 en la expresión genética fueron superiores en número en la cepa TAT12 con relación a sus parentales. Las cepas S288c y TT23 (~10% mayor cantidad de genes respecto a la SAT22 y su cepa parental). De estos genes, la cepa SAT22 incrementó su expresión en un 50 % respecto a la SAT22 (393 y 257, respectivamente), mientras que la cepa SAT22, en comparación con la TAT12, mostró un 20% más de genes con expresión disminuida (440 y 375, respectivamente). El incremento en la cantidad de genes con cambios en su expresión observado en la TAT12 sugiere que esta cepa contiene un mayor número de mutaciones, las cuales se acumularon durante la doble evolución a la que fue sometida; primero en termo tolerancia usando la cepa S288c y obteniéndose la cepa TT23 (Caspeta *et al.*, 2019), después la cepa TT23 fue evolucionada en pH ácido y elevada concentración de ácido acético (este trabajo).

Cuando se comparan los cambios menores o mayores a 2.0, la cepa SAT22 mostró un incremento de más del doble respecto a la cepa TAT22 y su parental (664 y 291, respectivamente), aunque los cambios observados entre la cepa SAT22 y TAT12 fueron sólo de 268. Lo anterior sugiere que muchos de los cambios en la cepa SAT22 respecto a su parental, la S288c, ya están activados en la cepa TT23 y se conservan durante la evolución que dio origen a la cepa TAT12. Estos resultados sugieren nuevamente que muchos de los cambios genéticos ocurridos en la cepa TT23 fueron conservados durante la evolución de TAT12.

Tabla VIII-V. Número de cambios transcripcionales entre las cepas S288c, TT23, SAT22 y TAT12

	Down<-2.0	Down<-1.5	Up>2.0	Up>1.5	Total (<>1.5)	Total (<>2.0)
S288cvsSAT22	214	440	61	257	697	664
S288cvsTAT12	103	356	145	393	749	248
TT23vsTAT12	124	375	167	385	760	291
SAT22vsTAT12	74	246	194	441	687	268
S288cvsTT23	165	357	126	329	686	291

VIII.6.2 Análisis de duplicaciones cromosomales

La evolución adaptativa de *S. cerevisiae* conlleva la duplicación de cromosomas completos o secciones de ellos. Esto es una solución rápida pero temporal al estrés causado por la perturbación permanente a la que es sometida durante la evolución. Para evaluar si existen cambios en la estructura cromosomal de las cepas evolucionadas, se realizó un análisis de expresión de los genes que incrementaron su transcripción más de dos veces. En la figura VIII-X, se muestran estos cambios en las cepas SAT22 y TAT12 a lo largo de los 16 cromosomas. Los resultados muestran que ninguna de las dos cepas evolucionadas presenta cambios en la estructura cromosomal, ya que no se ve ningún cambio “hacia arriba” en la expresión en genes subsecuentes en secciones continuas de los cromosomas. Por lo anterior, se puede concluir que ninguna de las dos cepas presentaría inestabilidad, por ejemplo, al cultivarse por periodos prolongados de tiempo, los cuales son comunes en los procesos de producción de etanol.

VIII.6.3 análisis sistemático de la expresión genética

En esta sección se describen los resultados de los cambios sistemáticos en la transcripción de las cepas evolucionadas en pH ácido y elevada concentración de ácido acético. Como referencia se toman los resultados de los cambios en la expresión genética de TT23 respecto a S288c – recordar que la cepa TT23 es la parental de TAT12.

Del análisis global descrito en la sección VIII.6.1, este análisis se centra en la colección de genes descrita en las figuras VIII-XI y VIII.XII. Dicha colección incluye genes relacionados a la homeostasis a pH ácido y elevada concentración de ácido acético, así como los relacionados al metabolismo de glucosa y la respuesta a estrés general.

Observamos cambios en los genes que dan lugar a los transportadores de hexosas. Estos genes pertenecen a la familia *hxt*, siendo los genes *hxt 1* y *3* los transportadores de glucosa de baja afinidad y *hxt 6* y *7* los de alta afinidad (Dickinson & Schweiser, 2004). Encontramos que estos genes de alta afinidad se encuentran disminuidos en la cepa TT23 cuando se compara con la cepa S288c. No encontramos cambios para el caso de la cepa SAT22 con respecto a la cepa S288c. Un ligero aumento de estos para la cepa TAT12 con respecto a la cepa S288c se puede asociar a un aumento en el rendimiento de biomasa por sustrato consumido. Para estos mismos genes, cuando se comparan las cepas TT23 y TAT12, se puede observar que se encuentran sobreexpresados, probablemente esta sea la razón de que la cepa TAT12 crezca a mayores velocidades que la cepa TT23 (VIII-XI).

También encontramos que todas las cepas presentaron una sobreexpresión de genes involucrados en el mantenimiento del pH interno a condiciones óptimas ancestrales. Como lo son *pma1* y *vma1*, que se encargan de bombear protones fuera de la célula y dentro de la vacuola respectivamente (ver figura VIII-XI), reduciendo la cantidad de protones presentes en el citosol (Geng *et al.*, 2017). Sin embargo, la cepa termotolerantes TT23 presentó una mayor actividad de Pma1 (como se mencionó anteriormente), ya que también se encuentra sub expresado su regulador negativo *hsp30*.

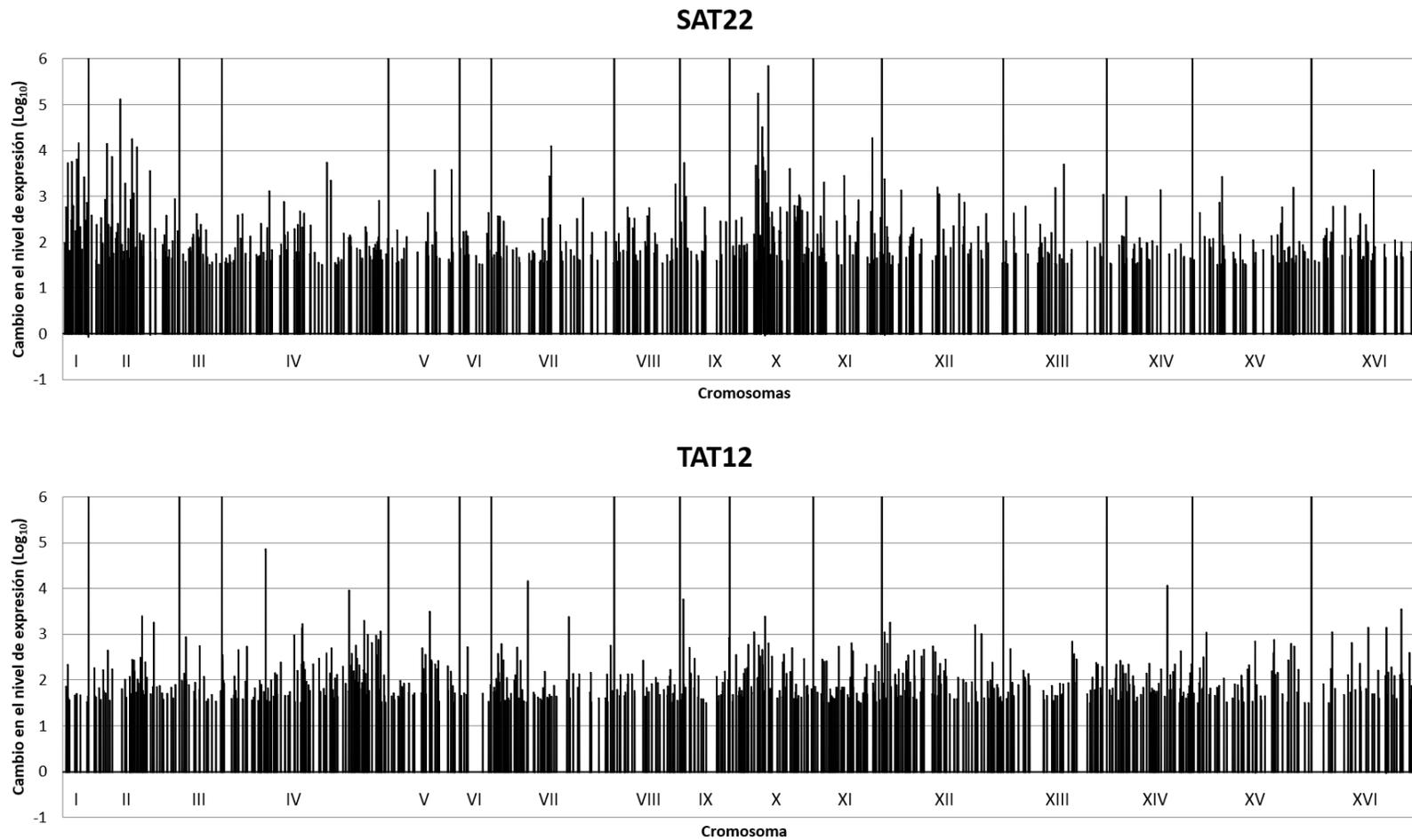


Figura VIII-X. Análisis de duplicaciones cromosómicas de las cepas SAT22 y TAT12.

Análisis de duplicaciones cromosómicas de las cepas SAT 22 y TAT 12 por micro arreglos. El final de los cromosomas se encuentra separado por una línea recta que indica el inicio del siguiente.

Por otro lado, también encontramos que el factor general de estrés *msn4* se encuentra sobre expresado 0.5 veces (50% más que su parental) en la cepa SAT22, lo que puede relacionarse con un ligero incremento de expresión de los genes *tps1* y *tps2* que codifican para las enzimas trehalosa-6-fostato sintetasa y trehalosa-6-fostato fosfatasa, respectivamente, que participan en la síntesis de trehalosa y ayudan a combatir el estrés por choque térmico. También se encontró un aumento de 1.3 veces en la sobreexpresión de *hsf1* en la cepa TAT12, que sobreexpresan las chaperonas moleculares *hsp104* y la familia Hsp70 y ayudan a combatir el estrés por choque térmico (figura VIII-XI).

Interesantemente estos dos FT (*msn4* y *hsf1*) inducen la expresión de *hsp30* que a su vez es un regulador negativo de *pma1* y *pma1* regula negativamente a *hsf1* a 30 °C. A pesar de este círculo de represiones, estos tres componentes se encuentran sobre expresados en las cepas SAT22 y TAT12 (Verghese *et al.*, 2012). Esto sugiere que durante la evolución para la resistencia a pH ácido en presencia de ácido acético, se requiere que las funciones relacionadas con el mantenimiento del pH, gasto energético y estabilidad proteica se encuentren activas al mismo tiempo y probablemente su regulación se vuelva más fina, ya que Hsp30 se requiere para contender contra la desnaturalización proteica por altas temperaturas o pH ácido y para controlar el gasto energético ejercido por Pma1 durante estas mismas condiciones de estrés.

Debido a la sobreexpresión de chaperonas moleculares, en nuestro análisis de transcritos también encontramos una preadaptación a altas temperaturas cuando se cultiva en medio mínimo sin estrés, ya que se observa sobreexpresión de genes involucrados a la termotolerancia, como lo muestra el análisis de transcritos de la cepa SAT22 comparado con el de su cepa parental S288c (figura VIII-XI, columna 2). Curiosamente el transcriptoma de la cepa TT23 no sugiere un metabolismo adaptado a altas temperaturas e incluso los genes involucrados en el choque térmico se encuentran regulado negativamente (figura VIII-XI, columna 1). No obstante, el perfil de expresión genética de la cepa TAT12 sugiere esta preadaptación más marcada (figura VIII-XI, columna 3) y aún más cuando se compara con el de la cepa TT23 (figura VIII-XI, columna 4).

Esta preadaptación demuestra nuevamente la estabilidad genética de la cepa TT23, ya que los cambios que surgieron durante la EAL dirigida a la resistencia a altas temperaturas provocaron que durante la segunda EAL dirigida a la resistencia al ácido tomara un camino evolutivo diferente al de la cepa SAT 22 (figura VIII-XI, columna 5).

S288c vs TT23	S288c vs SAT22	S288c vs TAT12	TT23 vs TAT12	SAT22 vs TAT12	Genes
-0.6	-0.5	0.4	0.7	0.7	HXT2
		-0.3	-0.3	1.7	HXT1
-2.5		-0.7	2.1	4.8	HXT3
1.0	0.3	0.4		-0.4	HXT10
-3.9		0.9	2.6	6.0	HXT7
	0.6			0.9	HXT5
-0.8	-1.6	-1.7	-0.7	-0.6	HXT8
-0.7		-0.8	-1.3	-1.2	HXT17
0.5	0.7	0.3	-0.4	-0.6	HXT11
	0.3	-0.4	-1.3	-1.4	HXT9
-1.8		0.6	1.2	3.7	HXT6
	0.3	-0.3	0.6	-1.3	HXT16
-2.9		-0.6	2.5	2.4	HXT4
-0.8		0.8	1.2	3.6	HXT15
-0.4			0.5	0.8	HXT12
-1.2	-1.5		1.0	0.9	HXT14
-1.5		-0.8	0.4	1.9	HXT13
0.3		2.1	2.3	0.8	BTN2
2.6	1.8	2.2	0.8	2.0	PMA1
		0.6	0.8	0.7	PMA2
0.3	0.3	2.3	1.2	1.9	VMA1
0.3	0.3	1.7	3.1	0.9	VMA2
-0.3	0.5	1.0	1.9	2.1	AHA1
-2.5	0.7	0.8	1.7	1.1	HSP82
-2.4	0.5	1.1	2.5	2.6	HSP30
-2.7	-0.9	2.4	4.6	3.0	HSP26
-1.2	0.4	2.5	2.9	1.6	HSP78
	-0.8	1.2	1.2	2.6	HSP12
0.5		1.4	1.4		HCH1
-0.4	1.0		0.3	0.3	HMS2
1.3	-0.8	1.6	1.8	0.5	KAR2
0.8	0.9	2.4	1.2	0.5	NMA111
-1.8	1.1	-1.7	1.2	2.0	STE20
0.9	-0.6		2.2	-0.3	STE11
-1.6		0.9	2.9	1.6	SSA1
	-0.7	1.9	1.7	1.2	SSA2
-1.1	-0.9	0.5	2.3	1.6	SSA3
-1.5	0.3	1.9	3.8	1.6	SSA4
-0.8	0.4	1.9	1.7		SFL1
	0.5	0.7	1.0	1.2	TPS2
0.7	-0.3	1.9	2.1	2.5	HSC82
-1.6	-1.3	3.3	3.3	2.1	HSP104
-2.4	-2.4	-1.0	0.7	1.4	PGM1
-1.7		1.7	2.3	1.8	PGM2
	-0.9	1.2	1.5	0.9	TPS3
0.9	1.2	1.6	1.1	2.7	TSL1
-0.9	1.0				TPS1
	0.5	0.7	1.0	1.2	TPS2
-1.4	0.6	0.9	0.4	1.0	UGP1
-0.9	0.6		0.3	0.8	NTH1
	-0.6	-0.3	-0.6		NTH2
-1.1		-0.7	0.5	0.3	MSN2
-0.9	0.5		-1.1	0.7	MSN4
-1.1	0.6	1.3	0.3		HSF1

Transportadores de hexosas

Mantenimiento de pH citosólico

Chaperonas moleculares

Síntesis de trehalosa

Factores de transcripción

Cambio en los niveles de transcripción



Figura VIII-XI. Tabla comparativa de expresión génica I.
 En la tabla se muestra el cambio de expresión en número de veces.

S288c vs TT23	S288c vs SAT22	S288c vs TAT12	TT23 vs TAT12	SAT22 vs TAT12	Genes
0.7	1.4			2.2	PGK1
-0.7	0.9	0.8	1.3	0.6	CDC19
-1.2			0.9	0.7	EMI2
1.4	1.0	1.7	0.9	0.8	ENO2
1.4		1.6	1.5	1.0	ENO1
0.5		0.6	-0.6	0.6	FBA1
	-1.3	1.1	2.9	2.7	GLK1
0.6	-0.4	1.5	1.1	1.7	GPM1
1.0	1.0			0.6	HXK2
-3.7		0.8	2.8	2.7	HXK1
	0.5	1.0	0.7	-0.4	PFK2
0.8		-0.3	0.7	-0.4	PFK1
	0.8	1.0	1.6	1.4	PGI1
1.5	0.6	1.1	-0.6	-1.4	PYK2
1.5	0.6		1.3	1.1	TDH3
1.3	0.3		0.9	0.9	TDH2
1.2	-0.3	1.1	1.3	1.7	TDH1
	-0.7	1.0	0.4	0.9	TPI1
	0.9	-1.1	0.5	-0.5	YLR446W
-2.1		-1.1	0.6	2.0	MPC1
-1.4	-0.4		0.5	0.9	MPC3
-0.7	0.3	1.1	2.9	2.7	COB
-0.7	0.6	0.3	1.1	1.7	CYC1
	-0.3	-0.8		0.6	CYC7
0.3			2.8	2.7	CYT1
0.3	-0.7	0.3	0.3	-0.3	QCR2
-1.7	0.2	-0.5	0.7	-0.4	RIP1
0.3	-0.3	0.8	1.6	1.4	QCR8
-2.3	-1.7	-1.5	-0.6	-1.4	QCR9
-0.7	0.8	-1.0	1.3	1.1	QCR7
-0.7		-0.9	0.9	0.9	QCR6
-2.3	1.8	1.2	1.3	1.7	QCR10
-0.7	0.6	0.3	0.4	0.9	CYC1
	-0.3	-0.8	0.5	-0.5	CYC7
-1.0	0.7	-1.0	1.3	0.5	COX4
0.3	0.7	-0.5	0.3	0.3	COX5A
-2.2	1.3	-0.7		1.3	COX7
0.4	0.3		1.4	1.1	COX6
-0.8	-1.7	1.5	1.6	0.9	COX8
					COX2
-1.2	1.2	0.8	2.1	0.8	COX1
-1.0	-0.5	-1.1	0.4	0.6	COX9
-1.9	-0.5	0.4	-1.5	-0.7	COX3
0.9	-1.9	0.1	0.9	-0.4	COX13
	0.5		-0.4	-1.0	COX5B
-1.3	0.3	-2.1	-0.9	0.8	MTC3
	-1.2	-0.3			AI3
-1.1	-1.1	1.2	1.5	0.3	AI4
					AI5_ALPHA

Cambio en los niveles de transcripción



Figura VIII-XII. Tabla comparativa de expresión génica II.

En la tabla se muestra el cambio de expresión en número de veces.

Por otro lado, observamos que en la cepa SAT22 no se afectaron los transportadores de piruvato *mpc1/2* como en la cepa TT23, sin embargo, si se encontró un aumento de expresión en genes que sintetizan enzimas involucradas en a la glucólisis. Esto sugiere que la cepa SAT22 genera energía principalmente por esta vía. A pesar de esto si se observó disminución de la expresión en algunos genes que dan lugar a enzimas involucradas en la respiración. Interesantemente no se encontraron cambios en la expresión del importador de piruvato a la mitocondria *mpc3* en la cepa TAT12 cuando se compara con la cepa S288c. Esto sugiere que durante la segunda evolución se recuperó esta actividad que durante la primera evolución se había afectado. También se encontró aumento en la actividad de transporte de electrones cuando se compara con la cepa TT23 (figura VIII-XII, columna 4). Esto se puede asociar en un aumento en los rendimientos de biomasa por sustrato consumido comprado con TT23 como se calculó en la tabla VIII-IV.

V. Análisis de lípidos de membrana por TLC

Se realizó un análisis cualitativo de la composición de lípidos de membrana por TLC para saber si surgió algún cambio importante en éstos, utilizado solo dos controles: el ergosterol y el escualeno. Estos dos compuestos indican el primero y el último de los componentes mayoritarios observados en el método que se utilizó como referencia (Borrull *et al.*, 2015).

Con este ensayo no se encontró ninguna diferencia entre las cepas evaluadas, por lo que se requiere de otro método de análisis cualitativo como lo es la cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-MS). Aunque no se esperaban diferencias en abundancia de lípidos o esteroides, si podemos encontrar diferencias en el uso de esteroides como en el caso reportado por Caspeta *et al.* (2014).

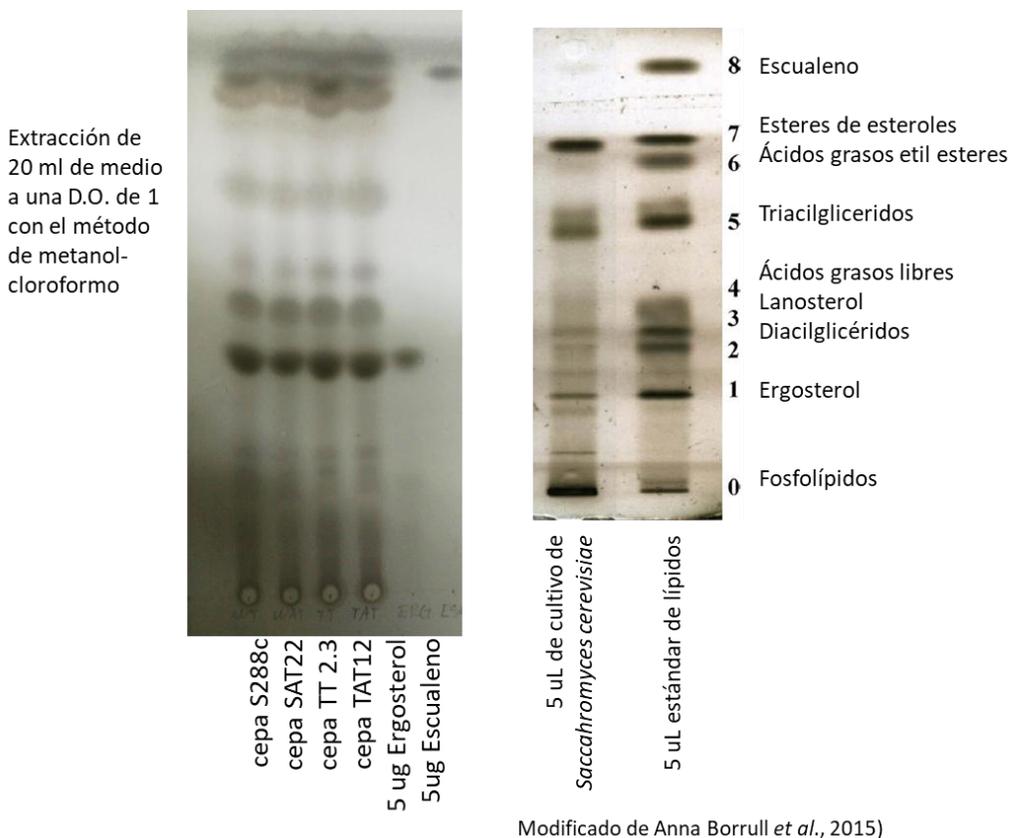


Figura VIII-XIII. TLC de lípidos de membrana de las cepas S288c, TT23, SAT22 y TAT12.

CONCLUSIONES

El cultivo de las cepas evolucionadas SAT22 y TAT12 en medio Delft a pH ácido con 12 g/L de ácido acético afecta negativamente su capacidad de crecimiento. Sin embargo, la alta demanda energética para el mantenimiento del pH interno, obligan a las células a consumir glucosa a altas velocidades y generar grandes cantidades de etanol para su supervivencia.

La EAL para la resistencia a pH ácido y concentraciones elevadas de ácido acético no generan “trade-off” cuando se cultivan en condiciones óptimas ancestrales (30°C y pH 5) como se demostró para la cepa SAT22.

La EAL para la resistencia a pH ácido y altas concentraciones de ácido acético permitió que la cepa TAT12 recuperara la velocidad de crecimiento cuando se cultivó en condiciones óptimas ancestrales que había sido afectada durante la EAL para la resistencia a altas temperaturas como se observó para la cepa TT23. Esto a través de la

recuperación de actividades mitocondriales como el transporte de electrones. Sin embargo, los cambios adquiridos durante la EAL a altas temperaturas no le permitieron recuperar la productividad de etanol, ya que la EAL al ácido parece no afectar estas vías metabólicas como se demostró para la cepa SAT22.

El análisis transcriptómico de cepas evolucionadas crecidas en condiciones óptimas ancestrales nos permiten realizar comparaciones fisiológicas con las cepas silvestres que muchas veces no son capaces de crecer en condiciones de evolución.

El diseño de un experimento de EAL con tiempos extendidos de evolución mayores a 800 generaciones nos permitió seleccionar cepas evolucionadas que no presentaron duplicaciones cromosómicas y que por lo tanto son genéticamente estables.

PERSPECTIVAS

- Realizar cultivos de las cepas SAT22 y TAT12 a 40 °C para verificar si la preadaptación a altas temperaturas observada en sus transcritos se mantiene a estas condiciones. De ser así, veríamos una capacidad mejorada de crecer a esta temperatura comparada con la cepa S288c.
- Realizar cultivos de la cepa TAT12 a 40 °C y en presencia de ácido acético a pH ácido para confirmar que los cambios realizados durante las dos EAL se conservan y comparar su crecimiento con el de las cepas S288c, TT23 y SAT22.
- Secuenciar el genoma completo de las cepas S288c, TT23, SAT22 y TAT12 para saber que mutaciones se generaron durante la evolución a altas temperaturas (en la cepa TT23), cuáles durante la evolución a pH ácido (en la cepa SAT22) y cuáles durante estas dos condiciones estresantes consecutivas (en la cepa TAT12).
- De las mutaciones encontradas por secuenciación del genoma completo de las cepas SAT22 y TAT12, seleccionar las que pudieran ser más relevantes y replicarlas de manera individual en una cepa silvestre para tratar de igual los fenotipos termotolerantes y ácido tolerantes.
- El estudio de la composición lipídica de membrana en las cepas S288c, TT23, SAT22 y TAT12 por GS-MS y poder identificar cuáles son las diferencias en composición de esteroides durante la evolución a altas temperaturas (en la cepa TT23), durante la evolución a pH ácido (en la cepa SAT22) y durante la evolución a estas dos condiciones estresantes consecutivas (en la cepa TAT12).

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, C., Escalante, A., Flores, N., de Anda, R., Riveros-McKay, F., Gosset, G., ... Bolívar, F. (2012). Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-385>
- Ammerer, G., Reiser, V., & Salah, S. M. (2000). Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmostress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nature Cell Biology*, 2(9), 620–627. <https://doi.org/10.1038/35023568>
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J. M., & Adler, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO Journal*, 16(9):2179-87 <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2179>
- Ask, M., Bettiga, M., Duraiswamy, V. R., & Olsson, L. (2013). Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different physiological responses in glucose and xylose consumption phase. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-181>
- Banerjee, N., Bhatnagar, R., & Viswanathan, L. (1981). Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 226–228. <https://doi.org/10.1007/BF00505872>
- Barber, J. (2009). Photosynthetic energy conversion: natural and artificial. *Chem. Soc. Rev.*, 38(1), 185–196. <https://doi.org/10.1039/B802262N>
- Beck, T., & Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402, 689. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/45287>
- Borrull, A., Lopez Martinez, G., Poblet, M., Cordero Otero, R., & Rozès, N. (2015). A simple method for the separation and quantification of neutral lipid species using GC-MS. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(3), 274–280. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400064>
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Çakar, Z. P., Seker, U. O. S., Tamerler, C., Sonderegger, M., & Sauer, U. (2005). Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 5(6–7), 569–578. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.010>
- Carmelo, V., Santos, H., & Sá-Correia, I. (1997). Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1325(1), 63–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106483>
- Casal, M., Cardoso, H., Leao, C., & Lezo, C. (1996). Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 142, 1385–1. Retrieved from <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/142/6/mic-142-6-1385.pdf?expires=1526934234&id=id&accname=guest&checksum=613A7414565796AAD8E7C79AF409D90F>
- Caspeta, L., Buijs, N. A. A., & Nielsen, J. (2013). The role of biofuels in the future energy supply. *Energy & Environmental Science*, 6(4), 1077.

<https://doi.org/10.1039/c3ee24403b>

- Caspeta, L., Caro-Bermúdez, M. A., Ponce-Noyola, T., & Martínez, A. (2014). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*, *113*, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.036>
- Caspeta, L., Castillo, T., & Nielsen, J. (2015). Modifying yeast tolerance to inhibitory conditions of ethanol production processes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *3*(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00184>
- Caspeta, L., Chen, Y., Ghiaci, P., Feizi, A., Buskov, S., Hallstrom, B. M., ... Nielsen, J. (2014). Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science*, *346*(6205), 75–78. <https://doi.org/10.1126/science.1258137>
- Caspeta, L., Chen, Y., & Nielsen, J. (2016). Thermotolerant yeasts selected by adaptive evolution express heat stress response at 30 °C. *Scientific Reports*, *6*(May), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep27003>
- Caspeta, L., Coronel, J., Montes de Oca, A., Abarca, E., González, L., & Martínez, A. (2019). Engineering high-gravity fermentations for ethanol production at elevated temperature with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, *bit.27103*. <https://doi.org/10.1002/bit.27103>
- Caspeta, L., & Nielsen, J. (2013). Economic and environmental impacts of microbial biodiesel. *Nature Biotechnology*, *31*(9), 789–793. <https://doi.org/10.1038/nbt.2683>
- Caspeta, L., & Nielsen, J. (2015). Thermotolerant yeast strains adapted by laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other. *Research Article*, *6*(4), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00431-15>. Editor
- Chu, S., & Majumdar, A. (2012). Opportunities and challenges for a sustainable energy future. *Nature*, *488*(7411), 294–303. <https://doi.org/10.1038/nature11475>
- Collinson, L. P., & Dawes, I. W. (1995). Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase. *Gene*, *156*(1), 123–7. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00026-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00026-3)
- Colombo, S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., ... Thevelein, J. M. (1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, *17*(12), 3326–3341. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3326>
- Dickinson, R. J., & Schweiser, M. (2004). The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. (R. J. Dickinson & M. Schweiser, Eds.), *CRC Press, 2004* (2nd ed.). Washington, D.C.: 2004.
- Dufourc, E. J. (2008). Sterols and membrane dynamics. *Journal of Chemical Biology*, *1*(1–4), 63–77. <https://doi.org/10.1007/s12154-008-0010-6>
- Folch Mallol, J. L., Garay Arroyo, A., Lledías, F., & Robles, A. C. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana De Microbiología*, *46*, 24–46.
- Gamzazade, A., Sklyar, A., Nasibov, S., Sushkov, I., Shashkov, A., & Knirel, Y. (1997). Structural features of sulfated chitosans. *Carbohydrate Polymers*, *34*(1–2), 113–116. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00067-2)
- Garreau, H., Hasan, R. N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E., & Jacquet, M. (2000). Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*,

146(9), 2113–2120. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-9-2113>

- Garrido, E. O., & Grant, C. M. (2002). Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Molecular Microbiology*, 43(4), 993–1003. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929546>
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., ... Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4241–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102521>
- Geng, P., Zhang, L., & Shi, G. Y. (2017). Omics analysis of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(5), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2259-9>
- González-Ramos, D., Gorter De Vries, A. R., Grijseels, S. S., Van Berkum, M. C., Swinnen, S., Van Den Broek, M., ... Van Maris, A. J. A. (2016). A new laboratory evolution approach to select for constitutive acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of causal mutations. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0583-1>
- Görner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., ... Schüller, C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Development*, 12, 586–97. <https://doi.org/10.1101/gad.12.4.586>
- Gralla, E. B., & Valentine, J. S. (1991). Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *Journal of Bacteriology*, 173(18), 5918–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1885557>
- Granseth, E., von Heijne, G., & Elofsson, A. (2005). A Study of the Membrane–Water Interface Region of Membrane Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 346(1), 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.036>
- Heer, D., Heine, D., & Sauer, U. (2009). Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), 7631–7638. <https://doi.org/10.1128/AEM.01649-09>
- Hohmann, S. (2002a). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts osmotic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 300–372. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.300>
- Hohmann, S. (2002b). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts osmotic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 300–372. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.300>
- Holyoak, C. D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M. B., Crimmins, K., Brown, A. J., & Coote, P. J. (1996). Activity of the plasma membrane H(+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3158–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8795204>
- Hu, Z., He, B., Ma, L., Sun, Y., Niu, Y., & Zeng, B. (2017). Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Microbiology*, 57(3), 270–277. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0657-1>

- Jakrel, M. E., DeSalinas, M. E., Martinez, B. A., Castellano, L. M., Satewart, R. M., Caldwell, K. A., ... Shorter, J. (2010). Potentiated Hsp104 variants antagonize diverse proteotoxic misfolding events. *October*, 42(14), 2279–2285. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.06.047.Measurement>
- Jamieson, D. J., Rivers, S. L., & Stephen, D. W. S. (1994). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology*, 140(12), 3277–3283. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-12-3277>
- Juhnke, H., Krems, B., Kötter, P., & Entian, K.-D. (1996). Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *MGG Molecular & General Genetics*, 252(4), 456–464. <https://doi.org/10.1007/BF02173011>
- Keweloh, H., Weyrauch, G., & Rehm, H. J. (1990). Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 66–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1366564>
- Klis, F. M. (1994). Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast*, 10(7), 851–869. <https://doi.org/10.1002/yea.320100702>
- Kültz, D. (2003). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *The Journal of Experimental Biology*, 206(Pt 18), 3119–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12909693>
- Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, 67(1), 225–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635>
- Kurtz, S., Rossi, J., Petko, L., & Lindquist, S. (1986). An ancient developmental induction: heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 231(4742), 1154–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3511530>
- Lam, F. H., Ghaderi, A., Fink, G. R., & Stephanopoulos, G. (2014). Biofuels. Engineering alcohol tolerance in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6205), 71–5. <https://doi.org/10.1126/science.1257859>
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., & Nilvebrant, N. O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3–4), 151–159. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00101-X)
- Lin, F. M., Qiao, B., & Yuan, Y. J. (2009). Comparative proteomic analysis of tolerance and adaptation of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3765–3776. <https://doi.org/10.1128/AEM.02594-08>
- Lindquist, S. (1992). Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2(5), 748–755. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(05\)80135-2](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(05)80135-2)
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46–50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>
- Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*, 180(15), 3735–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683465>
- Luong, J. H. T. (1985). Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(3), 280–285. <https://doi.org/10.1002/bit.260270311>

- Marchler, G., Schüller, C., Adam, G., & Ruis, H. (1993a). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *The EMBO Journal*, *12*(5), 1997–2003. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=413422%7B&%7Dtool=pmcentrez%7B&%7Drendertype=abstract>
- Marchler, G., Schüller, C., Adam, G., & Ruis, H. (1993b). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *The EMBO Journal*, *12*(5), 1997–2003.
- Martinez-Pastor-, M. T., Marchler-, G., Schuller-, C., Marchler-Bauer-, A., Ruis, H., & Estruch-, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *The EMBO Journal*, *15*(9), 2227–2235. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00576.x>
- Mitchell, A., Romano, G. H., Groisman, B., Yona, A., Dekel, E., Kupiec, M., ... Pilpel, Y. (2009). Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. *Nature*, *460*(7252), 220–224. <https://doi.org/10.1038/nature08112>
- Mohammad J. Taherzadeh, Robert Eklund, Lena Gustafsson, Claes Niklasson and Lidén, G. (1997). Characterization and Fermentation of Dilute-Acid Hydrolyzates from Wood. <https://doi.org/10.1021/IE9700831>
- Molin, C. (2009). The oxidative and osmotic stress responses of *S. cerevisiae*. Retrieved from https://gupea.ub.gu.se/bitstream/2077/21468/1/gupea_2077_21468_1.pdf
- Mortimer, R. K., & Johnston, J. R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics*, *113*(1), 35–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3519363>
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, *74*(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1)
- Pampulha, M. E., & Loureiro-Dias, M. C. (2000). Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, *184*(1), 69–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10689168>
- Parekh, S., Vinci, V. A., & Strobel, R. J. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *54*(3), 287–301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030563>
- Piper, P. W. (1993). Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *11*(4), 339–355. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00005.x>
- Santoro, N., Johansson, N., & Thiele, D. J. (1998). Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(11), 6340–6352. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6340>
- Sauer, U. (2001). Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes, *73*, 129–169. https://doi.org/10.1007/3-540-45300-8_7
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Bailey, J. E., Hochuli, M., Szyperski, T., & Wüthrich, K. (1997). Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nature Biotechnology*, *15*(5), 448–452. <https://doi.org/10.1038/nbt0597-448>
- Schnell, N., Krems, B., & Entian, K. D. (1992). The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism.

- Current Genetics*, 21(4–5), 269–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1525853>
- Shi, Y., Mosser, D. D., & Morimoto, R. I. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes and Development*, 12(5), 654–666. <https://doi.org/10.1101/gad.12.5.654>
- Simons, K., & Gerl, M. J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), 688–699. <https://doi.org/10.1038/nrm2977>
- Sorger, P. K. (1991). Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, 65(3), 363–366. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90452-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90452-5)
- Storz, G., Christman, M. F., Sies, H., & Ames, B. N. (1987). Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(24), 8917–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3321061>
- Tagkopoulos, I., Liu, Y.-C., & Tavazoie, S. (2008). Predictive behavior within microbial genetic networks. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5881), 1313–7. <https://doi.org/10.1126/science.1154456>
- Talebna, F., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* (Vol. 101). Elsevier Science. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103146606>
- Tao, W., Deschenes, R. J., & Fassler, J. S. (2009). Intracellular glycerol levels modulate the activity of Sln1p, a *Saccharomyces cerevisiae* two-component regulator, 49(18), 1841–1850. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.01.076.White>
- Thevelein, J. M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast*, 10(13), 1753–1790. <https://doi.org/10.1002/yea.320101308>
- Thevelein, J. M., Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winde, J. H., Donation, M., Dumortier, F., ... Winderickx, J. (2000). Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9–10), 819–825. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00177-0)
- Thevelein, J. M., & de Winde, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 33(5), 904–918. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01538.x>
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573–584. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2013.10.013>
- Werner-Washburne, M., Becker, J., Kasic-Smithers, J., & Craig, E. A. (1989). Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *Journal of Bacteriology*, 171(5), 2680–8. <https://doi.org/10.1128/JB.171.5.2680-2688.1989>
- Yona, A. H., Manor, Y. S., Herbst, R. H., Romano, G. H., Mitchell, A., Kupiec, M., ... Dahan, O. (2012). Chromosomal duplication is a transient evolutionary solution to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(51), 21010–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211150109>



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 08 - octubre - 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (Tutor)
Dra. Lidia González Morales
Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Dr. Otto Geiger
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "**FISIOLOGÍA DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* ADAPTADAS A TEMPERATURA ELEVADA Y pH ÁCIDO**

Alumno que la presenta a revisión: **ARTURO IVAN MONTES DE OCA MIRANDA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. LIDIA GONZALEZ MORALES



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 02 Oct 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (Tutor)
Dra. Lidia González Morales
Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Dr. Otto Geiger
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "**FISIOLOGÍA DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* ADAPTADAS A TEMPERATURA ELEVADA Y pH ÁCIDO**

Alumno que la presenta a revisión: **ARTURO IVAN MONTES DE OCA MIRANDA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 02 Oct 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (Tutor)
Dra. Lidia González Morales
Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Dr. Otto Geiger
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "**FISIOLOGÍA DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* ADAPTADAS
A TEMPERATURA ELEVADA Y pH ÁCIDO**

Alumno que la presenta a revisión: **ARTURO IVAN MONTES DE OCA MIRANDA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 10/02/2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (Tutor)
Dra. Lidia González Morales
Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Dr. Otto Geiger
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: **"FISIOLOGÍA DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* ADAPTADAS A TEMPERATURA ELEVADA Y pH ÁCIDO**

Alumno que la presenta a revisión: **ARTURO IVAN MONTES DE OCA MIRANDA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 2 octubre 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (Tutor)
Dra. Lidia González Morales
Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Dr. Otto Geiger
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Tesis: "**FISIOLOGÍA DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* ADAPTADAS A TEMPERATURA ELEVADA Y pH ÁCIDO**

Alumno que la presenta a revisión: **ARTURO IVAN MONTES DE OCA MIRANDA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. OTTO GEIGER