



R. 4428

TD  
87

GENÉTICA Y FISIOLÓGIA DE LA TOLERANCIA AL ETANOL EN  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Trabajo realizado en el Departamento de Genética,  
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para  
optar al grado de Doctor en Biología, por el Licenciado

ANDRÉS AGUILERA LÓPEZ

Sevilla, septiembre de 1983

Director:

Dra. C.T. Benítez Fernández  
Prof. Adjunto de Genética

Ponente:

Prof. Dr. D. E. Cerdá Olmedo  
Catedrático de Genética  
Director del Departamento

TD. 87

*A mis padres*



TD  
87

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral GENETICA Y FISILOGIA DE LA TOLERANCIA AL ETANOL EN SACCHAROMYCES cerevisiae

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

no entendido /

Firmado:

Andrés Aguilera  
López

Sevilla, a 9 de Mayo de 1995

*Es necesario aprender a apartar  
la mirada de sí para ver muchas cosas:  
esa dureza necesitaba todo aquel que  
escala montañas.*

Friedrich Nietzsche, "Así habló Zaratustra".

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

En esta Tesis se han estudiado diversos aspectos de la fisiología y la genética de la tolerancia al etanol en Saccharomyces cerevisiae. Para ello, se ha analizado el efecto del etanol sobre parámetros celulares como el crecimiento, la fermentación, la respiración, etc., y se ha determinado el papel de los genes nucleares y citoplásmicos en la tolerancia de las células al etanol. Las principales conclusiones de este trabajo son:

1. La fermentación y la respiración son procesos ligados al crecimiento, pero este ligamiento es sólo parcial, de modo que puede darse fermentación y respiración en ausencia de crecimiento.
2. Concentraciones crecientes de sacarosa en el medio hacen que la tasa de crecimiento de las células se inhiba siguiendo una curva sigmoideal, y que su temperatura máxima de crecimiento disminuya. A concentraciones de sacarosa del 30% p/v las células producen la concentración máxima de etanol. A concentraciones de sacarosa inferiores, la fermentación se detiene por efecto exclusivo del etanol producido; a concentraciones superiores, por efecto conjunto de éste y la sacarosa del medio.
3. La presencia de mitocondrias funcionales y, en definitiva, el metabolismo oxidativo, son imprescindibles en S. cerevisiae para mantener unos niveles bajos de inhibición por etanol de su actividad celular. Esto se deduce del hecho de que las células con metabolismo respiratorio presentan constantes de inhibición del etanol para el crecimiento y la fermentación superiores ( $K_i = 1,05 \text{ M}$ ) a las de las células con fenotipo "petite" o cultivadas en anaerobiosis ( $K_i = 0,7 \text{ M}$ ), siendo distinto el tipo de curva de inhibición en cada caso: lineal en células con metabolismo oxidativo y exponencial en las que no lo poseen.

4. A concentraciones de etanol próximas a la máxima que tolera el crecimiento y/o a temperaturas supraóptimas de crecimiento, las diferencias entre las células "grande" y "petite" desaparecen. Ambas poseen en estas condiciones, iguales niveles de inhibición de su crecimiento y fermentación, como consecuencia, muy probablemente, de la inactivación mitocondrial por etanol o altas temperaturas.

5. El diferente grado de inhibición por etanol, conferido a las células por la actividad mitocondrial no parece estar relacionado con la composición lipídica de S. cerevisiae. Las estirpes "grande" y "petite" modifican sus lípidos de forma similar en presencia de etanol, aumentando la longitud de las cadenas de sus ácidos grasos. Sin embargo, esta modificación no mejora las tasas de crecimiento y fermentación de ambas estirpes cuando se incuban prolongadamente en medio con etanol, en cuyo caso las células "petite" son además, al contrario que las "grande", incapaces de mantener los niveles fisiológicos adecuados para responder al etanol como lo hacen inmediatamente después de ser transferidos a medio con etanol desde medio sin él.

6. En S. cerevisiae existe un elevado número de genes implicados en la tolerancia al etanol, de modo que mutaciones en ellos incapacitan a las células para crecer en presencia de etanol. En esta Tesis se han aislado 23 mutantes de este tipo, los cuales presentan constantes de inhibición para el crecimiento y concentraciones máximas de etanol a las que son capaces de crecer, menores que las del tipo silvestre, si bien ambos parámetros varían de unos mutantes a otros. Se ha determinado por complementación, que 21 de estos mutantes definen 20 genes distintos a los que se han denominado *ETA1* a *ETA20*. Todas las mutaciones obtenidas son recesivas, y por tanto, de pérdida de función.

7. Los cambios drásticos en los niveles de tolerancia del crecimiento al etanol, no están necesariamente relacionados con el metabolismo de los hidratos de carbono o el de los lípidos en S. cerevisiae. De entre 21 mutantes analizados, 20 no parecen tener alterada la ruta glicolítica, como prueba el hecho de que son capaces de producir etanol hasta concentraciones similares a las del tipo silvestre, y ninguno de ellos parece estar afectado en las rutas biosintéticas de los ácidos grasos y el ergosterol.

8. Algunas de las mutaciones obtenidas son pleiotrópicas, es decir, afectan además de a la tolerancia al etanol, a otros caracteres como son la morfología celular, el tamaño de las colonias, la viabilidad celular en presencia de etanol, la termosensibilidad, etc. Esto puede interpretarse como que los genes correspondientes no están específicamente implicados en la tolerancia al etanol, sino que poseen otras funciones en las células. Las mutaciones pueden clasificarse en dos tipos: no condicionales, que se expresan en todas las circunstancias, y condicionales, que sólo se expresan en presencia de etanol. La existencia de este último tipo de mutación sería debida a que el gen alterado determinaría una proteína funcional que se inactivaría en presencia de etanol.

9. Las relaciones existentes entre las mutaciones obtenidas en esta Tesis son de tipo epistático. Los genes de la tolerancia al etanol determinan, pues, proteínas que están implicadas o bien en la misma ruta metabólica, o bien en rutas diferentes.

INDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCIÓN .....	1
1. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DE ESTE TRABAJO .....	2
2. CICLO DE VIDA DE <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .....	3
3. CINETICA DEL CRECIMIENTO .....	6
3.1. Tasa de crecimiento .....	6
3.2. Coeficiente metabólico .....	7
3.3. Rendimientos del crecimiento .....	7
3.4. Coeficiente de mantenimiento .....	9
3.5. Parámetros de crecimiento en el Cultivo Continuo .....	10
3.6. Efecto de la concentración de sustrato sobre la tasa de crecimiento .....	11
3.7. Relación entre la tasa de crecimiento y la formación de un producto .....	11
4. METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO .....	12
5. LÍPIDOS DE <u>Saccharomyces</u> .....	16
5.1. Estructura y biosíntesis .....	16
5.1.1. Acidos grasos .....	16
5.1.2. Fosfolípidos .....	18
5.1.3. Esteroles .....	19
5.3. Efecto de las condiciones de crecimiento sobre la composición lipídica .....	20
5.2.1. Edad del cultivo .....	21
5.2.2. Temperatura .....	21
5.2.3. Oxígeno .....	22
5.3. El papel de los lípidos en las membranas .....	23
5.3.1. Longitud de las cadenas de los ácidos grasos ..	23
5.3.2. Grado de insaturación de los ácidos grasos ...	24
5.3.3. Esteroles .....	24
6. LAS FUNCIONES MITOCONDRIALES Y LA MUTACIÓN "PETITE" .....	25

7. EFECTOS DE LOS ALCOHOLES SOBRE BACTERIAS Y EUCARIOTAS .....	26
7.1. Efectos generales .....	26
7.2. Efecto sobre las membranas .....	28
8. TOLERANCIA A ETANOL EN DIFERENTES ORGANISMOS .....	31
8.1. Base fisiológica .....	31
8.2. Base genética .....	32
II. <u>MATERIALES Y METODOS</u> .....	33
1. ESTIRPES .....	34
2. PRODUCTOS QUIMICOS .....	37
3. TAMPONES .....	37
4. MEDIOS DE CULTIVO .....	38
4.1. Medios líquidos .....	38
4.2. Medios sólidos .....	38
5. CRECIMIENTO .....	39
5.1. Condiciones de cultivo .....	39
5.1.1. Cultivos discontinuos en aerobiosis .....	39
5.1.2. Cultivos discontinuos en anaerobiosis .....	40
5.1.3. Cultivo continuo .....	40
5.2. Determinación del número de células .....	40
5.2.1. Células totales .....	40
5.2.2. Células viables .....	41
6. FERMENTACIÓN .....	41
6.1. Determinación de la concentración máxima de etanol a la que es posible la fermentación .....	41
6.2. Determinación de la tasa de fermentación .....	41
7. RESPIRACIÓN .....	42
8. DETERMINACIONES ANALÍTICAS .....	43
8.1. Determinación de oxígeno .....	43
8.2. Determinación de etanol .....	43
8.2.1. Método enzimático .....	43
8.2.1. Método cromatográfico .....	44

8.3. Determinación de azúcares .....	44
8.3.1. Determinación de glucosa .....	44
8.3.2. Determinación de sacarosa .....	44
8.4. Determinación de lípidos .....	45
8.4.1. Determinación de ácidos grasos .....	45
8.4.2. Determinación de esteroides .....	46
9. TRATAMIENTO MUTAGÉNICO .....	46
9.1. Mutagénesis con Nitrosoguanidina .....	46
9.2. Mutagénesis con Bromuro de Etidio .....	47
10. SELECCIÓN DE MUTANTES .....	47
11. OBTENCIÓN DE DIPLOIDES .....	49
11.1. Selección de los diploides .....	49
11.2. Micromanipulación de cigotos .....	49
11.3. Identificación de estirpes con niveles de ploidía distintos al haploide .....	50
12. ESPORULACIÓN .....	50
13. ANÁLISIS MEIÓTICO .....	50
III. <u>RESULTADOS</u> .....	52
1. RELACION ENTRE CRECIMIENTO, FERMENTACIÓN Y RESPIRACIÓN ....	53
1.1. Consideraciones teóricas .....	53
1.2. Resultados experimentales .....	55
2. EFECTO INHIBIDOR DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO EN FUNCION DE LA TEMPERATURA .....	62
3. LA TOLERANCIA A ETANOL Y EL NIVEL DE PLOIDÍA EN <u>S.</u> <u>cerevisiae</u> .....	66
4. IMPORTANCIA DE LAS FUNCIONES MITOCONDRIALES EN LA TOLE- RANCIA A ETANOL .....	68
4.1. Efecto del etanol en las estirpes "grande" S288C y "petite" BE288-1 de <u>S. cerevisiae</u> .....	68
4.1.1. Efecto del etanol sobre el crecimiento, la fermentación y la respiración.1) Aerobiosis ...	68

4.1.2.	Efecto del etanol sobre el crecimiento y la fermentación. 2) Anaerobiosis .....	74
4.1.3.	Viabilidad en función de la concentración de etanol .....	74
4.1.4.	Rendimiento biomasa/sustrato $Y_{XS}$ en función de la concentración de etanol .....	76
4.2.	Variación de la constante de inhibición del etanol, para las tasas de crecimiento, fermentación y respiración, en función de la presencia o ausencia de mitocondrias funcionales .....	76
4.3.	Las mitocondrias como responsables de los diferentes tipos de inhibición del crecimiento y la fermentación en las estirpes "grande" y "petite" .....	81
4.4.	La adaptación como posible causa de la diferente inhibición por etanol de $\mu$ y $v$ en las estirpes "grande" y "petite" .....	83
4.5.	Efecto de la temperatura sobre la inhibición por etanol del crecimiento y la fermentación en las estirpes "grande" y "petite" .....	84
4.5.1.	Inhibición de la tasa de crecimiento .....	84
4.5.2.	Tolerancia de la fermentación al etanol .....	86
4.6.	Composición lipídica de <u>S. cerevisiae</u> .....	86
4.6.1.	Análisis de los lípidos en función de la edad del cultivo .....	86
4.6.2.	Análisis de los lípidos en función de la concentración de etanol y la capacidad respiratoria .....	88
5.	GENÉTICA DE LA SENSIBILIDAD A ETANOL EN <u>S. cerevisiae</u> .....	91
5.1.	Obtención de mutantes sensibles a etanol .....	91
5.2.	Caracterización genética de los mutantes obtenidos ...	94
5.2.1.	Estudios de dominancia-recesividad .....	94
5.2.2.	Análisis de tétradas .....	94
5.2.3.	Estudios de complementación .....	97

5.3. Caracterización fisiológica de los mutantes mono- <u>génicos</u> .....	97
5.3.1. Inhibición de la tasa de crecimiento .....	97
5.3.2. Viabilidad frente a etanol .....	97
5.3.3. Producción de etanol .....	101
5.3.4. Análisis de lípidos .....	101
5.4. Interrelación de genes y sensibilidad a etanol en dobles mutantes .....	104
IV. <u>DISCUSIÓN</u> .....	108
1. RELACIÓN ENTRE CRECIMIENTO, FERMENTACIÓN Y RESPIRACIÓN. EFECTO DE LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO .....	109
2. PAPEL DE LA HERENCIA EXTRACROMOSÓMICA EN LA TOLERANCIA A ETANOL .....	112
2.1. Importancia del metabolismo oxidativo mitocondrial en la inhibición por etanol de <u>S. cerevisiae</u> .....	112
2.2. Importancia de la composición lipídica en la in- hibición por etanol de <u>S. cerevisiae</u> .....	117
3. GENÉTICA DE LA SENSIBILIDAD AL ETANOL .....	121
V. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	128

SIMBOLOS

$a, b; \beta, K, K', k$	constantes empíricas
$x$	concentración de biomasa
$\bar{x}$	concentración de biomasa en cultivo continuo en estado de equilibrio
$x_0$	concentración de biomasa inicial
$x_t$	concentración de biomasa en el tiempo $t$
$s$	concentración de sustrato
$\bar{s}$	concentración de sustrato en cultivo continuo en estado de equilibrio
$s_0$	concentración de sustrato inicial
$s_E$	concentración de sustrato cuyo consumo produce la energía total disponible por la célula
$s_G$	concentración de sustrato cuyo consumo produce la energía necesaria para el crecimiento celular
$s_M$	concentración de sustrato cuyo consumo produce la energía necesaria para el mantenimiento celular
$p$	concentración de producto
$\bar{p}$	concentración de producto en cultivo continuo en estado de equilibrio
$p_L$	proporción de producto formada a través de un proceso metabólico ligado al crecimiento
$p_I$	proporción de producto formada a través de un proceso metabólico independiente del crecimiento
$t$	tiempo
$t_r$	tiempo de residencia de un cultivo en un quimioestato
$V$	volumen de la vasija de cultivo en un quimioestato
$F$	flujo de medio en un cultivo continuo
$D$	tasa de dilución de un cultivo continuo
$m$	coeficiente de mantenimiento
$\tau$	tiempo de generación
$\mu$	tasa de crecimiento

$\mu_m$	tasa de crecimiento máxima
$\mu_o$	tasa de crecimiento en medio sin etanol
$q$	coeficiente metabólico
$q_p$	tasa de formación de producto
$q_s$	tasa de consumo de sustrato
$q_{sG}$	tasa de consumo de sustrato destinado al crecimiento celular
$q_{sM}$	tasa de consumo de sustrato destinado al mantenimiento celular
$v$	tasa de fermentación
$\rho$	tasa de respiración
$\underline{v}$	tasas metabólicas en general (de crecimiento, de fermentación o de respiración)
$v_o$	tasas metabólicas en medio sin etanol
$K_s$	constante de equilibrio de Monod
$K_i$	constante de inhibición
$K_{ie}$	constante de inhibición calculada empíricamente
$K_{im}$	constante de inhibición calculada por la ecuación de Monod
$Y_{xs}$	rendimiento biomasa/sustrato
$Y_{EG}$	rendimiento biomasa/sustrato "verdadero"
$Y_{sx}$	rendimiento sustrato consumido/biomasa
$Y_{px}$	rendimiento producto/biomasa
$Y_{ps}$	rendimiento producto/sustrato
$Y_{ox}$	rendimiento $O_2$ consumido/biomasa
$T_{max}$	temperatura máxima de crecimiento

## I. INTRODUCCIÓN

## 1. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DE ESTE TRABAJO

Desde la antigüedad se utiliza la levadura Saccharomyces para la fermentación de la uva y la cebada, con el fin de producir vino y cerveza. Esto se debe, entre otras cosas, a la capacidad de esta levadura de producir grandes cantidades de alcohol y de tolerarlo y seguir fermentando a concentraciones a las que otros organismos son incapaces de mantener siquiera sus niveles de viabilidad. El objetivo de esta Tesis ha sido determinar la base genética y fisiológica de la tolerancia a esas altas concentraciones de etanol de la levadura S. cerevisiae.

Sabiendo por un lado que más del 90% del metabolismo de los hidratos de carbono en S. cerevisiae es fermentativo, a pesar de ser cultivado en aerobiosis, se ha determinado cuál es el papel del metabolismo oxidativo, y con ello de las mitocondrias, en la fermentación y crecimiento de esta levadura en presencia y ausencia de etanol. Igualmente, se ha determinado cómo influye la temperatura en estos procesos: si es un factor que aumenta la inhibición por etanol de estas tasas metabólicas, o si, por el contrario, y como dicen algunos autores, puede ser un factor que mejore la tasa de producción de etanol.

Sobre tolerancia a etanol sólo se ha estudiado extensamente su relación con la composición lipídica en diferentes organismos, no estando aún claro, cuál es el papel que los lípidos desempeñan en el mantenimiento de altos niveles de tolerancia a etanol. Con este objetivo, en este trabajo se ha analizado la composición lipídica de mutantes que tienen una tolerancia al etanol menor que la del tipo silvestre.

Por último, se ha tratado de determinar cuántos genes están

implicados en la tolerancia al etanol, y cuáles son las relaciones entre ellos.

La heterogeneidad de la introducción se justifica porque abarca, además de aspectos estrechamente relacionados con la tolerancia al etanol, aspectos básicos que se consideran necesarios para la comprensión del trabajo. Así, aparte de una descripción del organismo con que se trabaja, S. cerevisiae, se presentan temas como el metabolismo de los hidratos de carbono, a partir de los cuales se forma etanol; el metabolismo de los lípidos, y su variación con las diversas condiciones de cultivo, y, por último, tras hacer una breve pero imprescindible mención a las mutaciones "petite", se hace una revisión de los aspectos fisiológicos y genéticos de la tolerancia al etanol conocidos hasta ahora.

## 2. CICLO DE VIDA DE Saccharomyces cerevisiae

La levadura S. cerevisiae se ha convertido en un organismo de extraordinaria utilidad en los laboratorios debido a su manipulabilidad genética y facilidad de crecimiento. Los mutantes pueden ser obtenidos sin demasiados problemas y su análisis genético no ofrece excesivas complicaciones. Esta levadura posee ciclos mitóticos estables como célula en fase haploide y en fase diploide, pudiéndose conseguir mutaciones recesivas en células haploides y ser analizadas por complementación en células diploides (Carter, 1975). S. cerevisiae presenta un núcleo verdadero rodeado de membrana, con nucleolo, mitocondrias, retículo endoplasmático, vacuolas y aparato de Golgi (Matile et al., 1969), e histonas asociadas a ADN en cantidades y variedad similares a eucariotas superiores (Nelson et al., 1977).

El genomio haploide contiene 17 cromosomas, según determinación citológica (Byers y Goetsch, 1975) y genética (Mortimer y Schild, 1982; Wickner et al., 1982). Las células haploides contienen entre  $0,84 \times 10^{10}$  y  $1,2 \times 10^{10}$  daltones de ADN (Ciferri et al., 1969), con poco ADN redundante (Britten y Kohne, 1968).

El ciclo de vida de S. cerevisiae (Fig. 1) establecido originalmente por Winge en 1935, ha sido ampliamente estudiado. El control genético de su sistema de apareamiento fue descrito por Winge, Sindegreen y colaboradores alrededor de 1950 (Sherman y Lawrence, 1974), y desde entonces se ha publicado una extensa bibliografía relacionada con el tema, de la que merece especial atención las revisiones de Mortimer y Hawthorne en 1969, Hartwell en 1970 y 1974 y las más recientes de Pringle y Hartwell en 1981 y Nasmyth en 1982.

En condiciones nutritivas apropiadas S. cerevisiae puede dividirse por sucesivos ciclos mitóticos indefinidamente. Sin embargo, en condiciones de hambre, sufre meiosis formándose un asca con cuatro esporas. Al germinar, dos esporas poseen el tipo de apareamiento celular  $\alpha$  y las otras dos el a. Las células  $\alpha$  sólo pueden conjugar con las a, formándose diploides  $\alpha/a$ , incapaces de aparear, y que volverán a esporular en condiciones de hambre. El fenotipo sexual a o  $\alpha$  está determinado por el gen *MAT* situado en el cromosoma III. Existen dos tipos de estirpes en S. cerevisiae: heterotálicas y homotálicas. El responsable de la existencia de estos dos tipos de estirpes es un gen no ligado al sexo, cuyo alelo dominante *HO* determina el homotalismo y su alelo recesivo *ho* el heterotalismo. En las células heterotálicas *ho*, los alelos *MAT $\alpha$*  y *MAT $\alpha$*  son alelos mendelianos estables, codominantes en heterocigosis. En estas estirpes, los haploides con distinto sexo pueden mantenerse indefinidamente, dividiéndose por gemación. Las células homotálicas, poseen los genes del homotalismo *HO* (Astell et al., 1981) por lo que los alelos *MAT $\alpha$*  y *MAT $\alpha$*  son rápidamente interconvertibles (Hicks y Herskowitz, 1976), cambiando su tipo de

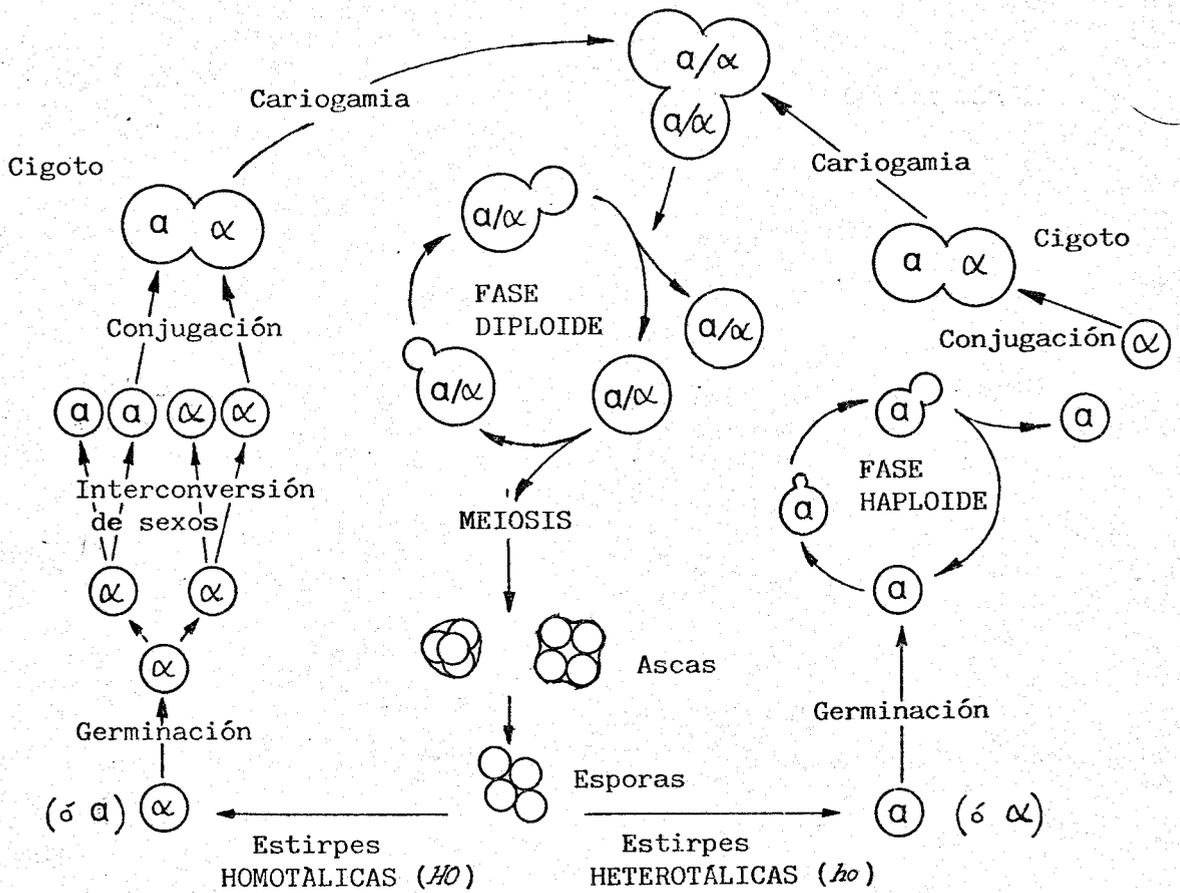


FIGURA 1. Ciclo de vida de *S. cerevisiae*.  $\alpha$  y  $\alpha$  son los alelos mendelianos del gen *MAT.HO* y *ho* los del gen *HO* (de Nasmyth, 1982, ligeramente modificado).

sexo casi cada división celular (Strathern y Herskowitz, 1979). En consecuencia, las esporas haploides rápidamente dan lugar a descendientes con diferentes tipos de apareamiento, que conjugan para producir los diploides  $\underline{a}/\alpha$  por lo que la fase haploide no dura más de un par de generaciones. Una vez formado el diploide  $\alpha/\underline{a}$  dejan de tener lugar las interconversiones en el *gen. MAT*. (Hicks y Herskowitz, 1977).

### 3. CINÉTICA DEL CRECIMIENTO

#### 3.1. Tasa de crecimiento

A lo largo de la curva de crecimiento las levaduras pasan por tres fases distintas: latencia, exponencial y estacionaria.

En un intervalo infinitesimal de tiempo,  $dt$ , el incremento de biomasa,  $dx$ , es proporcional a la cantidad de biomasa,  $x$ , presente en ese intervalo (Monod, 1942):

$$dx = \mu x dt \quad (1)$$

donde  $\mu$ , constante de proporcionalidad en ese intervalo, equivale a la tasa específica de crecimiento, incremento de biomasa por unidad de tiempo respecto de la cantidad de biomasa, medido en  $h^{-1}$ :

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (2)$$

Se dice que el crecimiento es equilibrado si en una población todos los parámetros relacionados aumentan con igual tasa específica (van Uden, 1971). Si esta tasa es constante con el tiempo, el crecimiento de esta población es equilibrado y exponencial (Painter y Marr, 1968). Integrando la expresión (1) queda patente la existencia de crecimiento exponencial en la ecuación resultante:

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

El tiempo necesario para que la biomasa se duplique es el llamado tiempo de generación,  $\tau$ . A partir de la expresión (3)

se observa que:

$$\tau = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4)$$

### 3.2. Coeficiente metabólico

El consumo de un sustrato,  $ds$ , en un intervalo de tiempo,  $dt$ , es, como el incremento de biomasa, proporcional a la cantidad de biomasa presente:

$$-ds = qxd t \quad (5)$$

donde la constante de proporcionalidad  $q$  es el coeficiente metabólico o tasa metabólica específica. Análogamente este cociente puede ser calculado observando el incremento de la aparición de producto  $dp$ :

$$dp = qxd t \quad (6)$$

Ejemplos conocidos de estos coeficientes son los de consumo de  $O_2$  ( $q_{O_2}$  ó  $\rho$ , llamado tasa de respiración), producción de  $CO_2$  ( $q_{CO_2}$  ó  $\nu$ ) y consumo de glucosa ( $\nu$ ) (estos dos últimos también llamados tasa de fermentación). Estos coeficientes son los que se van a utilizar en esta Tesis.

### 3.3. Rendimientos del crecimiento

La cantidad de biomasa que se produce por unidad de sustrato consumido se define como el rendimiento del crecimiento o rendimiento biomasa/sustrato,  $Y_{XS}$ , (Pirt, 1975), que viene dado por la expresión:

$$\frac{\Delta x}{\Delta s} = Y_{XS} \quad (7)$$

donde  $\Delta x$  es el incremento de biomasa producido y  $\Delta s$  es el incremento de sustrato utilizado para producir dicho  $\Delta x$ . Más rigurosamente, este rendimiento viene expresado por el límite de  $\frac{\Delta x}{\Delta s}$  cuando  $\Delta s \rightarrow 0$ , o sea:

$$Y_{XS} = \frac{dx}{ds} \quad (8)$$

Al multiplicar esta expresión por  $\frac{x}{x} \cdot \frac{dt}{dt}$ , obtenemos la expresión general:

$$Y_{XS} = \frac{\mu}{q} \quad (9)$$

Otros rendimientos de interés son:

- Rendimiento producto/sustrato,  $Y_{ps}$ . Expresa el incremento de producto formado,  $dp$ , por sustrato utilizado,  $ds$ , y viene dado por la expresión:

$$Y_{ps} = \frac{dp}{ds} = \frac{q_p}{q_s} \quad (10)$$

donde  $q_s$  es la tasa específica de desaparición de sustrato y  $q_p$  la tasa específica de formación de producto.

- Rendimiento producto/biomasa,  $Y_{px}$ . Expresa el incremento de producto formado,  $dp$ , por biomasa producida,  $dx$ , a partir de la misma concentración de sustrato utilizada, y viene dado por la expresión:

$$Y_{px} = \frac{dp}{dx} = \frac{q_p}{\mu} \quad (11)$$

Cuando la aparición de un producto,  $dp$ , está directamente relacionada con la desaparición de un sustrato,  $-ds$ , por ejemplo, la formación de etanol a partir de la fermentación de la glucosa, este parámetro puede obtenerse de la expresión:

$$Y_{px} = \frac{-ds}{dx} \quad (12)$$

Al rendimiento calculado de la expresión anterior se le llamará en esta Tesis  $Y_{SX}$ \*, que deducido de la ecuación (9), es:

$$Y_{SX} = \frac{1}{Y_{XS}} = \frac{q_s}{\mu} \quad (13)$$

De las expresiones (9), (10) y (11) se deduce que:

$$Y_{XS} = \frac{Y_{ps}}{Y_{px}} \quad (14)$$

\*En esta Tesis se ha utilizado el coeficiente  $Y_{px}$  como un tipo de rendimiento  $Y_{SX}$ . Aunque biológicamente el término no está definido adecuadamente, se ha utilizado como tal para simplificar, con objeto de relacionar el consumo de oxígeno con la biomasa producida (Resultados, apartado 1.2.).

### 3.4. Coeficiente de mantenimiento

Se definen como funciones específicas de mantenimiento en las células aquellas relacionadas con sólo la supervivencia celular y son, entre otras, el recambio de material celular, la energía requerida para mantener los gradientes de concentración entre la célula y el exterior, la movilidad celular, etc. Aunque fue en 1922 cuando Terroine y Wurmser esbozaron por primera vez el concepto de energía de mantenimiento (Goma *et al.*, 1979) es Pirt quien lo define por primera vez. Según Pirt (1975) la fuente de energía total consumida  $\Delta S_E$  contribuye por una parte a la energía necesaria para el crecimiento  $\Delta S_G$  y por otra a la energía necesaria para el mantenimiento celular  $\Delta S_M$ :

$$Y_{XS} = \frac{\Delta x}{\Delta S} = \frac{\Delta x}{\Delta S_G + \Delta S_M} \quad (15)$$

Cuando  $\Delta S_M = 0$ , entonces se obtiene lo que Pirt llama rendimiento del crecimiento "verdadero"  $Y_{EG}$ :

$$Y_{EG} = \frac{\Delta x}{\Delta S_G} \quad (16)$$

Igualmente, la tasa específica de consumo de un sustrato  $q_S$ , tiene dos componentes: el que determina el crecimiento,  $q_{SG}$ , y el que determina el mantenimiento celular,  $q_{SM}$ :

$$q_S = q_{SG} + q_{SM} \quad (17)$$

Considerando las expresiones (9) y (17), se tiene que:

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{EG}} + m \quad (18)$$

donde  $m$  es el coeficiente de mantenimiento, equivalente a la tasa específica de consumo de sustrato que se destina a obtener energía de mantenimiento. Gráficamente si se representara  $q_S$  frente a  $\mu$ , se obtendría una recta que no pasaría por el origen; la distancia entre el punto de corte de la recta con el eje de abscisas,  $q_S$ , y el origen, equivale a  $m$  (Stouthamer y Bettenhausen, 1973). Dividiendo los términos de la ecuación (17) por  $\mu$  se tiene que:

$$\frac{1}{Y_{XS}} = \frac{1}{Y_{EG}} + \frac{m}{\mu} \quad (19)$$

Goma et al (1979) especulan con la existencia en la ecuación (17) de otro término que representa la parte de sustrato utilizada,  $s_i$ , para la formación de productos,  $p_i$ , y que no está directamente ligado al crecimiento:

$$m = q_s - \frac{\mu}{Y_{XS}} - \sum_{i=1}^i q_{p_i} / Y_{pS_i} \quad (20)$$

Ellos consideran que este coeficiente  $m$  define no sólo el consumo de sustrato dedicado a mantenimiento sino que incluye más factores, llamándolo "coeficiente de consumo de sustrato aparentemente no finalizado".

### 3.5. Parámetros de crecimiento en el Cultivo Continuo

El cultivo continuo es una técnica consistente en la afluencia continua de medio fresco a una tasa constante a la vasija en la que están creciendo los micrororganismos; el volumen de cultivo se mantiene constante, debido a una salida continua de medio igual a la cantidad de medio fresco entrante. El cociente entre el flujo de medio  $F$  (ml. de medio/h.) y el volumen de cultivo  $V$  (ml.), equivale a la tasa de dilución  $D$ , que se mide en  $h^{-1}$ . El tiempo que emplea todo el volumen de cultivo del quimiostato en renovarse completamente es lo que se llama tiempo de residencia,  $t_r$ , y equivale al inverso de la tasa de dilución,  $D$ .

En el cultivo continuo en equilibrio, donde la concentración de biomasa,  $x$ , y sustrato residual,  $s$ , son constantes, la tasa de dilución  $D$ , equivale a la tasa de crecimiento,  $\mu$ , del cultivo celular (Pirt, 1975). De esta forma los parámetros dependientes de  $\mu$  se calculan a partir de  $D$ . Así para calcular la tasa de fermentación,  $v$ , a partir de la expresión (5) se tiene que:

$$v = \frac{D(s_o - s)}{x} \quad (21)$$

Donde  $s_o$  es la concentración de sustrato inicial,  $s$  la de sustrato residual y  $x$  la de biomasa.

### 3.6. Efecto de la concentración de sustrato sobre la tasa de crecimiento

La existencia de un crecimiento exponencial constante en los cultivos discontinuos, indica que hay un rango de concentraciones de sustrato que no afecta a la tasa de crecimiento. No obstante, un nutriente puede limitar el crecimiento cuando no está en concentraciones saturantes (van Uden, 1969). La relación entre la tasa de crecimiento y este nutriente limitante puede ajustarse a un tipo de ecuación (Monod, 1942) similar al de la cinética enzimática:

$$\mu = \mu_m \frac{s}{s + K_s} \quad (22)$$

donde  $s$  es la concentración del nutriente limitante,  $K_s$  la constante de saturación, equivalente a la constante de Michaelis-Menten, y  $\mu_m$  es el valor máximo que alcanza  $\mu$  cuando  $s \gg K_s$ . Esta ecuación es igualmente aplicable al coeficiente metabólico (Pirt, 1975).

### 3.7. Relación entre la tasa de crecimiento y la formación de un producto

La formación de un producto puede mantener tres tipos de relaciones con respecto al crecimiento, en cualquier organismo, cada una de las cuales se expresa según funciones algebraicas distintas (ver Pirt, 1975):

- Procesos independientes: la tasa de aparición de un producto,  $q_p$ , no mantiene ningún tipo de relación con la tasa de crecimiento  $\mu$ . La expresión más sencilla de este proceso viene dada por:

$$q_p = \beta \quad (23)$$

donde  $\beta$  es una constante o bien una variable que no depende de  $\mu$ . Un ejemplo de este caso es la producción de penicilina por Penicillium a tasas de crecimiento superiores a  $0,015 \text{ h}^{-1}$  (Pirt, 1975).

- Procesos totalmente ligados: la tasa de aparición de producto  $q_p$  es directamente proporcional a la tasa de crecimiento  $\mu$ , de forma que cuando uno de los dos parámetros se hace nulo el otro también; su expresión viene dada por

$$q_p = Y_{px} \mu \quad (24)$$

donde  $Y_{px}$  es el rendimiento producto/biomasa definido en el apartado 3.3. Ejemplos de procesos totalmente ligados al crecimiento son la formación de los componentes de la pared celular y enzimas esenciales para el crecimiento, o la producción de ARNm (Pirt, 1975).

- Procesos parcialmente ligados: la tasa de formación de producto  $q_p$  es la resultante de dos componentes, uno independiente de la tasa de crecimiento  $\mu$ , y otro dependiente, por lo que  $q_p$  mantiene un nivel basal cuando  $\mu$  se hace nulo. Su expresión sería:

$$q_p = Y_{px} \mu + \beta \quad (25)$$

Luedeking y Pirt en 1959 observaron que este modelo es el que sigue la producción de ácido láctico a partir de azúcar en Lactobacillus (Pirt, 1975).

#### 4. METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

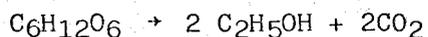
S. cerevisiae es un organismo heterotrófico capaz de utilizar una extensa variedad de componentes orgánicos como nutrientes. A pesar de ser considerado como modelo de organismo anaerobio facultativo, posee tres características peculiares: a) aunque puede crecer aeróbica o anaeróbicamente, el crecimiento en anaerobiosis sólo dura unas pocas generaciones, ya que necesita  $O_2$  para sintetizar ergosterol y ácidos grasos insaturados (Hunter y Rose, 1971); b) cuando crece en medio con azúcar como fuente de carbono, especialmente glucosa, la respiración es muy escasa y la fermentación pasa a ser la principal ruta catabólica, a pesar de poseer

oxígeno disponible que le proporcionaría un mayor rendimiento energético (36 moles de ATP/mol de hexosa obtenido en respiración frente a 2 en fermentación) (Polakis y Bartley, 1965; Lagunas y Gancedo, 1973); 3) la tasa de metabolización de azúcares es similar en aerobiosis y anaerobiosis, ya que en ambos casos la fermentación es la ruta preponderante, siendo el rendimiento de ATP similar en ambas condiciones (Lagunas, 1976; 1979).

El primer paso en el metabolismo de los azúcares es lógicamente su entrada en la célula. Las levaduras son impermeables a los azúcares y es necesario un transporte estereoespecífico antes de la fosforilación (de la Fuente y Sols, 1962). El primer paso en la utilización de la glucosa es, pues, un transporte catalizado a través de la membrana (Cirillo, 1962). Hay muchos indicios de la existencia de transportadores de membrana. Horack y Kotyk (1973) describen el aislamiento de un transportador de hexosas, el cual puede introducir glucosa libre en la célula (Kotyk y Michaljanicova, 1974). No obstante, la concentración interna de glucosa libre en el equilibrio es muy baja (Becker y Betz, 1972), encontrándose el azúcar principalmente en forma fosforilada. Este hecho sugiere un mecanismo de translocación agrupado (Jaspers y van Steveninck, 1975), o algún ligamiento entre la entrada y la fosforilación de la glucosa (Fraenkel, 1982). El transporte tiene lugar bajo condiciones de equilibrio y no es acumulativo, o sea no es activo termodinámicamente, aunque sí fisiológicamente (Heredia et al., 1968).

Además de los monosacáridos, Saccharomyces metaboliza también disacáridos y oligosacáridos (de la Fuente y Sols, 1962). El metabolismo de la sacarosa, por ejemplo, requiere en primer lugar hidrólisis por la enzima invertasa, situada en el espacio periplásmico, lo que da lugar a glucosa y fructosa que se metabolizan directamente a través de la ruta glicolítica. En otros casos, el proceso es diferente (Fraenkel, 1982; Schekman y Novick, 1982).

Alrededor del 95% de la glucosa, fructosa o maltosa catabolizada por Saccharomyces se fermenta por la ruta glicolítica, formándose principalmente etanol y CO<sub>2</sub> como productos finales. La ecuación general de la fermentación alcohólica fue establecida en 1815 por Gay-Lussac (Sols et al., 1971):



Aunque esta ecuación es básicamente correcta, en la fermentación se obtienen además otros productos en menor proporción (Harrison, 1970). Pasteur ya observó que el ácido succínico y el glicerol acompañan muy frecuentemente al etanol durante la fermentación (Sols et al., 1971). En la Fig. 2 está esquematizada la glicolisis.

En S. cerevisiae la enzima cinasa de la fosfofructosa, que fosforila la fructosa 6-P produciendo fructosa 1,6-diP, presenta una gran sensibilidad a diversos efectores (Uyeda, 1979), lo que la hace fundamental en la regulación de la glicolisis. La reacción que cataliza esta enzima es irreversible in vivo (Sols et al., 1971). La cinasa de la fosfofructosa, es fuertemente inhibida por ATP (Viñuela et al., 1963), siendo esta inhibición contrarrestada eficazmente por AMP (Ramaiah et al., 1964), iones NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y citrato a concentraciones fisiológicas (Sols y Salas, 1966).

Es interesante mencionar también en este apartado la enzima deshidrogenasa del alcohol, por catalizar el último paso de la glicolisis, produciendo etanol a partir de la reducción del acetaldehído, y que utiliza NAD<sup>2+</sup> como cofactor. En Saccharomyces son conocidas tres isoenzimas de la deshidrogenasa del alcohol: una de ellas, (ADHm), aunque codificada por un gen nuclear, ADM, actúa en las mitocondrias; las otras dos son citoplásmicas, una constitutiva (ADHI) codificada por el gen ADC (Ciriacy, 1975a; Williamson et al., 1980) y otra réprimible por glucosa (ADHII) en cuya síntesis están implicados el gen estructural ADR2 y el regulatorio ADR1 (Ciriacy, 1975b, 1976).

Cuando Saccharomyces se cultiva en piruvato, lactato, acetato o etanol como fuentes de carbono, estos sustratos son oxidados

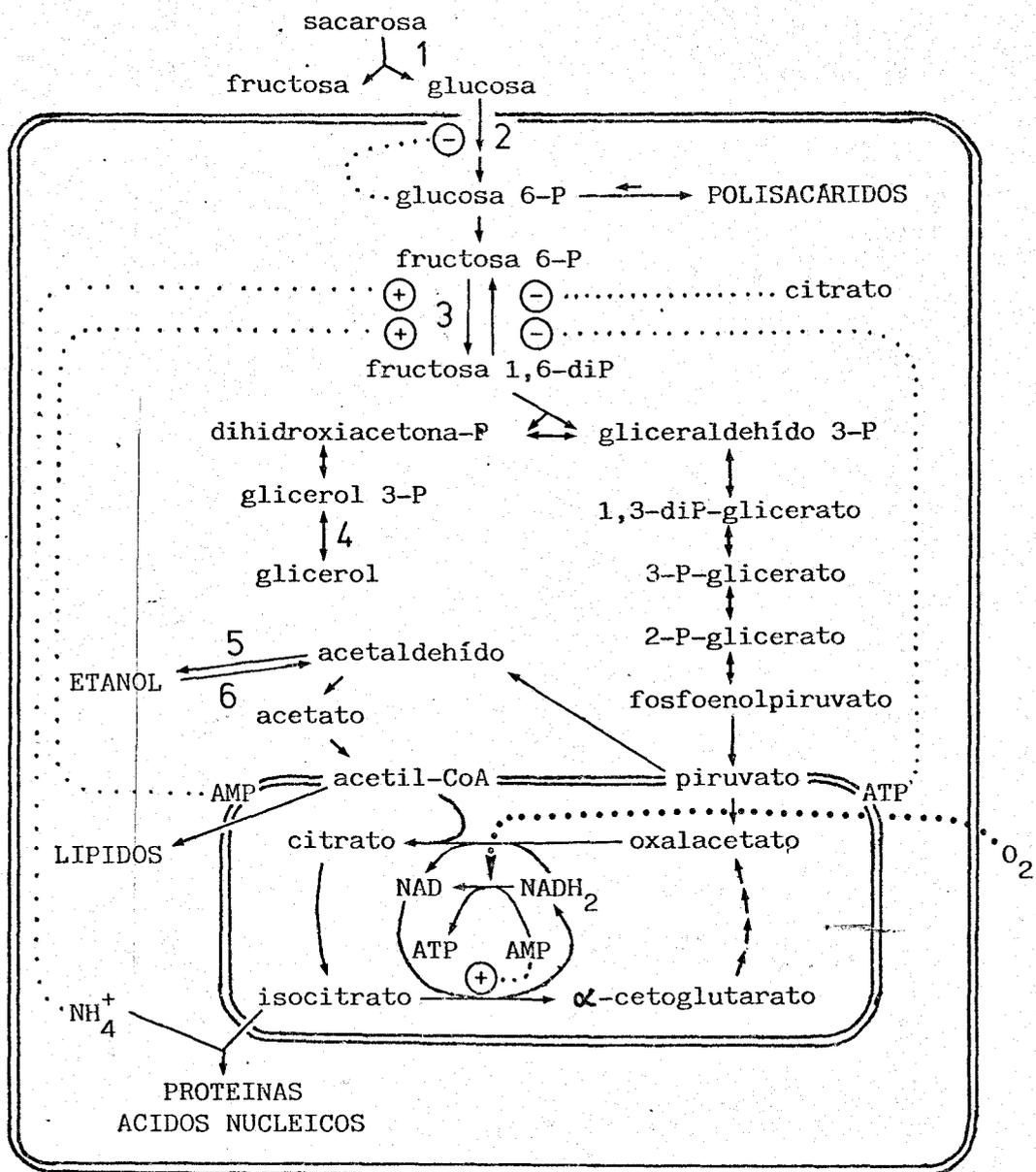


FIGURA 2. Metabolismo de los hidratos de carbono en *Saccharomyces*: Glicolisis, Ciclo de Krebs y Fosforilación Oxidativa. Se señalan algunos aspectos regulatorios y algunas enzimas importantes de la Glicolisis: (+): activación de la reacción por el metabolito señalado; (-): inhibición; 1: invertasa; 2: cinasa de las hexosas; 3: cinasa de la fosfofructosa; 4: deshidrogenasa del  $\alpha$ -glicerol-P; 5: deshidrogenasa del alcohol constitutiva (ADHI); 6: deshidrogenasa del alcohol reprimible por glucosa (ADHII). Las distintas reacciones quedan enmarcadas en la estructura celular donde tienen lugar (espacio periplásmico, citoplasma y mitocondria) (de Sols, 1967, ampliado).

por la vía de los ácidos tricarboxílicos que tiene lugar en las mitocondrias (Duntze et al., 1969; Wales et al., 1980). Ello también ocurre cuando se ha metabolizado a través de la glicolisis toda la glucosa y se desreprimen las enzimas de la respiración. Este ciclo va acoplado al NAD producido en la transferencia de electrones por la cadena respiratoria, sintetizándose ATP a partir de ADP y Pi y utilizando O<sub>2</sub> como último aceptor de electrones. Este proceso se conoce como la fosforilación oxidativa, y tiene también lugar en las mitocondrias (Sols et al., 1971).

Por último, el metabolismo de los carbohidratos está regulado por catabolitos (ver la revisión de Fraenkel, 1982) según dos tipos de procesos, que actúan a nivel de síntesis de ciertos enzimas (represión catabólica) (Ciriacy, 1979; Entian y Zimmermann, 1980), y a nivel de actividad enzimática (inactivación catabólica) (Gancedo y Gancedo, 1979).

## 5. LÍPIDOS DE Saccharomyces

Saccharomyces sintetiza e incorpora en sus membranas esteroides y fosfolípidos (Henry, 1982), aunque posee también triglicéridos, poliprenoles, esfingolípidos y glicolípidos (Hunter y Rose, 1971). En este capítulo se describen algunos aspectos del metabolismo y regulación de los ácidos grasos (elementos esenciales de los fosfolípidos y triglicéridos), fosfolípidos y esteroides, que son los principales componentes lipídicos de Saccharomyces.

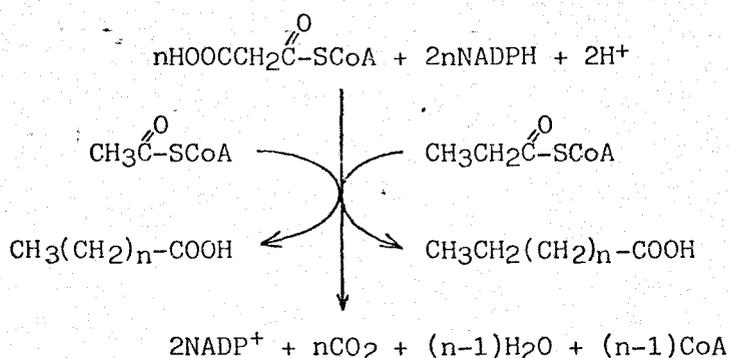
### 5.1. Estructura y biosíntesis

#### 5.1.1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos de cadena larga, son los principales componentes de los lípidos polares de membranas, y de los triglicéridos, lípidos de almacenamiento de grasas de microorganismos (Erwin, 1973). Básicamente, se distinguen dos clases de ácidos grasos: los saturados, compuestos de cadena hidrocarbonada saturada

y los insaturados, cuya cadena hidrocarbonada posee algún doble enlace. Los ácidos grasos monoinsaturados son, tanto en bacterias como en eucariotas, de configuración "cis" (Erwin, 1973). En S. cerevisiae los ácidos monoinsaturados palmitoleico (16:1) y oleico (18:1) son junto con los saturados palmítico (16:0) y esteárico (18:0) los ácidos grasos mayoritarios\*.

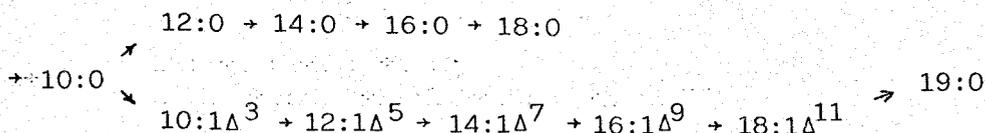
La formación de "novo" de ácidos grasos de cadena larga está catalizada en levaduras por el sistema de la sintetasa de los ácidos grasos, complejo enzimático multifuncional, localizado en el citoplasma como agregado no membranoso (Lynen, 1969, 1980; Stoops et al., 1978), que actúa condensando secuencialmente unidades de malonil-CoA. El malonato proporciona todos los átomos de carbono de las cadenas de los ácidos grasos a excepción de los dos metilos terminales, que son suministrados o por el acetato en el caso de los ácidos grasos de número par de átomos de carbono (caso de Saccharomyces), o por el propionato en el caso de los de número impar (Keith et al., 1973), según el esquema (Erwin, 1973):



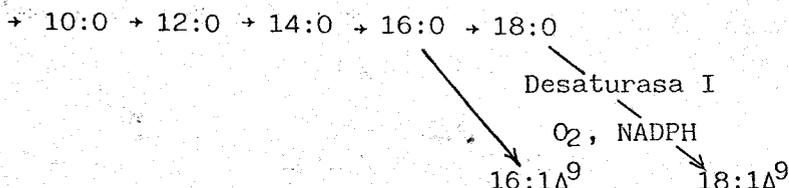
\* Las connotaciones del tipo 18:1 $\Delta^9$  que aparecen en esta Tesis significan que el ácido graso en cuestión posee 18 átomos de carbono y 1 doble enlace que en este caso está entre el carbono 9 y 10.

En Saccharomyces se forma directamente ácido palmítico y a partir de éste, esteárico, según una ruta lineal. De estos y a diferencia de Escherichia coli. (donde la desaturación y elongación de los ácidos grasos es integral, ya que no existen complejos enzimáticos multifuncionales) (Prescott y Vagelos, 1972; Silbert, 1975), se forman los ácidos palmitoleico y oleico, por el sistema Desaturasa I (Bloomfield y Bloch, 1960). Este sistema cataliza la desaturación directa de los componentes acil-CoA de cadena larga a sus análogos insaturados entre los carbonos 9 y 10 (Jones et al., 1969) y requiere O<sub>2</sub> y NADPH como cofactores. El O<sub>2</sub> no puede ser sustituido por otros aceptores artificiales de electrones (Bloomfield y Bloch, 1960). Todo esto se resume en los siguientes esquemas (Keith et al., 1973):

- E. coli:

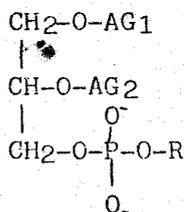


- S. cerevisiae:

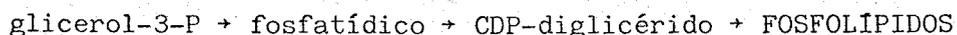


### 5.1.2. Fosfolípidos

Los ácidos grasos se encuentran en su mayor parte en forma de triglicéridos (triesteres del glicerol con 3 ácidos grasos de cadena larga) y fosfolípidos (diesteres sustituidos del ácido sn-glicero-3-P con dos ácidos de cadena larga), de la forma:

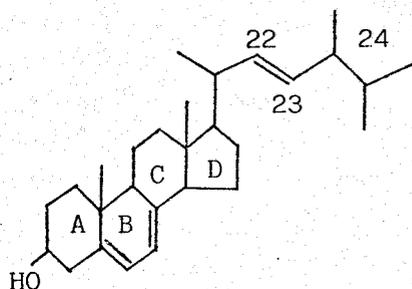


AG<sub>1</sub> suele ser un ácido graso saturado o insaturado. AG<sub>2</sub> es generalmente insaturado y R una base nitrogenada, un hidrógeno o un azúcar, según el fosfolípido sea fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina o cardiolipina (Erwin, 1973). Su síntesis comienza con la acilación del glicerol-3-P con dos cadenas de ácidos grasos para formar ácido fosfatídico. Este, junto con citidíntrifosfato (CTP), produce CDP-diglicérido, precursor de los fosfolípidos de levaduras (Steiner y Lester, 1972; Bell y Colemann, 1980; Henry, 1982):



### 5.1.3. Esteroles

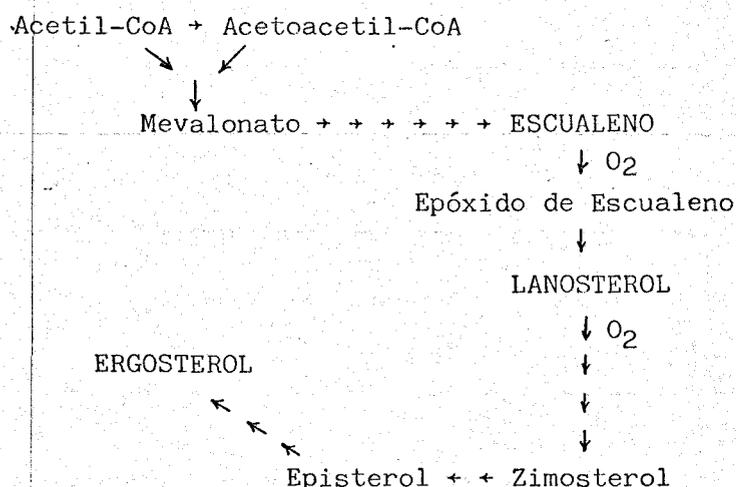
Su estructura está basada en el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. El componente esterólico fundamental en levaduras es el ergosterol:



Aunque se han aislado alrededor de 20 esteroles, todos ellos son intermediarios en la ruta biosintética del ergosterol (Parks, 1978). Las diferencias entre el ergosterol y el colesterol (esterol animal), ausente en levaduras, son el doble enlace entre los carbonos 22 y 23 de la cadena lateral, el grupo metilo adosado al carbono 24, y el sistema dieno conjugado del anillo B.

La biosíntesis del ergosterol se describe en las revisiones de Goodwin (1973), Parks (1978) y Schroepfer (1981). El ergosterol, al igual que el colesterol, deriva del acetato, vía acetil-CoA.

Este es precursor del ácido mevalónico, que en una serie de reacciones similares a las de la biosíntesis del colesterol, es convertido en escualeno. Aunque la síntesis de escualeno ocurre anaeróbicamente en levaduras (Henry, 1982), la conversión de escualeno en ergosterol requiere O<sub>2</sub> en dos pasos: la epoxidación del escualeno para formar epóxido de escualeno y la demetilación del lanosterol para formar zimosterol. La biosíntesis del ergosterol se resume en el siguiente esquema (Parks, 1978):



Los mutantes alterados en algún paso de la ruta biosintética del ergosterol son fáciles de aislar por presentar resistencia a antibióticos poliénicos, como la nistatina. En esta Tesis se ha utilizado la resistencia a nistatina como indicador de la presencia o ausencia de ergosterol en determinadas estirpes (Woods, 1971).

## 5.2. Efecto de las condiciones de crecimiento sobre la composición lipídica

La composición lipídica de levaduras no es constante sino que varía con las condiciones de crecimiento. La regulación de su composición es un factor fundamental en el mantenimiento de las propiedades fisiológicas de las membranas celulares. En el caso de los ácidos grasos, ésta puede darse tanto a nivel de síntesis (elongación y desaturación de sus cadenas) como de distribución

e incorporación en los fosfolípidos de membranas. Entre los factores que influyen en la composición lipídica se encuentran la edad del cultivo celular, la temperatura y el oxígeno, que se detallan a continuación, y los alcoholes (ver apartado 7), el pH, la fuente de carbono, el nitrógeno, y otros compuestos (Ratray et al., 1975).

#### 5.2.1. Edad del cultivo

En sistemas cerrados, tales como los cultivos discontinuos, la composición del medio es modificada continuamente. afectando de un modo directo la composición lipídica de levaduras. Así, en S. cerevisiae, los lípidos totales decrecen progresivamente a expensa de los triglicéridos (Ratray et al., 1975). En Candida utilis aparecen diferentes proporciones de fosfolípidos con la edad del cultivo, aumentando las cantidades de ácidos linoléico y linolenico, lo que conlleva un aumento del grado de insaturación de sus ácidos grasos (Dawson y Craig, 1966), mientras en S. cerevisiae (Beaven et al., 1982) o en Megasphaera elsdenii (Johnston y Goldfine, 1982) éste último parámetro disminuye. También en S. cerevisiae en cultivo continuo (Hunter y Rose, 1972) la proporción de ácidos grasos de 16 átomos de carbono y el grado de insaturación aumentan al disminuir la tasa de crecimiento. La edad del cultivo afecta igualmente a la composición esterólica en S. cerevisiae, donde la concentración de ergosterol aumenta drásticamente al final de la fase exponencial (Bailey y Parks, 1975).

#### 5.2.2. Temperatura

La temperatura es otro factor que influye considerablemente en la composición lipídica (Farrel y Rose, 1967). Sus principales efectos son un aumento de grado de insaturación de los ácidos grasos, cuando la temperatura de incubación es inferior a la óptima y viceversa, cuando es superior. Estos fenómenos han sido descritos en S. cerevisiae (Hunter y Rose, 1972), C. utilis (Hunter y Rose, 1971), Neurospora (Martin et al., 1981), E. coli (Marr e Ingraham, 1962) Agmenellum cuadruplicatum (Olson e Ingram, 1975), Veilonella parvula y Megasphaera elsdenii (Johnston y Goldfine, 1982) e,

incluso, en membranas mitocondriales (van den Thillart y de Bruin, 1981).

El análisis del control de este sistema por la temperatura se ha hecho fundamentalmente en bacterias. Bacillus cuando se cultiva a 30°C es incapaz de desaturar exógenamente ácido palmítico suplementado al medio, pero sí puede hacerlo a 20°C, aparentemente como resultado de una inducción enzimática a baja temperatura (Fulco, 1969). Sinensky (1971) observó que uno de los pasos en la utilización de los ácidos grasos para la biosíntesis de fosfolípidos es controlado por la temperatura en E. coli. Este control es a nivel de actividad enzimática y no a nivel de síntesis. Okuyama et al. (1977) observaron también, que dependiendo de la temperatura, el sistema aciltransferasa de E. coli incorporaba proporciones variables de ácidos oleico y palmitoleico en el ácido fosfatídico. Además de esta regulación por la temperatura de la incorporación de los ácidos grasos en los fosfolípidos de membrana, existe una regulación de la composición de ácidos grasos a nivel de síntesis. Así, Cronan (1975) observó que E. coli sintetiza ácidos grasos con distintos grados de saturación en función de la temperatura.

### 5.2.3. Oxígeno

La presión de O<sub>2</sub> también afecta directamente a la proporción de ácidos grasos saturados. Jollow et al. (1968) observaron que esta proporción aumenta en S. cerevisiae cultivado en anaerobiosis, particularmente los de cadena corta (de 10 a 14 átomos de carbono). También en C. utilis en cultivo continuo, aumenta el grado de saturación y se acorta la longitud de las cadenas cuando disminuye la presión de O<sub>2</sub> (Brown y Rose, 1969). Por otra parte, S. cerevisiae cuando se cultiva en anaerobiosis estricta se hace auxótrofo para los ácidos grasos insaturados y para el ergosterol (Jollow et al., 1968).

### 5.3. El papel de los lípidos en las membranas

En este apartado se describe el papel de los diferentes ácidos grasos (componentes de los fosfolípidos de membrana) y de los distintos esteroides en las propiedades físicas de éstas. Las membranas de los organismos están compuestas básicamente de lípidos y proteínas además de agua, hidratos de carbono e iones. La proporción de proteínas es muy variable de unas membranas a otras y se encuentran entre los lípidos, que forman la matriz. La funcionalidad de las membranas depende en gran parte de sus lípidos (Cronan, 1975) ya que estos imponen limitaciones físicas sobre las proteínas de membrana, restringiendo su actividad enzimática (Keith *et al.*, 1973).

Todos los factores que afectan a la composición lipídica de los organismos, modifican la composición de las membranas y con ello la fluidez. No obstante, existen factores químicos y físicos que actúan directamente sobre la fluidez y estabilidad de las membranas. Los ejemplos más conocidos son el aumento de la fluidez de las membranas con la temperatura (Ranck *et al.*, 1974), y la desestabilización por iones caotrópicos (Hatefi y Hanstein, 1974), ya que estos debilitan las interacciones hidrofóbicas, produciendo incluso lisis celular, como ocurre en *E. coli* (Ingram, 1981).

Las membranas poseen un "punto de fusión" característico correspondiente a la "temperatura de transición" por encima de la cual pasan endotérmicamente de una estructura "gel cristal" al estado fluido fisiológico "líquido cristal". Esta temperatura de transición depende de tres factores fundamentales: la longitud de las cadenas de los ácidos grasos, el grado de insaturación de estas cadenas y la composición esteróica (Chapman *et al.*, 1974), cuyos efectos se describen a continuación.

#### 5.3.1. Longitud de las cadenas de los ácidos grasos

Cuanto mayor es la longitud de las cadenas de los ácidos grasos, mayor es la temperatura de transición de las membranas

que los contienen (Cronan y Gelmann, 1975). Este fenómeno se ha observado en membranas de E. coli y Acholeplasma laidlawii (Cronan, 1978). Keith et al. (1973) encontraron que mutantes de levaduras auxótrofos para los ácidos grasos saturados cultivados en presencia de ácido esteárico (18:0) no podían crecer a 30°C, pero sí a 35°C, lo que implica que a 30°C las membranas con esteárico no eran suficientemente fluidas.

### 5.3.2. Grado de insaturación de los ácidos grasos

Cuanto mayor es el grado de insaturación de los ácidos grasos menor es el punto de fusión de las membranas (Cronan, 1975). Baldassare et al. (1976), estudiando un doble mutante de desaturación de los ácidos grasos en E. coli, observaron que cuando lo suplementaban con ácido 18:1 $\Delta^{11}$  cis, disminuía la temperatura de transición de sus membranas. Ello viene determinado por la mayor fluidez que los dobles enlaces confieren a los ácidos grasos y depende de la posición del doble enlace en la cadena de los mismos (Gunstone, 1967; Keith et al., 1973). El punto de fusión de las membranas es más bajo cuanto más cerca del centro de la cadena de los ácidos grasos se encuentra situado el doble enlace o bien cuando éste se encuentra en configuración "cis" en vez de "trans" (Keith et al., 1973). Así, por ejemplo, mutantes de levaduras auxótrofos para ácidos grasos pueden crecer en medio suplementado con ácido 18:1 $\Delta^9$  cis (temperatura de transición = 10°C) y no con el 18:1 $\Delta^9$  trans (temperatura de transición = 45°C). Todo esto sugiere la existencia de correlación entre la temperatura óptima de crecimiento de un organismo y el punto de fusión de sus membranas (Keith et al., 1973).

### 5.3.3. Esteroles

La composición esterólica de las membranas influye también en el grado de funcionalidad y fluidez de éstas (Cobom y Haslam, 1973). La sola presencia de esteroles cambia sus propiedades físicas como ocurre en el caso de E. coli; cuyas membranas son más rígidas cuando poseen colesterol (Eaton et al., 1981). Pero

cada esteroles confiere propiedades distintas (Lees et al., 1980). Así, en S. cerevisiae el ergosterol es el que confiere mayor funcionalidad; aunque, esteroides muy parecidos, como el epicolastenol, pueden suplir al ergosterol, produciendo efectos similares sobre el crecimiento (Proudlock et al., 1968). Sin embargo, variaciones sólo conformacionales como las del 20-isoergosterol, tiene efectos negativos sobre las levaduras, cuando éste sustituye a su isómero el ergosterol en sus membranas (Nes et al., 1978). Otros casos del efecto de los distintos esteroides en las membranas de S. cerevisiae son la mayor estabilidad de los esferoplastos en medios hipotónicos (Hossack y Rose, 1976) y la mayor incorporación de ácidos grasos en los fosfolípidos de las membranas (Buttke et al., 1980) observados sólo cuando las células son cultivadas en anaerobiosis suplementadas con ergosterol, estigmasterol o  $\beta$ -sitosterol y no con otros esteroides como el colesterol o 7-dehidrocolesterol.

## 6. LAS FUNCIONES MITOCONDRIALES Y LA MUTACIÓN "PETITE"

Las mitocondrias son orgánulos membranosos especializados en la respiración y la fosforilación oxidativa, que poseen su propio sistema genético y su propia maquinaria de síntesis de proteínas. La gran mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas por genes nucleares y sintetizadas por ribosomas citoplásmicos siendo transportadas posteriormente a las mitocondrias. Estas proteínas son: las componentes de la matriz mitocondrial, la mayor parte de las proteínas de la membrana interna y la mayor parte de las proteínas necesarias para la replicación, transcripción y traducción del ADN mitocondrial (Schatz y Mason, 1974). Los genes mitocondriales codifican alrededor del 5% del total de las proteínas mitocondriales, probablemente no más de una docena de polipéptidos hidrofóbicos (Schatz y Mason, 1974): tres subunidades del complejo citocromo c oxidasa, una de las siete del citocromo  $bc_1$  y tres de las diez de la ATPasa, además de los ARNt y ARNr

usados en la síntesis de proteínas mitocondriales (Borst y Grivell, 1978). Así, el ensamblaje de las membranas mitocondriales depende de las proteínas codificadas por ADN mitocondrial y por ADN nuclear (Brown y Beattie, 1978).

Entre los mutantes de funciones mitocondriales que pueden obtenerse destacan los citoplásmicos "petite" ( $\rho^-$ ), incapaces de respirar cualquier tipo de sustrato oxidable. Este tipo de mutación suele ocurrir espontáneamente con una tasa elevada (de 1 a 2% por célula y generación) o puede inducirse espontáneamente con bromuro de etidio (Slonimski, et al., 1981), acriflavina y por cualquier mutágeno clásico como la nitrosoguanidina, irradiación con ultravioleta, calor, ... (Dujon, 1981). Los mutantes "petite"  $\rho^-$  son normalmente mutantes que han sufrido delección de alrededor del 50% del ADN mitocondrial aunque se han obtenido algunos con sólo el 0,1%. No obstante, poseen la misma cantidad de ADN mitocondrial que la estirpe silvestre, debido a una duplicación en tandem del ADN no delecionado. La distribución de los genes a lo largo del ADN mitocondrial hace prácticamente imposible que una delección del 50% o más de este ADN no afecte a genes de la síntesis de proteínas. En consecuencia todos los mutantes petites citoplásmicos han perdido la capacidad de sintetizar proteínas mitocondriales (Borst y Grivell, 1978).

## 7. EFECTOS DE LOS ALCOHOLES SOBRE BACTERIAS Y EUCARIOTAS

### 7.1. Efectos generales

Se ha descrito una gran variedad de efectos producidos por el etanol en las células. Además de ser un agente desnaturalizador de proteínas, se le conocen efectos mutagénicos inductores de mutación "petite"  $\rho^-$  (Bandas y Zakharov, 1980), de cambio de estructura en ácidos nucleicos y partículas ribosómicas que afectan a la traducción del código genético "in vitro" (So y Davies, 1964),

efectos activadores de la muerte celular (Leao y Van Uden, 1982a; Loureiro y Van Uden, 1982) efectos inhibidores del transporte de glucosa, glucosamina y arginina (Thomas y Rose, 1979), de la producción de biomasa (Wasungu y Simard, 1982), del crecimiento, la fermentación, viabilidad (Aiba et al., 1968; Nagodawithana y Steinkraus, 1976), etc.

En S. cerevisiae casi todo el azúcar fermentable se convierte en etanol, en una proporción que depende de las condiciones y estirpes. El etanol producido regula de forma retroinhibitoria determinadas enzimas glicolíticas, especialmente la cinasa de las hexosas y la deshidrogenasa del  $\alpha$ -glicero-P (Augustin et al., 1965; Nagodawithana et al., 1977). Esta inhibición es no competitiva (afecta a la velocidad máxima pero no a la afinidad de los enzimas por el sustrato) con un valor de la constante de inhibición del etanol,  $K_i$ , para la cinasa de las hexosas mayor que para la deshidrogenasa del  $\alpha$ -glicero-P. Esto explicaría que al comienzo de la fermentación se forme glicerol y etanol a partir de la glucosa, y en etapas tardías, en que el etanol es suficientemente abundante, la deshidrogenasa del  $\alpha$ -glicero-P sea inhibida, produciéndose principalmente etanol hasta que la cinasa de las hexosas también es inhibida (Nagodawithana et al., 1976). Leao y Vaun Uden (1982b) han observado que cuando S. cerevisiae se cultiva en presencia de etanol y otros alcoholes, el transporte de glucosa es inhibido también de forma no competitiva.

Todo ello explica el que tanto la fermentación como el crecimiento sean inhibidos no competitivamente por etanol en S. cerevisiae (Aiba et al., 1968).

No obstante, el grado de inhibición que produce el etanol depende aparentemente de que éste sea producido por la propia célula o de que sea añadido externamente al medio de cultivo. Esto es debido a que la concentración de etanol intracelular es superior a la extracelular en las primeras horas de la fermentación, según se ha observado en S. carlsbergensis (Navarro y Durand, 1978; Navarro, 1980) y S. cerevisiae (Nagodawithana y Steinkraus, 1976;

Novack et al., 1981; Beaven et al., 1982). Cuando se alcanza un máximo en la concentración de etanol interna, la tasa de producción disminuye, equilibrándose las concentraciones de etanol interna y externa, por difusión. Ello explica el que Novack et al. (1981) observaran que la fermentación en S. cerevisiae poseía una  $K_i$  de 10,5% p/v cuando el etanol era suplementado al medio y de 3,8% p/v cuando era producido por la propia célula (la  $K_i$  se expresa en ambos casos como concentración de etanol medida en el medio de cultivo). Nagodawithana y Steinkraus (1976) también observaron que cuando S. cerevisiae se cultivaba en condiciones de alta concentración de biomasa inicial ("fermentación rápida") producían 9,5% v/v etanol en 3 h, descendiendo la viabilidad celular, mientras que con poca biomasa inicial esta concentración de etanol se alcanzaba a las 6 h sin afectar a la viabilidad celular; esto era debido a que en el primer caso la alta tasa de producción permitía que se alcanzara una concentración interna de etanol 10 veces superior a la del segundo.

Por último, la inhibición producida por el etanol sobre la tasa de crecimiento y la de fermentación ha sido expresada de diferentes formas, dependiendo de los organismos, estirpes y condiciones de cultivo, destacando entre las relaciones descritas, las de tipo lineal en Bacterium lactis aerogenes (Hinshelwood, 1946), Kluyveromyces marxianus (Bajpai y Margaritis, 1982) y S. cerevisiae (Holzberg et al., 1967; Wasungu y Simard, 1982), y las de tipo exponencial también S. cerevisiae (Aiba et al., 1968) y Candida pseudotropicalis (Moulin et al., 1980).

## 7.2. Efecto sobre las membranas

El etanol, como otros alcoholes, afecta directamente a la fluidez de las membranas (Hui y Barton, 1973) de forma análoga a los cambios proporcionados por la temperatura (Ingram et al., 1980). El etanol, compuesto anfipático, aumenta la fluidez de las membranas, al interaccionar con los fosfolípidos de ésta

(Paterson et al., 1972), y debilitar las interacciones hidrofóbicas entre lípidos y proteínas, alterando así su funcionalidad (Ingram, 1981). Un ejemplo bastante estudiado es el de la ATPasa dependiente de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, complejo enzimático unido a lípidos de membrana que necesita de fosfolípidos para ser activa (Tanaka y Strickland, 1965), que en presencia de alcoholes se desnaturaliza debido a un efecto directo de éstos sobre los fosfolípidos (Barnett y Grisham, 1972).

El efecto de los alcoholes es diferente si éstos son de 4 ó menos átomos de carbono que si son de 5 ó más. Así, mientras los primeros hacen perder totalmente la habilidad de orientación de los lípidos, los últimos sólo afectan parcialmente esta característica (Grisham y Barnett, 1973) o por ejemplo, mientras en E. coli los primeros inhiben la entrada de β-galactósido en la célula a través de una permeasa (Fried y Novick, 1973) los últimos la activan (Sullivan et al., 1974). Según Ingram y Vreeland (1980) estas diferencias serían debidas a que en los alcoholes de cadena corta son más importantes los efectos de la alta concentración molar de puentes de hidrógeno de los grupos hidroxilos con los lípidos de su entorno (reemplazando en algunos casos los de las moléculas de agua), mientras que en los de cadena larga, dominarían los efectos de la cadena acílica.

Los organismos alteran la composición lipídica de sus membranas cuando crecen en presencia de alcoholes, compensando el efecto de las interacciones fisicoquímicas directas de estos con los lípidos de membrana (Ingram, 1976). Esta alteración depende, lógicamente, de que el alcohol en cuestión sea de 4 ó menos carbonos, (estos producen alteraciones en la composición lipídica opuestas a las que producen las altas temperaturas) o de 5 ó más (alteraciones similares a las altas temperaturas) (Ingram y Vreeland, 1980). En E. coli (Ingram, 1976) y S. cerevisiae (Beaven et al., 1982) aumentan el grado de insaturación de sus ácidos grasos cuando son cultivadas en presencia de etanol, como consecuencia de un

aumento de la proporción de ácidos 18:1 y una disminución de los 16:0. Este aumento del grado de insaturación se debe en E. coli, donde se ha estudiado, a que la síntesis de ácidos grasos saturados es inhibida por el propio etanol (Buttke e Ingram, 1980). Además se han descrito alteraciones en la proporción de los fosfolípidos de las membranas de E. coli (Ingram, 1977), Zymomonas mobilis (Carey e Ingram, 1983), membranas mitocondriales de células hepáticas de ratas (Schilling y Reitz, 1980) o membranas sinápticas de cobayas (Sun y Sun, 1983), cuando estos organismos son tratados con etanol.

Las alteraciones en la composición lipídica de las membranas de los organismos por alcoholes podría explicarse como una respuesta adaptativa de la célula a los efectos físicos que éstos ejercen sobre los lípidos de membrana, permitiendo así que la funcionalidad de éstas se mantenga. Un caso muy ilustrativo es el de la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ; en ratas crecidas con administración crónica de etanol la enzima no es afectada por concentraciones de etanol que sí inhiben la ATPasa de ratas crecidas sin etanol. La resistencia se debe a un aumento de fosfolípidos cargados negativamente en las membranas de las primeras (Wescott y Weiner, 1983). En algunos casos se puede concretar cómo una determinada alteración en la composición lipídica, contrarresta el efecto físico de los alcoholes sobre las membranas, como el caso del aumento del grado de saturación de los ácidos grasos de E. coli crecida en presencia de hexanol, donde la fluidez proporcionada por éste es contrarrestada por la rigidez que los ácidos grasos saturados proporcionan a las membranas (Ingram, 1976). Sin embargo, hay bastantes casos en los que no está clara la existencia de un mecanismo por el que una determinada alteración pudiera compensar el efecto físico de los alcoholes, como puede ser el caso de los alcoholes de 4 o menos átomos de carbono.

## 8. TOLERANCIA A ETANOL EN DIFERENTES ORGANISMOS

### 8.1. Base fisiológica

Se sabe poco sobre la base fisiológica por la que algunos organismos como Saccharomyces son más tolerantes a etanol (respecto del crecimiento, la fermentación u otros procesos) que otros, o incluso que dentro de una misma especie como S. cerevisiae existan estirpes más tolerantes que otras (Benítez et al., 1983).

Por ser la membrana el primer componente celular que entra en contacto con el etanol ha sido ampliamente estudiado el efecto de la diferente composición lipídica de las membranas sobre la tolerancia al etanol. Hayashida et al. (1974, 1975) observaron que cuando Saccharomyces saké se cultiva anaeróticamente en medio suplementado con ácidos grasos insaturados, especialmente ácido linoleico, tiene lugar mayor producción de etanol y una mayor durabilidad de la capacidad fermentativa celular. Cuando S. saké (Hayashida et al., 1976), S. cerevisiae Hansen y S. carlsbergensis (Hayashida y Ohta, 1981) se cultivan también anaeróticamente en medios suplementados con proteolípidos de Aspergillus orizae (el 77,5% de sus ácidos grasos son insaturados, especialmente ácido linoleico), se mejora la producción de etanol y la viabilidad celular en presencia de etanol, observándose un aumento de la proporción de ácido linoléico entre sus lípidos. Similares resultados se han encontrado en Kluyveromyces fragilis que produce más etanol cuando se cultiva anaeróticamente con ácidos grasos insaturados y ergosterol (Janssens et al., 1983). En S. cerevisiae se ha observado que sus células son más viables en tampón con etanol cuando han sido enriquecidas con ergosterol o estigmasterol y residuos linoléicos que cuando lo han sido con colesterol o campesterol y residuos oleicos (Thomas et al., 1978). En este último caso disminuye la entrada de glucosa, glucosamina y arginina en la célula (Thomas y Rose, 1979) y aumenta la concentración intracelular de etanol (Rose y Beaven, 1982).

La magnitud del aumento de fluidez que el etanol proporciona a membranas artificiales (0,67 M de etanol confiere igual aumento que 1°C) (Ingram et al., 1980) no correlaciona con la resistencia al etanol ni con el cambio en la composición de ácidos grasos cuando E. coli crece en presencia de etanol (Ingram, 1976). La mayor tolerancia a etanol conferida por los ácidos grasos insaturados, o el aumento de su proporción, en células crecidas en presencia de etanol, no debe ser un proceso casual, sino que ha de jugar un importante papel en la tolerancia al etanol (Ingram et al., 1980). Igualmente los esteroides, especialmente el ergosterol han de poseer un importante papel en la tolerancia al etanol, según se desprende de los trabajos citados de Thomas, o bien de los de Lees et al. (1980) quienes trabajando con mutantes *erg* alterados en la ruta de biosíntesis del ergosterol, observaron que algunos de ellos estaban afectados en la tolerancia al etanol, y de Larue et al. (1980) quienes observaron una mejora en la capacidad fermentativa de las levaduras cuando se aumenta su concentración de esteroides. En definitiva, la composición lipídica de las membranas juega un importante papel en la tolerancia al etanol.

### 8.3. Base genética

Existen muy pocos trabajos acerca de la genética de la tolerancia a etanol. En Saccharomyces se ha descrito, a partir de estirpes naturales, que la tolerancia está basada en un sistema poligénico, donde existen genes modificadores de la tolerancia de las células (Ismail y Ali, 1971; Day et al., 1975). Sin embargo, no existe ningún trabajo genético a partir de mutantes obtenidos en laboratorio. Estos de hecho, son muy escasos: sólo hay descritos algunos mutantes de E. coli más resistentes a lisis celular por etanol que el tipo silvestre (Fried y Novick, 1973; Ingram y Vreeland, 1980) y otros de S. uvarum, obtenidos en cultivo continuo, que poseen mayor tasa de fermentación que el tipo silvestre, en presencia de etanol (Brown y Oliver, 1983).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. ESTIRPES

Las estirpes utilizadas en este trabajo aparecen descritas en la Tabla I. La nomenclatura empleada para la designación de genotipos se basa en las recomendaciones elaboradas en la "IV International Conference on Yeast Genetics", recogidas en el Yeast Genetics Supplement (Microbial Genetics Bulletin nº 31, 1969). Los genes se designan con tres letras que hacen referencia a la actividad fisiológica que determinan, seguidas de un número. Los alelos se designan con otro número separado del anterior por un guión. Los alelos cuyo fenotipo sea dominante se escriben con mayúsculas; los recesivos, con minúsculas. En este trabajo se utilizan las designaciones génicas siguientes:

- *LEU*, *THR*, *ADE*, *LYS* y *HIS*: son genes implicados en las rutas biosintéticas de los aminoácidos y bases a los que corresponde cada abreviatura. Las mutaciones en estos genes producen auxotrofia para ese aminoácido o base.

- *MAL*, *GAL* y *SUC* : son genes implicados en la fermentación de maltosa, galactosa y sacarosa, respectivamente.

- *MAT<sub>a</sub>* y *MAT<sub>α</sub>* : son alelos del gen *MAT* y determinan el sexo.

- *CUP*: es un gen que determina resistencia al cobre.

- *KAR*: son genes relacionados con la cariogamia. Las mutaciones en estos genes impiden la fusión nuclear tras la conjugación.

- *NYS*: son genes relacionados con la resistencia a nistatina.

- *ETA* : son genes relacionados con la tolerancia al etanol, descritos por primera vez en esta tesis.

- [*RHO*<sup>-</sup>], son mutaciones en el ADN mitocondrial que hacen a las células que las llevan defectuosas en la respiración.

Los signos adicionales que aparecen como superíndices en los fenotipos son: +: para los fenotipos silvestres; -: para los fenotipos mutantes; R: resistencia a un inhibidor; S: sensibilidad a un inhibidor.

TABLA I. Lista de estirpes utilizadas en este trabajo.

Denominación	Genotipo	Origen
S288C	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1	LCC
X2180-1A	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1	YGSC
AH88X	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 his	Esta Tesis
AH28X	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 his	" "
BE288-1	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 [RHO <sup>-</sup> ]	" "
BE288-SC	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1	" "
BE288-SP	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 [RHO <sup>-</sup> ]	" "
XW5/1-3C	MAT $\alpha$ leu1 thr1 nys <sup>R</sup> kar2	J. Polaina
XW5/1-3P	MAT $\alpha$ leu1 thr1 nys <sup>R</sup> kar2 [RHO <sup>-</sup> ]	Esta Tesis
D585-11C	MAT $\alpha$ lys1	CSH
X30/3C	MAT $\alpha$ ade2-1 his4 $\Delta$ 15	I.L. Calderón
PSA1	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta1	Esta Tesis
MSE1	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta2	" "
MSE2	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta3	" "
MSE3	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta4	" "
MSE4	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta5	" "
MSE5	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta6	" "
MSE6	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta7	" "
MSE7	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta8	" "
MSE8	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta9	" "
MSE9	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta10	" "
MSE10	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta11	" "
MSE11	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta12	" "
MSE12	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta13*	" "
MSE13	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta14*	" "
MSE14	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta15	" "
MSE15	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta14*	" "
MSE16	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta16*	" "
MSE17	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta17*	" "
MSE18	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta18	" "
MSE19	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta19*	" "
MSE20	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta20	" "
MSE21	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 etaA*	" "
MSE22	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 etaB*	" "
MDS1	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 etaC etaD	" "
DMSP-7	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta1 eta8 his	" "
DMSP-9	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta1 eta10	" "
DMS1-P	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta2 eta1 his	" "
DMS1-3	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta2 eta4	" "
DMS1-5	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta2 eta6	" "
DMS2-P	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta3 eta1	" "
DMS2-5	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 SUC1 eta3 eta6 his	" "
DMS3-P	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta4 eta1 his	" "
DMS3-4	MAT $\alpha$ mal gal2 SUC2 CUP1 eta4 eta5	" "

TABLA I. Continuación

Denominación	Genotipo	Origen
DMS3-7	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta4 eta8 his</i>	Esta Tesis
DMS3-9	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta4 eta10 his</i>	" "
DMS4-P	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta5 eta1</i>	" "
DMS4-7	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta5 eta8 his</i>	" "
DMS4-9	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta5 eta10 his</i>	" "
DMS5-P	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta6 eta1</i>	" "
DMS5-3	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta6 eta4 his</i>	" "
DMS5-4	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta6 eta5</i>	" "
DMS5-7	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta6 eta8 his</i>	" "
DMS8-P	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta9 eta1</i>	" "
DMS8-2	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta9 eta3 his</i>	" "
DMS8-4	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta9 eta5</i>	" "
DMS10-3	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta11 eta4</i>	" "
DMS10-9	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta11 eta10 his</i>	" "
DMS5-9	<i>MAT<math>\alpha</math> mal gal2 SUC2 CUP1 eta6 eta10</i>	" "
DA1	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> ade2-1/ADE2 his4-<math>\Delta</math>15/HIS4 LYS1/lys1</i>	" "
DS81 a DS83	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> mal/mal gal2/gal2 SUC2/SUC2 CUP1/CUP1</i>	" "

LCC: La Cruz del Campo, S.A.

YGSC: Yeast Genetics Stock Center, Berkeley

CSH: Cold Spring Harbor, New York

\*Estas mutaciones *eta* confieren además de sensibilidad a etanol del crecimiento, termo-sensibilidad a 37°C.

## 2. PRODUCTOS QUÍMICOS

Los productos químicos utilizados en este trabajo y su procedencia fueron los siguientes:

N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Nitrosoguanidina),  
Nistatina, Canavanina, Bromuro de Etidio, Antrona, Ergosterol,  
Pirogalol, NAD (Nicotinamin-adenin-dinucleótido), Deshidrogenasa del Alcohol, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

Helicasa, (Suc d'Helix pomatia), L'Industrie Biologique Française, Clichy, France.

Reactivo BF<sub>3</sub> -Metanol 14%, Supelco Incorporation Bellefonte, Pennsylvania, USA.

Metil-viológeno, Serva, Heidelberg, Alemania.

Ditionito sódico, E. Merck AG, Darmstadt, Alemania.

## 3. TAMPONES

En este trabajo se han empleado los tampones siguientes:

- Tampón Tris-Maleato.- Se preparó según Gomori (1955). Una solución 0,2 M de tris-maleato (24,2% de tris(hidroximetil)aminometano y 23,2% de ácido maleico en agua) se diluyó hasta 0,05 M con una solución de NaOH 0,02 M y agua destilada en las proporciones adecuadas para obtener un pH final de 7,8.

- Tampón fosfato monopotásico.- Una solución de fosfato monopotásico 67 mM fue mezclada con otra de ácido fosfórico 67 mM hasta conseguir un pH de 4,5 (Thomas et al., 1978).

- Tampón glicina-fosfato.- Se preparó una solución de pirofosfato sódico 75 mM, clorhidrato de semicarbácida 75 mM y glicina 21 mM, a pH 8,7.

#### 4. MEDIOS DE CULTIVO

El cultivo y mantenimiento de las estirpes se realizó en los medios siguientes:

##### 4.1 Medios líquidos

- Medio nutritivo (YEPD): Extracto de levadura (Difco), 1%; peptona, 2% y glucosa, 2% (Sherman et al., 1979). La glucosa se esterilizó por separado.

- Medio nutritivo con sacarosa (YEPS): Extracto de levadura (Difco) 1%; peptona, 2% y sacarosa en concentraciones que varían de 0 a 70% según los casos. La sacarosa se esterilizó por separado y se añadió al medio estéril.

- Medio nutritivo con etanol (YEPDE): Extracto de levadura (Difco), 2%; peptona, 4% y glucosa, 4%. Este medio se diluyó al 50% con una solución de etanol en agua en la cual la concentración de etanol era el doble de la concentración final en el medio.

- Medio mínimo (SD): "Yeast Nitrogen Base" sin aminoácidos (Difco), 0,67%; glucosa, 2%. La glucosa se esterilizó por separado.

- Medio mínimo con fuente de nitrógeno limitante: "Yeast Nitrogen Base" sin aminoácidos ni sulfato amónico (Difco), 0,17%; sulfato de amonio, 0,1%; glucosa, 2%. La glucosa se esterilizó por separado.

##### 4.2. Medios sólidos

- Medio nutritivo (YEPD): Igual que el descrito en el apartado anterior, suplementado con 2% agar.

- Medio mínimo (SD): Igual al descrito en el apartado anterior más 2% agar. En los casos necesarios se suplementó con aminoácidos y bases a las concentraciones indicadas por Sherman et al. (1979), con nistatina a concentraciones que variaron desde 0,5 a 20 mg/l, y con canavanina a una concentración de 60 mg/l.

- Medio nutritivo con etanol (YEPDE): Al medio nutritivo YEPD enfriado al máximo antes de la gelificación (unos 45°C), se añadió el etanol en la cantidad indicada en cada caso; las cajas se conservaron a 4°C en atmósfera de etanol.

- Medio de respiración (YEPG): Extracto de levadura (Difco), 1%; peptona, 2%; agar, 2%; glicerol, 2%.

- Medio de preesporulación (PRE): Extracto de levadura, 0,8%; peptona, 0,3%; agar, 2%; glucosa, 10%. La glucosa se esterilizó por separado.

- Medios de esporulación (SPO): Extracto de levadura, 0,1%; acetato potásico, 1%, glucosa 0,05%.

## 5. CRECIMIENTO

### 5.1. Condiciones de Cultivo

#### 5.1.1. Cultivos discontinuos en aerobiosis

Los medios líquidos fueron inoculados con una colonia de la estirpe deseada y se incubaron a 30°C con aireación intensa. Todos los experimentos que se describen en esta Tesis se realizaron de esta forma excepto cuando se indica otra cosa. Para determinar los parámetros de crecimiento, fermentación y respiración, se inocularon los medios donde iban a ser medidos, con células en fase estacionaria temprana provenientes de un cultivo en medio líquido YEPD a 30°C. A las 24 h de cultivo, cuando las células se encontraban en fase exponencial, se suspendieron entre  $0,8 \times 10^7$  y  $5 \times 10^7$  células en medios frescos y se hicieron las determinaciones correspondientes. Estos cultivos se incubaron a 22, 26, 30 y 37°C con o sin agitación horizontal según los casos. En general los experimentos se realizaron en tubos con capacidad total de 15 ml conteniendo 6 ml de medio.

### 5.1.2. Cultivos discontinuos en anaerobiosis

A partir de cultivos en medio YEPD incubados a 30°C con aireación, se inocularon tubos que contenían medio YEPDE con diferentes concentraciones de etanol. Estos tubos fueron herméticamente cerrados mediante tapón de caucho con cámara interna y se gasearon durante 15 min con argón o nitrógeno, previamente pasados por una solución de pirogalol al 20% p/v en una solución de KOH 20% p/v. Los tubos se cultivaron a 26°C con agitación horizontal y con una trampa de agua a través de una aguja que atravesaba el tapón. A las 24 h, tubos conteniendo medio nuevo eran inoculados con el mismo cultivo e incubados en iguales condiciones; en ellos se midieron el crecimiento y la fermentación.

### 5.1.3. Cultivo continuo

Para cultivo continuo se utilizó un Quimiostato New Brunswick BioFlo modelo C30, con una vasija de trabajo de 2 litros de capacidad, donde el volumen de cultivo con flujo continuo era de 1,7 litros. La vasija del medio nuevo que se iba añadiendo era de 13 litros. Las células se cultivaron en medio mínimo con fuente de nitrógeno limitante a 30°C con agitación continua de 400 rpm y aireación intensa con bomba de aire. El pH fue controlado con un pH-metro automático New Brunswick modelo pH-40. Las determinaciones correspondientes a cada tasa de dilución  $D$ , se realizaron cuando se había sobrepasado 4 veces el tiempo de residencia, a fin de asegurarse de que se había alcanzado el equilibrio en el quimiostato.

## 5.2. Determinación del número de células

### 5.2.1. Células totales

La concentración de células totales se estimó, por una parte, contando el número de células en un microscopio óptico, con una cámara de Petroff-Hausser (C.A. Hausser & Sons, Philadelphia, USA)

y por otra midiendo la densidad óptica a 660 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 (Baush & Lomb, Bélgica). En este último caso se estimó el número de células a partir de la correlación existente entre éste y la D.O. a 660 nm por la que entre 0,1 y 0,5 unidades de D.O. 660 nm cada 0.1 unidad equivale a  $6,05 \times 10^6$  células/ml (comprobado experimentalmente durante el desarrollo de esta Tesis).

### 5.2.2. Células viables

Se define célula viable como aquella capaz de formar colonia en medio YEPD sólido. El número de células viables de un cultivo o una suspensión se determinó sembrando una muestra del mismo en cajas con medio YEPD sólido realizando las diluciones adecuadas para obtener entre 100 y 200 colonias por caja. Tras incubar durante dos o tres días a 30°C, se contó el número de colonias crecidas. Para cada determinación se sembraron de tres a seis cajas de Petri y se calculó el valor medio.

## 6. FERMENTACIÓN

### 6.1. Determinación de la concentración máxima de etanol a la que es posible la fermentación

Se determinó a los 7 días de haber inoculado 0,2 ml de un cultivo en medio YEPD en fase estacionaria, en medio YEPDE suplementado con concentraciones de etanol que iban de 0 a 2,5 M. Se analizó la cantidad de sustrato carbonado que se había metabolizado en ese tiempo, a través del método de la antrona descrito en Materiales y Métodos, apartado 8.3.2.

### 6.2. Determinación de la tasa de fermentación

Se determinó por manometría de Warburg. Para ello se utilizó un aparato de Warburg modelo V-166 y vasijas manométricas de volumen calibrado con pocillo central. En cada vasija se introdujeron 3 ml de un cultivo en fase exponencial (D.O. 660 nm alrededor de 0,4). Una vez equilibrado el sistema se mantuvo a 25°C durante

20 minutos, transcurridos los cuales se determinó el incremento de la presión, debido al desprendimiento de  $\text{CO}_2$  por las células, en mm de Brodie. En todos los casos se utilizó un termobarómetro para controlar los cambios de presión debido a cambios de temperatura. La cantidad de  $\text{CO}_2$  desprendida se calculó a partir del incremento de presión y de la constante de las vasijas para las condiciones del experimento según Guerrero et al. (1974). Se obtuvo la tasa de fermentación,  $v$ , dividiendo los  $\mu\text{l}$  desprendidos de  $\text{CO}_2/\text{h}$  por la biomasa, expresada en número de células totales y viables. El valor de biomasa utilizado para este cálculo fue el que tenía el cultivo en el momento de comenzar a detectarse variación en la presión; para ello se determinó el número de células, tanto totales como viables, antes y después de realizar las medidas en los manómetros, obteniéndose por extrapolación el valor deseado.

En los casos en que se estudió fermentación en anaerobiosis se hizo pasar nitrógeno o argón a través de los manómetros, con las vasijas ya incorporadas, durante 15 minutos antes de cerrar el sistema. Previamente el nitrógeno y el argón fueron pasados por una solución del 20% p/v de pirogalol en 20% p/v de KOH.

## 7. RESPIRACION

La tasa de respiración fue determinada por manometría de Warburg. Se midió el consumo de  $\text{O}_2$  de las células de levadura, siguiendo los mismos procedimientos que los descritos para medir la tasa de fermentación con la diferencia de que en los pocillos centrales de las vasijas de Warburg se introdujeron 0,3 ml KOH 20% p/v para que absorbiera todo el  $\text{CO}_2$  producido por la fermentación. Se midió entonces la disminución de la presión en mm de líquido de Brodie y se determinó la tasa de respiración ( $\rho$ ) como los  $\mu\text{l}$  de  $\text{O}_2$  consumidos/ $10^6$  células.

## 8. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

### 8.1. Determinación de oxígeno

El oxígeno contaminante de los cultivos anaerobios se midió utilizando como indicador una solución 1 mM de metil-viológeno, previamente mantenido bajo atmósfera de argón durante 30 min para eliminar el oxígeno presente. Posteriormente se añadió una solución de 40 mg de ditionito sódico en 25 mg/ml de bicarbonato sódico, a las cubetas espectrofotométricas con la solución de metil viológeno, hasta que la D.O. a 600 nm alcanzó el valor de 1,0; el ditionito sódico es un componente limitante bajo estas condiciones ya que es saturante sólo a D.O. 2,8 (J. Luis Ramos, comunicación personal). A D.O. de 1,0 la concentración de oxígeno es 0. Por tanto cuando se alcanzó esta D.O. se inyectó el gas de la atmósfera de los cultivos bajo estudio dentro de las cubetas espectrofotométricas conteniendo el metil-viológeno y se midió nuevamente la D.O. a 660 nm en un espectrofotómetro Unicam SP1700 (Philips, Holanda); La concentración de O<sub>2</sub> se determinó a partir de los valores de D.O. de una curva patrón.

### 8.2. Determinación de etanol

#### 8.2.1. Método enzimático

El etanol se midió siguiendo básicamente el método descrito por Kaplan y Giotti (1957). Después de las diluciones apropiadas en tampón glicina-fosfato 50 mM pH 8,7 se añadieron a 2,8 ml. de muestra 0,1 ml de NAD 16 mM y 0,02 ml de una solución de 5 µg/ml de deshidrogenasa del alcohol (2.200 µ/ml). El incremento de la D.O. a 340 nm, debido al NADH formado, se midió en un espectrofotómetro Unicam SP 1700 (Philips, Holanda) hasta que se alcanzó una "meseta". La concentración de etanol se determinó comparando los valores de la D.O. de las muestras de cultivos con los de una curva patrón de etanol.

### 8.2.2. Método cromatográfico

En este caso el etanol se determinó mezclando 0,5 ml de cada muestra, convenientemente diluida, con 0,5 ml de una solución de isopropanol al 2% v/v. El contenido se midió en un cromatógrafo de gases HP5880A (Hewlett-Packard, USA) utilizando un colector de muestras automático HP7671 A. Como detector de ionización de llama se utilizó una columna de 1,8 m x 3,2 mm empaquetada con Supelco Porapak Q. El etanol fue cuantificado con el isopropanol como patrón interno. La columna operó isotérmicamente a 175°C con el detector a 250°C y el inyector a 225°C.

### 8.3. Determinación de azúcares

#### 8.3.1. Determinación de glucosa

La concentración de glucosa en los cultivos se determinó en un analizador de glucosa YSI 27 (Yellow Springs Instrument Co., Ohio, U.S.A.) con una membrana YSI 2365 de oxidasa de la glucosa de Aspergillus niger. Para ello se inyectaron 20 µl de cada muestra, diluida convenientemente, en el analizador, con una microjeringa Syringepet YSI 2361.

#### 8.3.2. Determinación de sacarosa

La sacarosa se determinó por el método de la antrona (Chung y Nickerson, 1954). Se añadió 1 ml de cada muestra, diluida convenientemente, sobre fracciones de 5 ml del reactivo (0,2 gr de antrona en una solución de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  al 75% v/v). Cada tubo se agitó energicamente; a continuación se mantuvieron en un baño hirviendo durante 10 min. Tras enfriarlos en un baño a 0°C se determinó el color desarrollado midiendo la D.O. a 540 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 (Baush & Lomb, Bélgica), comparando los resultados obtenidos con una curva patrón de sacarosa entre 10 y 100 µg.

## 8.4. Determinación de lípidos

### 8.4.1. Determinación de ácidos grasos

Se tomaron 50 ml de cultivos en fase estacionaria temprana, incubados a 30°C, se centrifugaron y se liofilizaron a -50°C en tubos Pyrex. Tras la liofilización se determinó el peso de la muestra liofilizada. Los lípidos totales fueron extraídos según el método de Taylor y Parks (1978). Para ello se añadieron 2,5 ml de dimetil sulfóxido por muestra. Los tubos se incubaron en un baño de agua a 100°C durante una hora. Tras enfriarlos se añadieron 2,5 ml de cloroformo y se mantuvieron durante una noche a 4°C. Después se añadieron 2,5 ml de cloroformo y 2,5 ml de agua destilada. La mezcla se agitó fuertemente, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y se tomó la fase clorofórmica que contenía los lípidos celulares totales. A partir de aquí se utilizó como control un tubo con una solución de 10 mg de aceite de algodón (Supelco, USA) por ml de cloroformo.

Los tubos con la fase clorofórmica se lavaron dos veces con ClK 2M y se desecaron bajo un flujo de nitrógeno. Finalmente se mantuvieron durante unos minutos al vacío sobre  $\text{SO}_4\text{Ca}$  desecante.

Los ácidos grasos fueron analizados como sus derivados estéricos metilados, utilizando el reactivo  $\text{BF}_3$ -metanol (Ackman, 1977). Se utilizó un método basado en el de Metcalfe y Schmitz (1961), (Neil Burris, comunicación personal). Para ello se añadieron sobre los lípidos totales desecados 2 ml del reactivo  $\text{BF}_3$ -metanol 14% y 50  $\mu\text{l}$  de una solución del ester metilado del ácido triedecanoico en cloroformo, que se usó como standard interno. El ácido triedecanoico fue metilado tras una hora de reflujo con metanol anhídrido conteniendo 2,5% ClH p/v según un método basado en el de Kates (1964) (N. Burris, comunicación personal). Los tubos con el reactivo se agitaron y se mantuvieron herméticamente cerrados durante 1 h a 100°C.

Después de enfriarlos se les añadieron 2 ml de agua y otros 2 ml de éter de petróleo para extraer los esteres. Tras dos extracciones sucesivas los tubos se secaron bajo un flujo de nitrógeno. Los esteres fueron redissueltos en 1,5 ml de cloroformo, para su análisis en cromatógrafo de gases. Para ello se inyectaron 10 µl de cada muestra en un cromatógrafo de gases HP5840 con una columna de 1,8 m con fase líquida de 10% de SP2330 sobre Chromasorb WAW (Janssens et al., 1983). La temperatura fue programada desde 130 a 225°C a una tasa de 4°C por minuto y un flujo de gas nitrógeno transportado de 30 ml/min. Los diferentes ácidos grasos de las muestras fueron identificados por su tiempo de retención en la columna (Karger et al., 1973).

#### 8.4.2. Determinación de esteroides

Los esteroides fueron extraídos según métodos de Thompson et al. (1974). A células centrifugadas, procedentes de 15 ml de cultivo en fase estacionaria temprana, se le añadieron 1 ml de KOH 20% p/v, y 1 ml de una solución de 0,5 g de pirogalol en 100 ml de metanol. Los tubos fueron puestos al vapor durante 1 hora en un baño que contenía agua a 100°C. Se añadieron 3 ml de agua y la fracción no saponificable de los lípidos fue extraída con éter de petróleo (hexano) después de tres procesos de extracción. Los tubos fueron secados con flujo de nitrógeno y los esteroides se reconcentraron con cloroformo. Estos fueron determinados midiendo sus espectros de absorción entre 250 y 350 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DV.8. La concentración relativa de ergosterol respecto del tipo silvestre (considerado su valor como la unidad) se calculó a partir de su absorción a 282 nm y se refirió al número de células.

### 9. TRATAMIENTO MUTAGÉNICO

#### 9.1. Mutagénesis con Nitrosoguanidina

El tratamiento mutagénico se realizó según el método descrito

por Calderón y. Cerdá-Olmedo (1983). Células que habían estado creciendo en medio nutritivo líquido se centrifugaron y se resuspendieron en tampón trismaleato. pH 7,8 a una concentración final de  $10^8$  células/ml. Se añadió nitrosoguanidina hasta una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  con agitación esporádica durante 15 min. Después de tres lavados consecutivos con el mismo tampón las células mutagenizadas se resuspendieron en medio nutritivo donde se cultivaron a  $30^\circ\text{C}$  durante 8 horas. A partir de este cultivo se sembraron cajas con los medios apropiados para la selección de los mutantes deseados. La viabilidad se determinó a partir de siembras con las diluciones apropiadas en cajas de medio YEPD antes y después del tratamiento mutagénico.

#### 9.2. Mutagénesis con Bromuro de Etidio

El tratamiento de las células con bromuro de etidio se utilizó para la obtención de mutantes "petites" (Slonimski et al., 1968). Para ello en una placa de medio nutritivo se puso una solución de 10  $\mu\text{g}$  de bromuro de etidio en 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Una colonia de la estirpe deseada se extendió sobre la gota con un asa, aislándose posteriormente los mutantes a partir de colonias crecidas.

#### 10. SELECCIÓN DE MUTANTES

Denominamos mutantes de crecimiento sensible a etanol a aquellos incapaces de crecer en una placa de medio YEPDE con etanol a una concentración a la que el tipo silvestre es capaz de crecer y formar colonias. Estos mutantes se seleccionaron de la siguiente forma: células que habían sido tratadas con nitrosoguanidina se sembraron en cajas que contenían medio YEPD, medio YEPG, o medio SD. Las colonias obtenidas se transplantaron con palillos de dientes a medio YEPDE (1,2 M etanol) y se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante tres días. (durante este tiempo la pérdida de etanol es poco significativa como se aprecia en la Fig. 3). Las colonias que transcurrido este tiempo habían sido incapaces de crecer se volvieron a probar

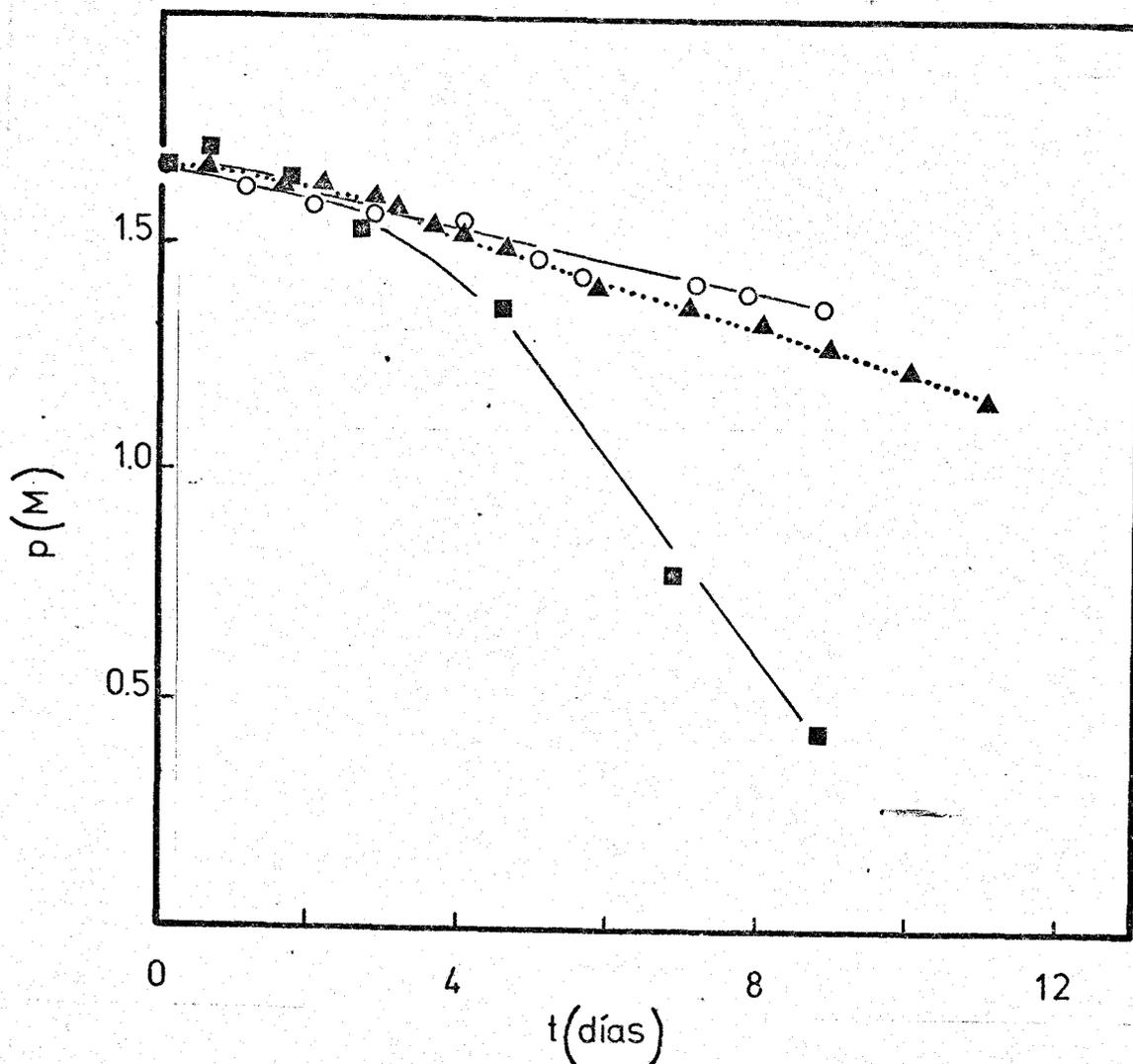


FIGURA 3. Pérdida de etanol en función del tiempo de incubación en cajas con medio sólido YEPDE (1,6 M etanol) mantenidas a 22°C (■) y en tubos con medio líquido YEPEDE (1 M etanol) con (▲) y sin (○) agitación horizontal, a 30°C.

en cajas de iguales características. Las colonias nuevamente incapaces de crecer se cultivaron a 30°C en tubos de 15 ml de capacidad que contenían 2,5 ml de medio YEPD líquido. A las 24 h, 20 µl de estos cultivos se inocularon en tubos similares que contenían 3,5 ml de medio YEPDE (1 M etanol). Estos cultivos se incubaron a 30°C durante 4 ó 5 días. Aquellas estirpes con tiempo de generación superior a 30 h, fase de latencia superior a 80 h o incapaces de crecer en los 5 días se clasificaron como "sensibles a etanol". Estas estirpes fueron posteriormente sometidas a análisis de tétradas, después de ser cruzadas con el parental original, pero de sexo opuesto, y fueron seleccionadas definitivamente aquellas estirpes con mutaciones monogénicas.

## 11. OBTENCIÓN DE DIPLOIDES

Para permitir la conjugación entre dos estirpes de diferente sexo, se mezclaron con palillos de dientes sobre una caja que contenía medio YEPD pequeñas cantidades de biomasa de cada uno de los conjugantes, cultivados en medio YEPD sólido durante 48 h a 30°C. Las mezclas conjugantes se incubaron a 30°C durante 4-6 horas.

Para aislar los diploides se recurrieron a dos métodos:

### 11.1. Selección de los diploides

Cuando las dos estirpes conjugantes poseían auxotrofías complementarias, la mezcla conjugante se sembró con un asa en una caja con medio selectivo en el que sólo podía crecer el diploide formado.

### 11.2. Micromanipulación de cigotos

Este método se utilizó cuando los diploides no eran seleccionables. Mediante un micromanipulador (Lawrence Precision Machines,

California, USA) fijado a un microscopio invertido Nikon (modelo NS) y dotado de una microaguja de cristal, se separaron 4 ó 5 cigotos de la mezcla conjugante cuando estaban emitiendo su primera yema, por su inconfundible morfología llamada "flor de lis". El carácter diploide de las células aisladas era comprobado por su capacidad de esporular.

### 11.3. Identificación de estirpes con niveles de ploidía distintos al haploide

Los mutantes *kar* (Conde y Fink, 1976), utilizados en esta Tesis, producen autodiploidización por endomitosis (Polaina y Conde, 1982). En estos casos el nivel de ploidía se determinó calculando la frecuencia de aparición de mutantes con fenotipo  $can^R$  (resistencia a canavanina) después de la exposición a luz U.V. durante 45 s. de cajas con medio SD suplementada con canavanina (I.L. Calderón, comunicación personal). Puesto que la resistencia a canavanina se debe a un alelo recesivo, la aparición de mutantes  $can^R$  es mucho mayor en las estirpes haploides que en las que poseen niveles superiores de ploidía.

## 12. ESPORULACIÓN

Colonias aisladas de los diploides que se deseaban esporular se transfirieron a cajas de medio de preesporulación donde se cultivaron durante 2 días a 30°C. La biomasa crecida era transferida a cajas con medio de esporulación donde se incubaron a 22°C durante 15 días.

## 13. ANÁLISIS MEIÓTICO

La segregación de los diploides se estudió por análisis de tétradas (Sherman y Lawrence, 1974). Para digerir las paredes de las ascas, éstas fueron tratadas con helicasa (Johnston y Mortimer,

1959). Una pequeña cantidad de biomasa esporulada se suspendió en 0,3 ml de una solución 1:10 de helicasa en agua estéril, incubándose la mezcla a la temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, unas gotas de esta mezcla se extendieron en cajas con medio YEPD, donde se separaron las esporas de cada asca mediante el micromanipulador ya descrito. Una vez germinadas las esporas de cada tétrada, se sembraron en los medios apropiados para determinar su genotipo.

### III. RESULTADOS

## 1. RELACION ENTRE CRECIMIENTO, FERMENTACION Y RESPIRACION

### 1.1. Consideraciones teóricas

Antes de entrar de lleno en el estudio de la relación que puede establecerse entre los parámetros cinéticos celulares y el etanol, se ha determinado previamente la relación existente entre dichos parámetros, crecimiento, fermentación y respiración, en la estirpe silvestre de S. cerevisiae S288C. En el apartado 3.7 de la Introducción se describieron distintas expresiones algebraicas correspondientes a procesos independientes, y a procesos ligados total y parcialmente (Pirt, 1975). En este trabajo, a diferencia de Pirt, se consideran idénticos los rendimientos biomasa/sustrato  $Y_{sx}$  verdadero y total (Introducción, apartado 3.4.), y se parte de la expresión general (11)  $Y_{px} = q_p/\mu$ . Aunque en cultivo discontinuo se puede establecer si un proceso está o no ligado al crecimiento, es en cultivo continuo donde mejor se establece esta relación, pudiéndose calcular los parámetros cinéticos necesarios. Los resultados esperados según el tipo de relación existente, serían los siguientes:

- Procesos independientes: Si los procesos fueran independientes el producto se formaría siempre con la misma tasa, independientemente de la tasa de crecimiento, por lo que en el quimiostato en estado de equilibrio la tasa de salida de producto por unidad de tiempo sería constante e independiente de  $D$ :

$$D\bar{p} = a \quad (26)$$

o sea:

$$\bar{p} = \frac{a}{D} \quad (27)$$

donde  $\underline{a}$  es una constante empírica y  $\underline{p}$  es la concentración de producto en el equilibrio. Ya que de la expresión (6) tenemos que  $q_p = \frac{1}{x} \cdot p \cdot D$ , sustituyendo se obtiene que:

$$q_p = \frac{a}{x} \quad (28)$$

donde  $\underline{x}$  es la concentración de biomasa en el estado de equilibrio, y por tanto constante por lo que  $q_p$  también es constante:

$$q_p = K \quad (29)$$

El rendimiento  $Y_{px}$ , pues, equivale a:

$$Y_{px} = \frac{K}{D} \quad (30)$$

es decir, el rendimiento sería menor cuando  $\underline{D}$  aumentara, tendiendo a 0 cuando  $\underline{D} \gg \underline{K}$  (Fig. 4).

- Procesos totalmente ligados. En este caso, la tasa de formación de producto correlacionaría con la tasa de crecimiento, siendo su valor nulo cuando esta última también fuera nula. Según esto, en el equilibrio la concentración de  $\underline{p}$  se mantendría constante:

$$\bar{p} = b \quad (31)$$

donde  $\underline{b}$  es una constante empírica. Por tanto:

$$q_p = \frac{1}{x} \cdot b \cdot D = K' D \quad (32)$$

donde  $\underline{K'}$  es una constante. De aquí:

$$Y_{px} = \frac{KD}{D} = K' \quad (33)$$

o sea el rendimiento  $Y_{px}$  tiene, siempre el mismo valor independientemente del valor de  $\underline{D}$  (Fig. 4).

- Procesos parcialmente ligados. En este caso la concentración de producto en el estado de equilibrio,  $\underline{p}$ , en el quimiostato sería el resultado de un componente ligado a  $\mu$ ,  $\underline{p}_L$ , y otro independiente de  $\mu$ ,  $\underline{p}_I$ :

$$\bar{p} = p_L + p_I = b + \frac{a}{D} \quad (34)$$

Así:

$$q_p = \frac{b}{x} D + \frac{a}{x} = K'D + K \quad (35)$$

Por tanto:

$$Y_{px} = K' + \frac{K}{D} \quad (36)$$

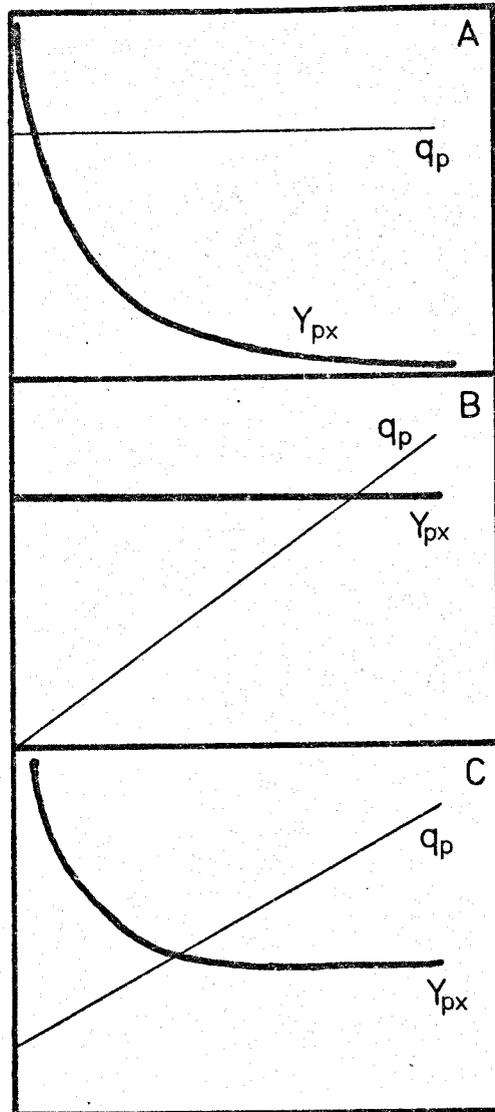
Como puede observarse,  $Y_{px}$  varía también en función de  $D$ , pero en este caso cuando  $D \gg K$ ,  $Y_{px}$  tiende a un valor distinto de 0 y constante,  $K'$ .

Estudiando como varía  $q_p$  y  $Y_{px}$  en función de  $D$ , se sabrá exactamente, pues, qué tipo de relación existirá entre  $q_p$  y  $\mu$  (Fig. 4).

## 1.2. Resultados experimentales

Teniendo en cuenta las consideraciones teóricas descritas, se han establecido las relaciones existentes entre la tasa de crecimiento  $\mu$  y la tasa de fermentación  $v$  (expresada, bien como tasa de consumo de glucosa, o bien como tasa de formación de  $CO_2$ ) y entre la tasa de crecimiento y la tasa de respiración  $\rho$  (expresada como tasa de consumo de  $O_2$ ). Para ello se han llevado a cabo dos tipos de aproximaciones, una en cultivo continuo y otra en cultivo discontinuo. En ambos casos se ha utilizado la estirpe "grande" de laboratorio S288C y un mutante "petite", BE288-1, derivado de la estirpe anterior por tratamiento con bromuro de etidio según se describe en Materiales y Métodos, apartado 9.2. Como los parámetros a estudiar han sido crecimiento y fermentación, se ha evitado que el nutriente limitante esté directamente relacionado con el proceso de la fermentación a fin de suprimir posibles efectos secundarios que alteren los resultados. Concretamente, se ha utilizado medio mínimo en el que el factor limitante era la fuente de nitrógeno y en todos los casos el pH en el estado de equilibrio se mantuvo constante e igual a 3,5.

En la Tabla II se presentan los resultados obtenidos en cultivo continuo con la estirpe "petite" BE288-1. Como puede observarse, hay un aumento proporcional de la tasa de fermentación con



D

**FIGURA 4.** Variación de la tasa de formación de producto  $q_p$  y el rendimiento producto/biomasa  $Y_{px}$ , en función de la tasa de dilución  $D$ , esperada según que la formación de producto sea un proceso independiente (A), total (B) o parcialmente ligado a la tasa de crecimiento  $\mu$  (basado en Pirt, 1975).

TABLA II. Relación entre distintos parámetros de crecimiento en la estirpe "petite" de *S. cerevisiae* BE288-1, en cultivo continuo.  $D$ : tasa de dilución ( $h^{-1}$ );  $\Delta \bar{s}$ : concentración de glucosa consumida en el estado de equilibrio (mg glucosa/ml);  $\bar{x}$ : concentración de biomasa en el estado de equilibrio (células/ml);  $v$ : tasa de fermentación (mg glucosa consumida/ $10^6$  células  $\cdot$  h) y  $Y_{sx}$ : rendimiento sustrato/biomasa (mg glucosa consumida/ $10^6$  células).

$D$	$\bar{x}$	$\Delta \bar{s}$	$v^*$	$Y_{sx}$
0,002	$4,8 \times 10^7$	14,5	0,006	0,304
0,005	$4,4 \times 10^7$	13,0	0,015	0,295
0,011	$5,6 \times 10^7$	12,0	0,023	0,213
0,019	$6,3 \times 10^7$	10,7	0,032	0,169
0,039	$5,3 \times 10^7$	8,8	0,065	0,166
0,056	$4,5 \times 10^7$	6,0	0,078	0,133
0,057	$5,6 \times 10^7$	8,0	0,082	0,144
0,088	$3,2 \times 10^7$	4,6	0,128	0,145
0,101	$3,6 \times 10^7$	5,2	0,144	0,143

\*  $v$  en este caso fue determinada a partir de la expresión (21).

la tasa de dilución (equivalente a la tasa de crecimiento), pero no se aprecia si ambos procesos están perfectamente ligados, lo que ocurriría si al hacerse 0 una de las tasas la otra también se hiciera 0. Esto se hace patente al estudiar la evolución del rendimiento sustrato consumido/biomasa producida.  $Y_{sx}$ , equivalente al rendimiento producto formado/biomasa producida  $Y_{px}$  (ver Introducción, apartado 3.3.). En la Fig. 5 puede observarse gráficamente que la tasa de crecimiento  $\mu$ , y la de fermentación  $v$  están ligadas, aunque no totalmente, ya que cuando se extrapola hasta un valor de  $D=0$ , queda todavía cierta tasa de fermentación residual. El aumento del rendimiento  $Y_{sx}$  cuando la tasa de dilución tiende a 0 corrobora la existencia de esta tasa de fermentación.

Estos resultados se han comprobado mediante estudios en cultivos discontinuos idénticos a los utilizados para cultivo continuo, con las estirpes "grande" S288C y la "petite" BE288-1 (Fig. 6). En fase exponencial se observa que el rendimiento  $Y_{sx}$  es 0,115 mg glucosa consumida/ $10^6$  células, pero al llegar el cultivo a fase estacionaria, debido al agotamiento de la fuente de nitrógeno,

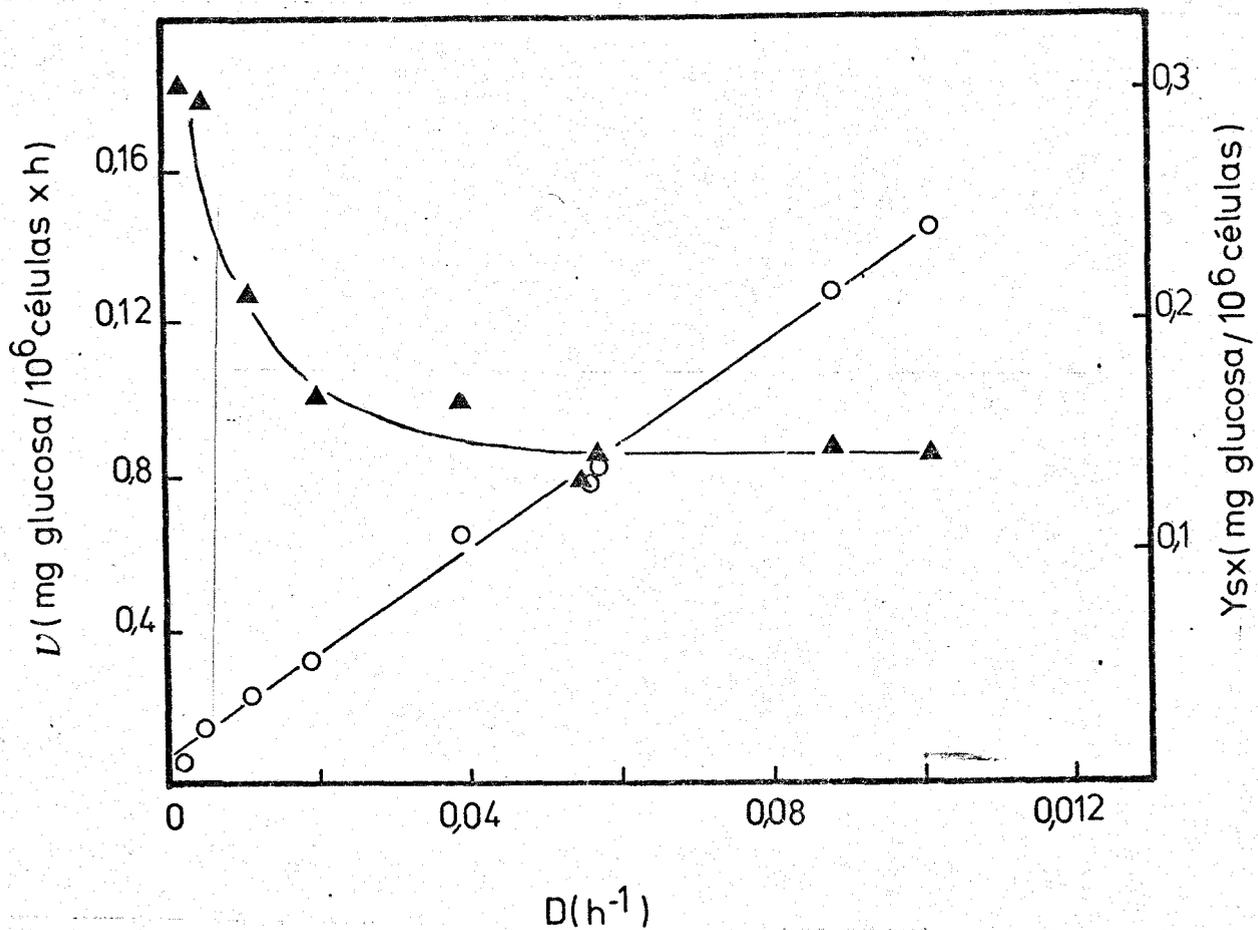


FIGURA 5. Variación de la tasa de fermentación  $v$  (O) y el rendimiento sustrato/biomasa  $Y_{sx}$  ( $\blacktriangle$ ), en función de la tasa de dilución, en la estirpe "petite" BE288-1 de *S. cerevisiae*, en cultivo continuo.

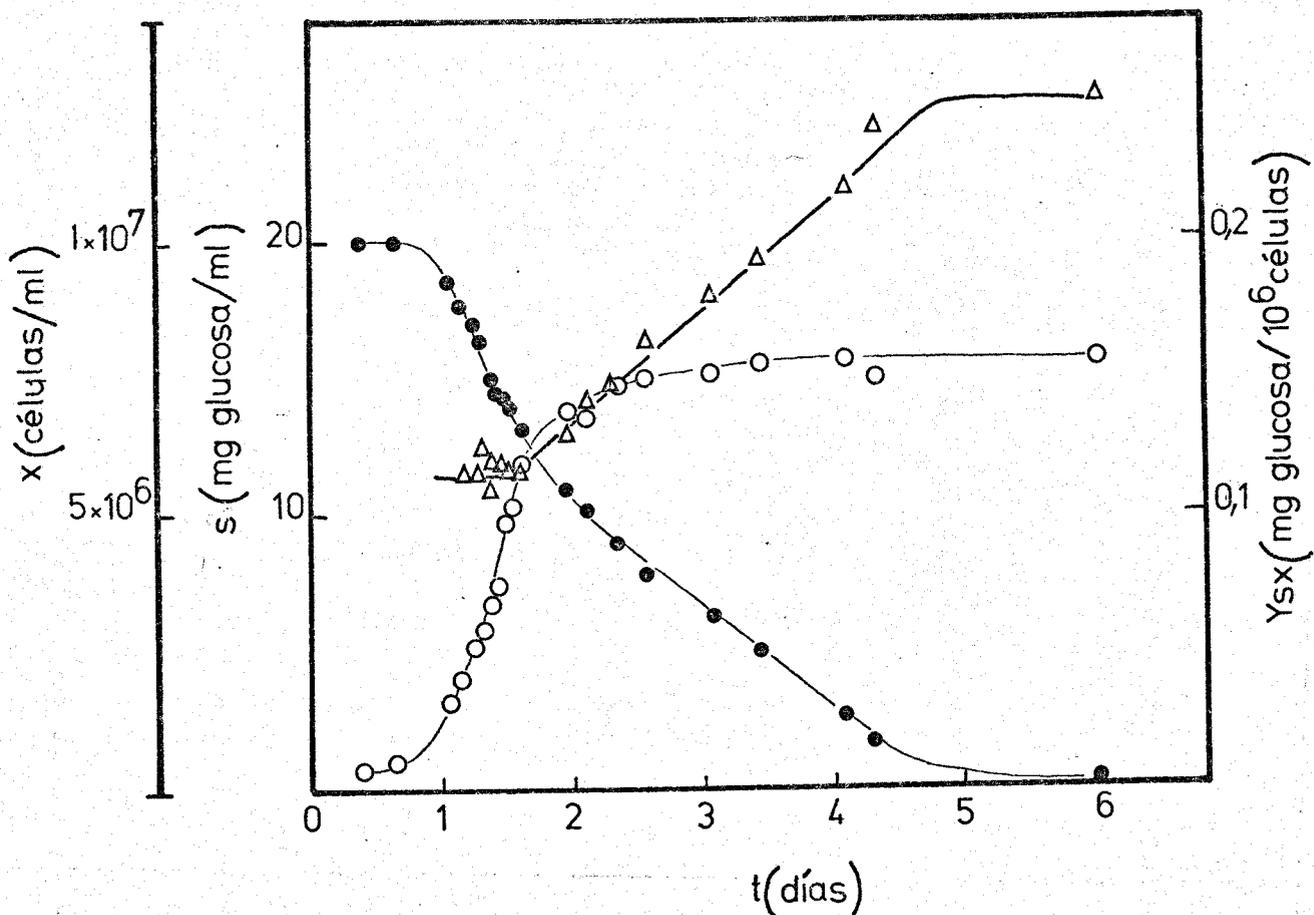


FIGURA 6. Evolución de la concentración de biomasa  $x$  (O), la concentración de glucosa presente en el medio (●) y el rendimiento sustrato/biomasa  $Y_{sx}$  (Δ) en función del tiempo en la estirpe "petite" BE288-1 de S. cerevisiae en cultivo discontinuo.

la glucosa empieza a metabolizarse a velocidad constante (como consecuencia de una estabilización de la biomasa). Esto se traduce en un aumento del rendimiento  $Y_{sx}$  que alcanza su valor máximo, 0,25 mg glucosa consumida/ $10^6$  células, cuando se consume toda la glucosa (20 mg/ml cultivo).

*TABLA III. Relación entre distintos parámetros de crecimiento en la estirpe "grande" S. cerevisiae S288C en cultivo continuo: D: tasa de dilución ( $h^{-1}$ );  $\bar{x}$ : concentración de biomasa en el estado de equilibrio (células/ml);  $\Delta\bar{s}$ : concentración de glucosa consumida en el estado de equilibrio (mg glucosa/ml); v: tasa de fermentación ( $\mu l$   $CO_2$  desprendidos/ $10^6$  células  $\cdot$  h);  $\rho$ : tasa de respiración ( $\mu l$   $O_2$  consumidos/ $10^6$  células  $\cdot$  h);  $Y_{sx}$  rendimiento sustrato/biomasa (mg glucosa consumida/ $10^6$  células);  $Y_{px}$ : rendimiento producto/biomasa ( $\mu l$   $CO_2$  producidos/ $10^6$  células);  $Y_{ox}$ : rendimiento oxígeno consumido/biomasa producida ( $\mu l$   $O_2$ / $10^6$  células).*

D	$\bar{x}$	$\Delta\bar{s}$	v	$\rho$	$Y_{sx}$	$Y_{px}$	$Y_{ox}$
0,033	$5,0 \times 10^7$	5,8	7,6	1,3	0,116	2,30	0,38
0,068	$4,2 \times 10^7$	3,2	15,2	2,3	0,076	2,24	0,34
0,075	$4,1 \times 10^7$	3,4	20,2	2,3	0,083	2,69	0,31
0,088	$4,1 \times 10^7$	3,8	20,1	1,9	0,093	2,28	0,22
0,100	$3,8 \times 10^7$	3,2	20,7	2,3	0,084	2,24	0,21

En la Tabla III se presentan los resultados obtenidos en experimentos similares realizados con la estirpe "grande" S288C. Estos resultados confirman la correlación existente entre la tasa de crecimiento y la tasa de fermentación. No obstante, debido a que las tasas de dilución empleadas son superiores a las utilizadas con la estirpe "petite", el aumento del rendimiento  $Y_{sx}$  no es tan evidente. Se ha estudiado la variación de la tasa de respiración en función de la tasa de dilución, comprobándose que, en este caso, la tasa de respiración también está parcialmente ligada a la tasa de crecimiento. Este resultado ha sido confirmado con los datos obtenidos de rendimiento de  $O_2$  consumido por células de levadura en función de la tasa de crecimiento, ya que este valor aumenta cuando la tasa de dilución toma valores pequeños.

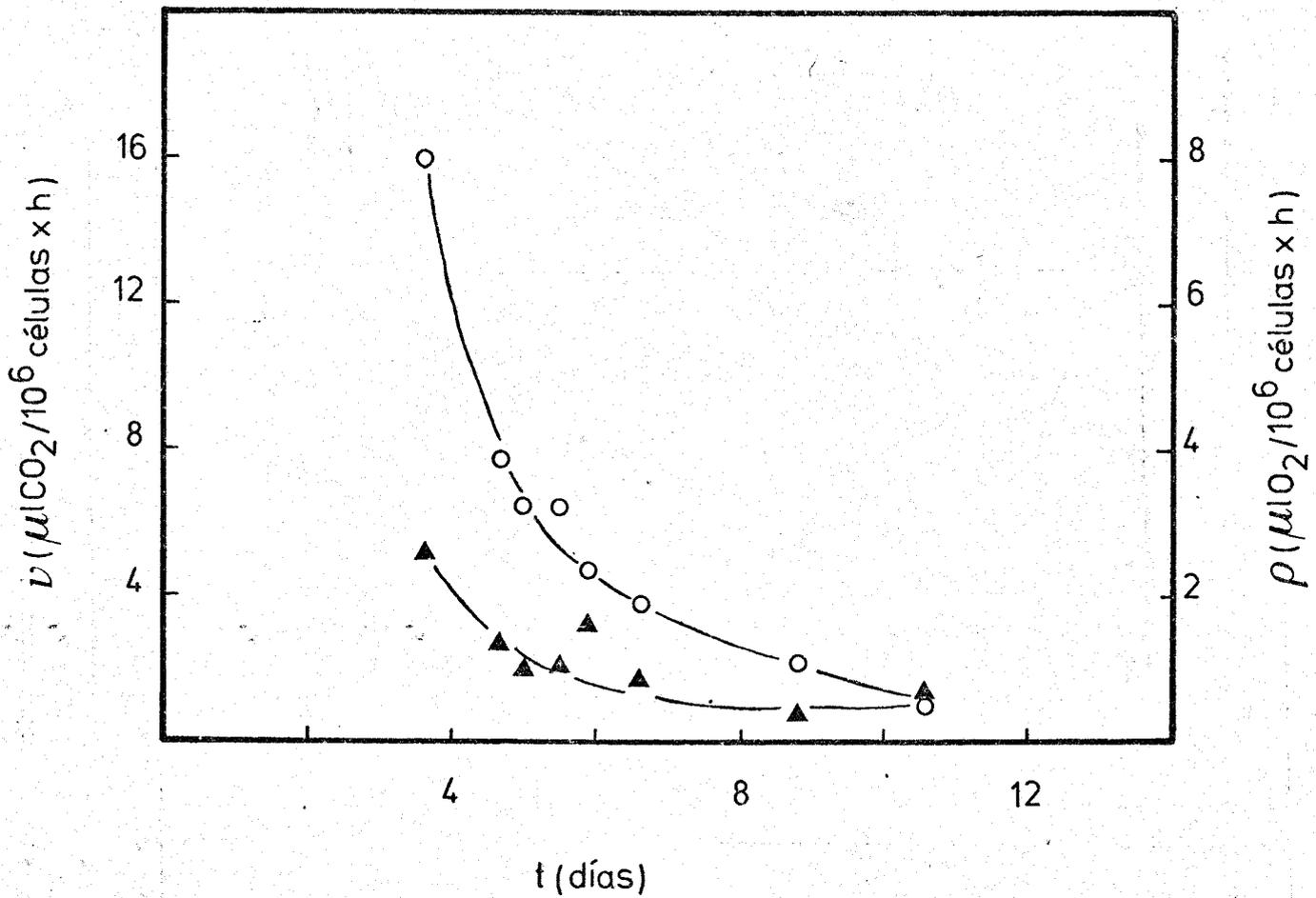


FIGURA 7. Evolución de la tasa de fermentación  $v$  (O) y la tasa de respiración  $\rho$  ( $\blacktriangle$ ) en función del tiempo, en la estirpe "grande" S288C de *S. cerevisiae* en cultivo continuo, cuando el crecimiento es nulo ( $D = 0$ ).

A pesar de que existen tasas de fermentación y respiración basales cuando el crecimiento es nulo, estas tasas no se mantienen indefinidamente, sino que decrecen con el tiempo (Fig. 7).

## 2. EFECTO INHIBIDOR DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA

En esta Tesis se pretenden investigar las distintas respuestas de S. cerevisiae ante el etanol como agente inhibidor. El etanol puede ser añadido directamente al medio de cultivo, pero también es el producto final de la fermentación de azúcares. Por otra parte, altas concentraciones de azúcar en el medio inhiben el crecimiento y la fermentación en levaduras (Moulin et al., 1980; Lee et al., 1981) lo que puede conducir a efectos inhibitorios sinérgicos con el etanol producido por fermentación. Así pues, era preciso estudiar el efecto de las altas concentraciones de azúcar sobre el crecimiento y la fermentación, de modo que se pudiera establecer cuáles son las condiciones idóneas para determinar la capacidad máxima de producción de etanol.

Ya que la producción de etanol es dependiente de la temperatura en Saccharomyces (Lee et al., 1980; Kosarick et al., 1982), se ha intentado determinar cuál es la concentración de sacarosa a la que la producción de etanol es máxima y su dependencia de la temperatura de incubación. Para ello se ha medido la tasa de crecimiento  $\mu$  y la sacarosa consumida, en función de cantidades crecientes de éstas y a cuatro temperaturas: 22, 26, 30 y 37°C, en la estirpe S. cerevisiae S288C.

Según se observa en la Fig. 8 la tasa de crecimiento es inhibida por altas concentraciones de sacarosa a todas

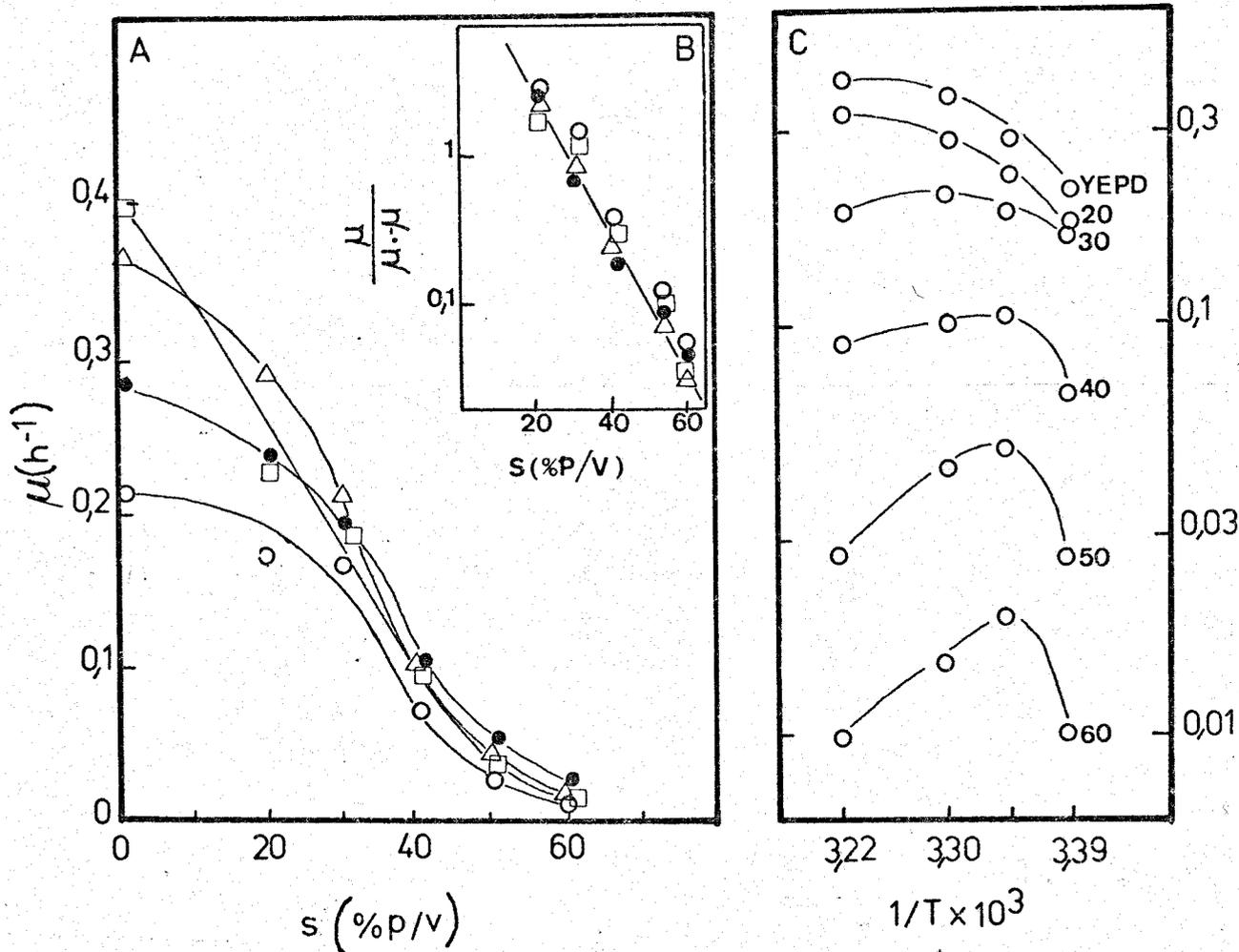
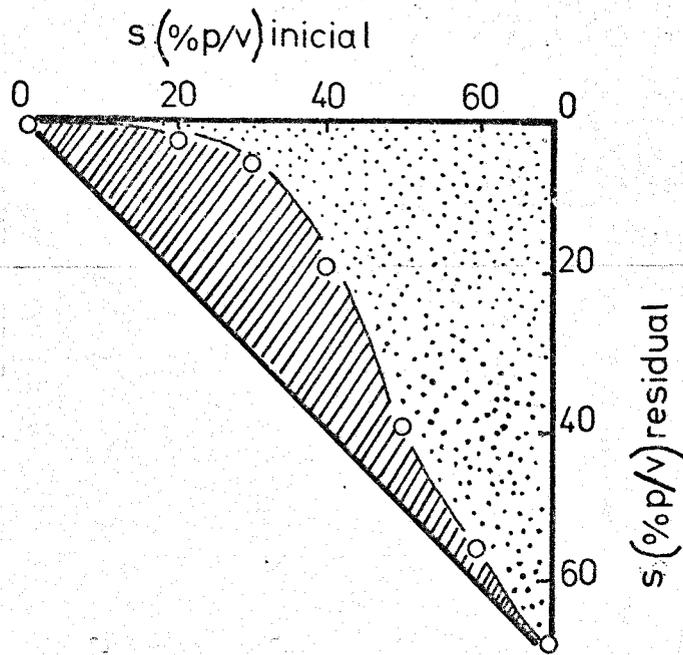


FIGURA 8. A. Inhibición de la tasa de crecimiento  $\mu$  de *S. cerevisiae* S288C en función de la concentración de sacarosa  $s$  a distintas temperaturas. B. Representación semilogarítmica de  $\mu / (\mu_0 - \mu)$  ( $\mu_0$  es  $\mu$  en medio YEPD) en función de  $s$ , a 22 (○), 26 (●), 30 (△) y 37°C (□). C. Representación de Arrhenius de la tasa de crecimiento en medios YEPD e YEPS, en función del inverso de la temperatura absoluta. El número de cada curva indica la concentración de sacarosa en % p/v en los medios YEPS.

las temperaturas empleadas. La curva de inhibición presenta una forma sigmoïdal, a partir de la cual puede establecerse una relación lineal entre  $\ln \frac{\mu}{\mu_0 - \mu}$  y  $S$ , similar a los modelos cinéticos de inhibición de los enzimas alostéricos, e independiente de la temperatura. ( $\mu_0$  es  $\mu$  en medio con 2% p/v de glucosa y sin sacarosa). La mayor inhibición de la tasa de crecimiento cuando aumenta la temperatura de incubación es debida a que la temperatura máxima de crecimiento es menor cuanto mayor es la concentración de sacarosa inicial, según se desprende de la representación de Arrhenius (Fig. 8C). Hasta concentraciones del 20% p/v de sacarosa la temperatura máxima de crecimiento es de 37°C, mientras que con 50% p/v de sacarosa esta temperatura es de 26°C. Por encima del 40% p/v de sacarosa el crecimiento de S. cerevisiae S288C pasa de ser exponencial a ser lineal, lo que implica muy posiblemente la aparición de muerte celular. A partir del 60% p/v el crecimiento es nulo a cualquier temperatura estudiada. Todos estos efectos inhibitorios son causados por la sacarosa exclusivamente, ya que la tasa de crecimiento se determina cuando aún no se ha consumido el 2% p/v, lo que implica una concentración de etanol en el medio inferior al 1% v/v, de efecto inhibitorio despreciable (ver apartado 4.2.).

En la Fig. 9 se observa que hasta concentraciones del 20% p/v de sacarosa, S. cerevisiae S288C es capaz de fermentar todo el azúcar presente en el medio, a los 7 días de incubación a 30°C. A 30% p/v de sacarosa la producción de etanol es máxima. A partir del 30% p/v esta capacidad fermentativa decrece debido a una serie de efectos inhibitorios producidos, por una parte, por las altas concentraciones de etanol alcanzadas en el medio, y por otra por las concentraciones de sacarosa aún no metabolizada, observándose que ya al 40% p/v quedan sin consumirse cantidades cercanas al 20% p/v de sacarosa en el medio. A partir del 60% p/v el consumo de sacarosa es nulo.



**FIGURA 9.** Consumo de sacarosa de la estirpe S288C de *S. cerevisiae* en medio YEPS suplementado con diferentes concentraciones de sacarosa a 30°C.

La Fig. 10 muestra los resultados obtenidos cuando se utiliza glucosa en lugar de sacarosa. En medio nutritivo suplementado con 20 y 27% p/v de glucosa, tanto la estirpe "grande" S288C, como su mutante "petite" BE288-1 consumen prácticamente toda la glucosa presente en el medio, superando el 1,6M de etanol producido en 20% p/v de glucosa y el 2,3 M en 27% p/v de glucosa.

Puesto que a partir del 30% p/v de azúcar en el medio se producen efectos drásticos sobre S. cerevisiae, como inhibición de la tasa de crecimiento o disminución de la temperatura máxima de crecimiento, aumento de la muerte celular o disminución de la producción máxima de etanol (o de la capacidad de consumo de azúcar), se decidió en adelante no superar el 30% p/v de azúcar fermentable en los medios donde se estudia la capacidad de producción de etanol de cualquier estirpe.

### 3. LA TOLERANCIA AL ETANOL Y EL NIVEL DE PLOIDÍA EN S. cerevisiae

Dado que las estirpes aisladas de la naturaleza que producen y toleran altas concentraciones de etanol no son haploides (Benítez et al., 1983) se ha tratado de determinar si la tolerancia a etanol depende del nivel de ploidía en S. cerevisiae. Para ello se ha estudiado la inhibición de la tasa de crecimiento por etanol y la concentración de etanol a la que la fermentación se hace nula en los diploides DS8-1, DS8-2 y DS8-3, que son isogénicos de S288C (obtenidos por cruzamiento con la estirpe también isogénica de S288C, AH28X; ver Tabla I) y en el diploide no isogénico DA1 (obtenido por cruzamiento de las estirpes D585-11 y X30/3C). Los resultados se han comparado con los obtenidos a partir de sus respectivos parentales haploides. En la Tabla IV puede observarse que la constante de inhibición de los diploides, y la concentración de etanol a la que estos dejan de fermentar es siempre similar a la de sus parentales. Se concluye que la tolerancia al etanol no depende

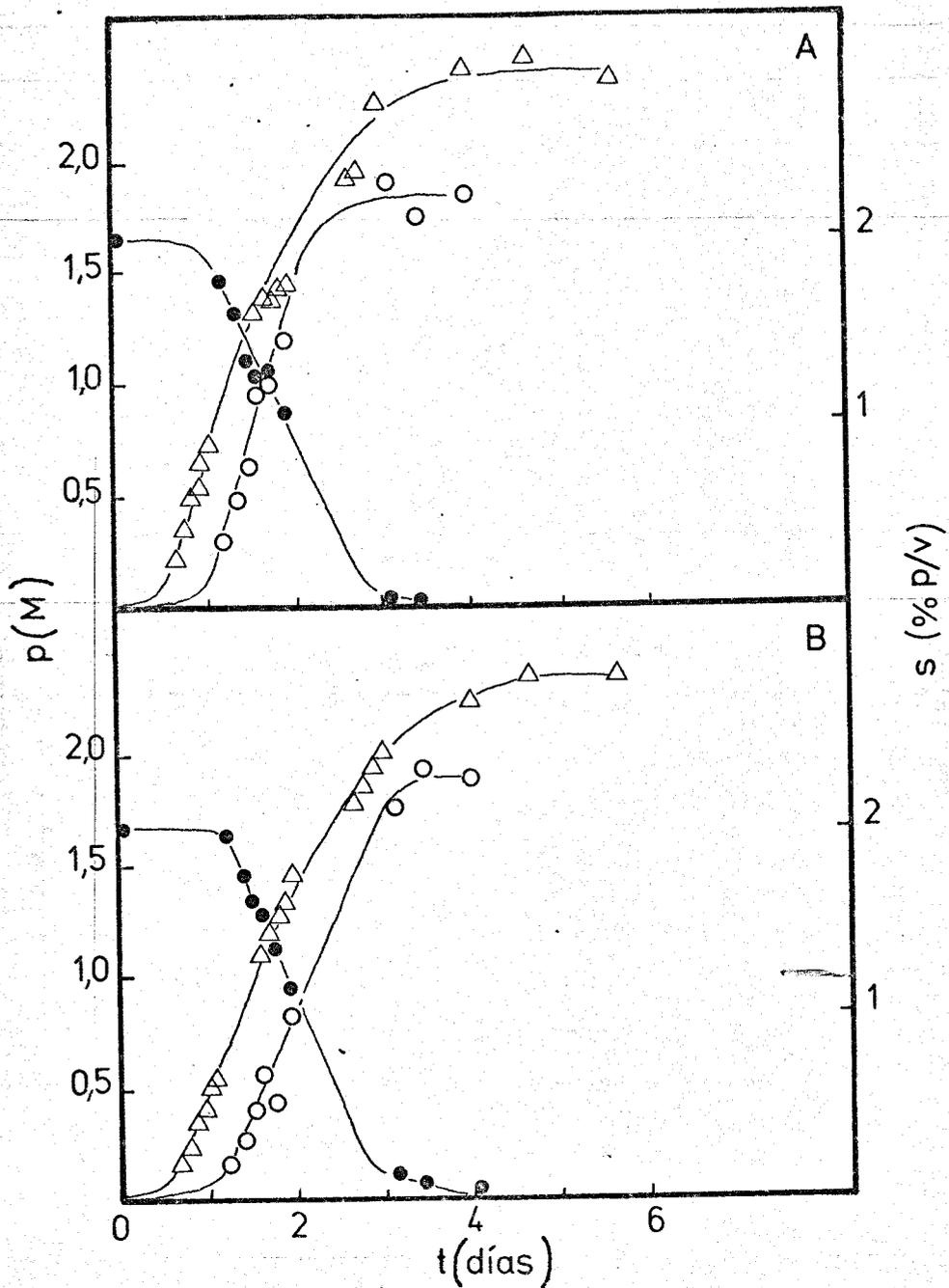


FIGURA 10. Consumo de glucosa en medio YEPD suplementado con 20 % p/v de glucosa (●) y producción de etanol en este mismo medio con 20 (○) y 27% p/v de glucosa (△) a 30°C, en las estirpes "grande" S288C (A) y "petite" BE288-1 (B) de *S. cerevisiae*.

de los niveles de ploidía en nuestras condiciones.

TABLA IV. Constante de inhibición del etanol de la tasa de crecimiento (calculada como la concentración molar de etanol a la que el valor de  $\mu$  toma el valor de la mitad del que posee cuando no existe etanol en el medio) (A) y concentración molar del etanol a la que no es posible la fermentación (B), en los diploides DS8-1, DS8-2, DS8-3 y DA1 y sus respectivos parentales haploides S288C y AH28X (de los tres primeros) y D585-11C y X30/3C (del último).

	<u>S288C AH28X</u>	<u>DS8-1 DS8-2 DS8-3</u>	<u>D585-11C X30/3C</u>	<u>DA1</u>
A	1,1 <sup>(1)</sup>	1,1 <sup>(1)</sup>	1,1-1,3 <sup>(2)</sup>	1,2 <sup>(2)</sup>
B	2,5 (1)	2,5 <sup>(1)</sup>	-	-

(1) Experimentos realizados a 30°C.

(2) Experimentos realizados a 26°C.

#### 4. IMPORTANCIA DE LAS FUNCIONES MITOCONDRIALES EN LA TOLERANCIA AL ETANOL

##### 4.1. Efecto del etanol en las estirpes "grande" S288C y "petite" BE288-1 de S. cerevisiae

En el presente capítulo se ha investigado la influencia de determinadas funciones mitocondriales de S. cerevisiae en la sensibilidad al etanol. Para ello se han comparado los resultados obtenidos en la estirpe "grande" de S. cerevisiae S288C, con los de su mutante "petite" BE288-1. Todos los parámetros han sido medidos en medio YEPD y YEPDE suplementado con diferentes concentraciones de etanol, y a 26°C para evitar los posibles efectos resultantes de una acción conjunta de la temperatura y las altas concentraciones de etanol sobre la actividad celular.

##### 4.1.1. Efecto del etanol sobre el crecimiento, la fermentación y la respiración 1) Aerobiosis

Según se observa en la Figura 11, cuando se cultiva la estirpe "grande" de S. cerevisiae, en medio líquido YEPDE con diferentes

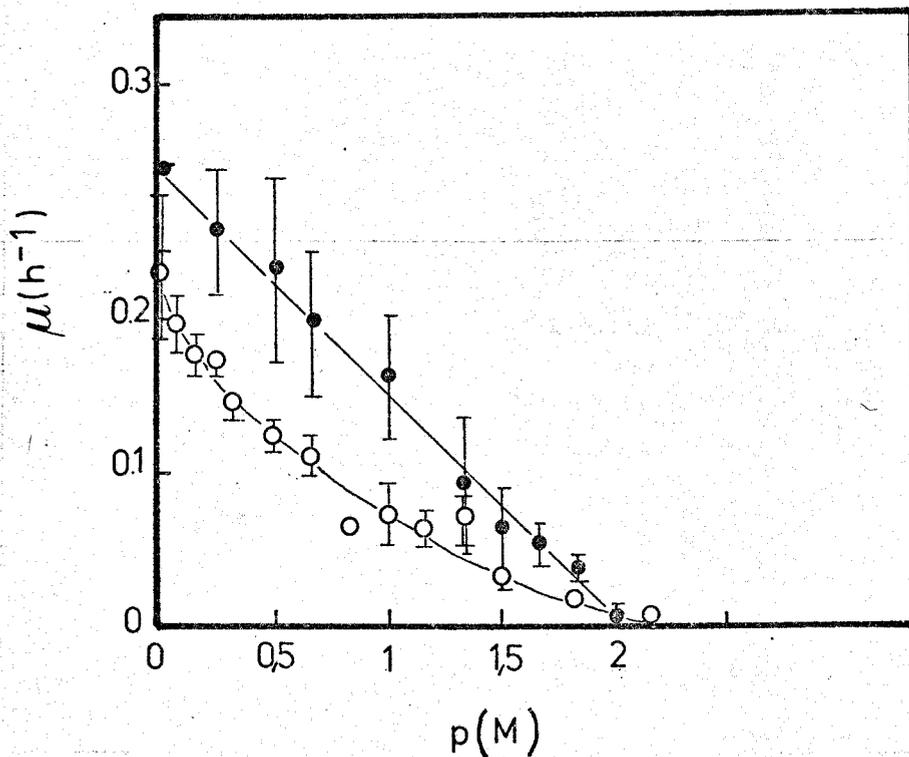


FIGURA 11. Inhibición de la tasa de crecimiento  $\mu$  en función de la concentración molar de etanol  $p$ , en las estirpes "grande" S288C (●) y "petite" BE288-1 (○) de *S. cerevisiae*, cultivadas en aerobiosis a 26°C. Cada resultado representa la media y desviación típica de 4-5 experimentos.

concentraciones de etanol (hasta 2,3 M) y en condiciones de aerobiosis la tasa de crecimiento,  $\mu$ , decrece con la concentración de etanol según una relación que se ajusta a una función lineal (coeficiente de correlación  $> 0.99$ ). Esta función es del tipo:

$$\mu = -kp + \mu_0 \quad (37)$$

donde  $\mu_0$  es la tasa específica de crecimiento en medio sin etanol,  $k$  es una constante empírica y  $p$  es la concentración de etanol.

Sin embargo, en la estirpe "petite" BE288-1 y bajo las mismas condiciones,  $\mu$  se inhibe más fuertemente a bajas concentraciones de etanol; la función a la que mejor se ajusta la relación entre  $\mu$  y  $p$  es exponencial (coeficiente de correlación  $> 0,99$ ). Esta relación es del tipo:

$$\mu = \mu_0 e^{-kp} \quad (38)$$

Estas diferencias no son debidas a distintas concentraciones de etanol existentes en los cultivos de las estirpes "grande" y "petite", ya que se ha comprobado que las concentraciones se mantienen iguales.

Una vez establecidos los distintos tipos de relación existentes entre la tasa de crecimiento,  $\mu$ , y la concentración de etanol,  $p$ , en las estirpes "grande" y "petite" se procedió a estudiar la relación entre  $p$  y la tasa de fermentación  $v$  a fin de determinar si estas diferencias eran específicas de  $\mu$  o si por el contrario eran también observables en  $v$ . Los resultados obtenidos (Fig. 12) indican que cantidades crecientes de etanol inhiben la tasa de fermentación de un modo similar a la de crecimiento en cada estirpe. Así, en la estirpe "grande" la relación entre  $v$  y  $p$  se ajusta a la función lineal y en la "petite" a la función exponencial descritas (coeficientes de correlación  $> 0.99$ ). Estos resultados son similares tanto cuando se representan los datos en función del número de células totales como si se hace en función del número

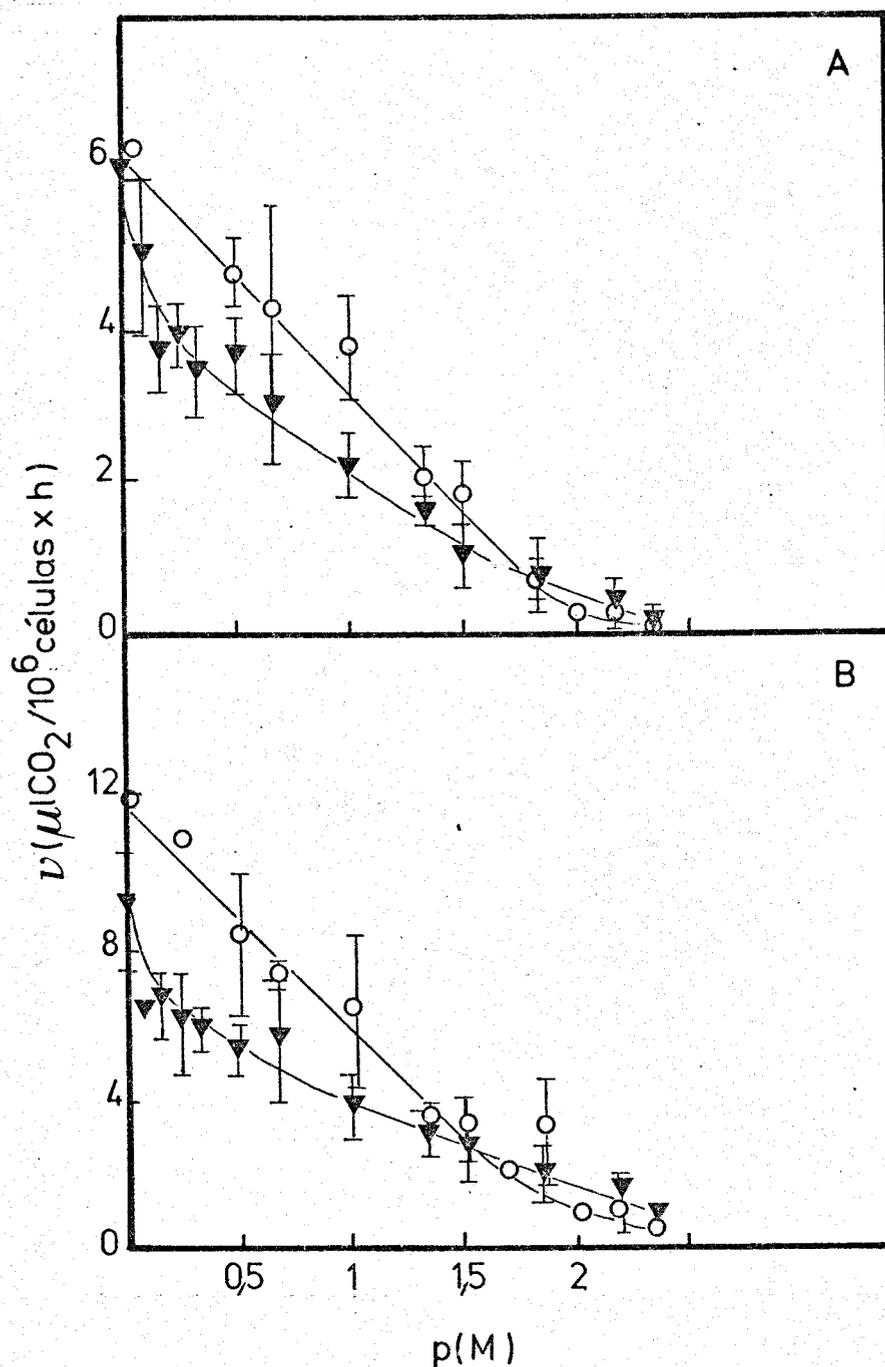


FIGURA 12. Inhibición de la tasa de fermentación  $v$  en función de la concentración molar de etanol  $p$ , en las estirpes "grande" S288C (O) y "petite" BE288-1 (▼) de *S. cerevisiae* cultivadas en aerobiosis a 26°C. A. Por células totales; B. Por células viables. Cada resultado representa la media y desviación típica de 4-5 experimentos.

de células viables.

La tasa de respiración,  $\rho$ , es inhibida por concentraciones crecientes de etanol en la estirpe "grande" de modo similar a las formas de inhibición de  $\mu$  y  $v$  (Fig. 13), si bien los valores que se obtienen son tan bajos, y en consecuencia tan variables que impiden diferenciar si el mejor ajuste puede hacerse a una relación de tipo lineal o exponencial (en ambos casos coeficientes de correlación  $> 0,99$ ).

Como resumen de estos experimentos se concluye que en la estirpe "grande" las tasas de crecimiento, fermentación e incluso respiración decrecen en función de la concentración de etanol, según la relación:

$$v = -kp + v_0 \quad (39)$$

donde  $v$  es la tasa específica de crecimiento, fermentación o respiración y  $v_0 = v$  cuando  $p = 0$ .

Sabiendo que la constante de inhibición del etanol,  $K_i$ , equivale a la concentración de etanol,  $p$ , a la que  $v = \frac{v_0}{2}$  sustituyendo en la expresión (39), se obtiene que:

$$k = -\frac{v_0}{2 K_i} \quad (40)$$

Por lo que en el caso de la estirpe "grande" en aerobiosis, se obtiene la expresión general:

$$v = -\frac{v_0}{2 K_i} p + v_0 = v_0 \left(1 - \frac{1}{2 K_i} p\right) \quad (41)$$

En la estirpe "petite", tanto la tasa de crecimiento como la de fermentación siguen la ecuación general:

$$v = v_0 e^{-kp} \quad (42)$$

o sea:

$$\ln v = \ln v_0 - kp \quad (43)$$

Por el mismo razonamiento anterior cuando  $v = \frac{v_0}{2}$ ,  $p = K_i$ , por lo que sustituyendo en (43) se obtiene que:

$$k = \frac{\ln 2}{K_i}$$

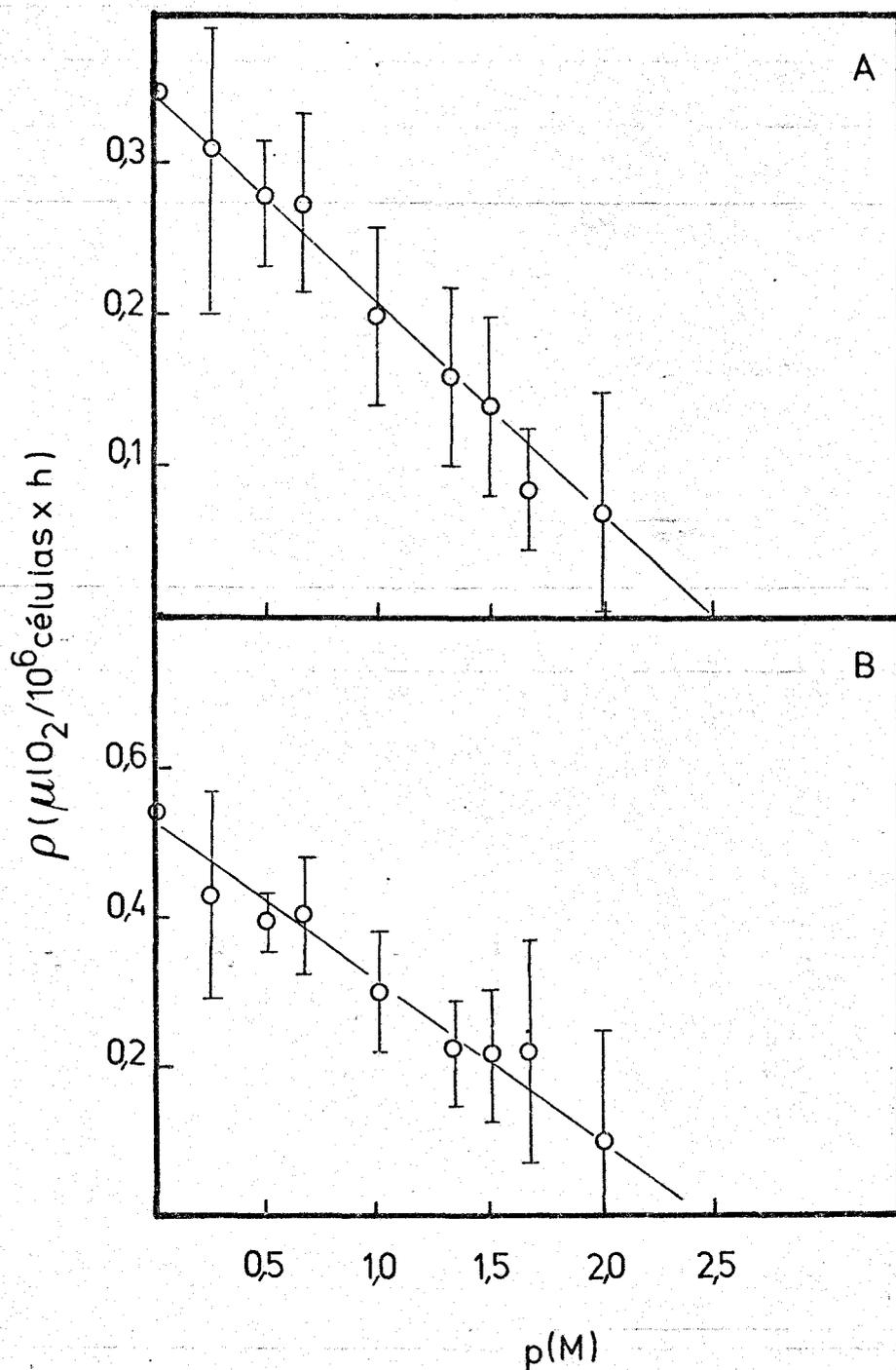


FIGURA 13. Inhibición de la tasa de respiración  $\rho$  en función de la concentración molar de etanol  $p$ , en la estirpe "grande" S288C de *S. cerevisiae* cultivada a 26°C. A. Por células totales. B. Por células viables. Cada resultado representa la media y desviación típica de 4 experimentos.

Así para el caso de la estirpe "petite" la expresión general es:

$$v = v_0 e^{-\frac{\ln 2}{K_i} p} \quad (44)$$

#### 4.1.2. Efecto del etanol sobre el crecimiento y la fermentación 2) Anaerobiosis

Para valorar el papel de la respiración, como causante de las diferencias encontradas entre el tipo de inhibición producido en las estirpes "grande" y "petite", se estudió la evolución de  $\mu$  y  $v$  en función de  $p$ , en anaerobiosis.

La anaerobiosis se consiguió de dos formas distintas:

- Anaerobiosis inmediata. Las células se cultivaron en aerobiosis, se transfirieron a condiciones de anaerobiosis (concentración de oxígeno < 0,05-0,1% v/v) e inmediatamente, en un intervalo menor a media hora, se midió la tasa de fermentación en el cultivo.

- Anaerobiosis permanente. Las células se cultivaron desde un principio en anaerobiosis ( $[O_2] < 0,05-0,1 \% v/v$ ).

La tasa de crecimiento de la estirpe S288C es inhibida por el etanol de una forma más pronunciada cuando se cultiva en anaerobiosis permanente que cuando se cultiva en aerobiosis (Fig. 14A). La relación entre  $\mu$  y  $p$  se ajusta mejor a la función exponencial que a la lineal (coeficiente de correlación > 0.99) rigiéndose por la ecuación (44).

En la Fig. 14B se observa que la tasa de fermentación medida en cultivos en anaerobiosis inmediata es inhibida por etanol de forma similar a la inhibición producida en aerobiosis (expresión (41)). Cuando se mide  $v$  en un cultivo que creció en anaerobiosis la inhibición es más fuerte que en los casos anteriores ajustándose mejor a la función exponencial según la expresión (44).

#### 4.1.3. Viabilidad en función de la concentración de etanol

Paralelamente a los estudios de inhibición del crecimiento y la fermentación por etanol, se ha determinado el efecto de éste

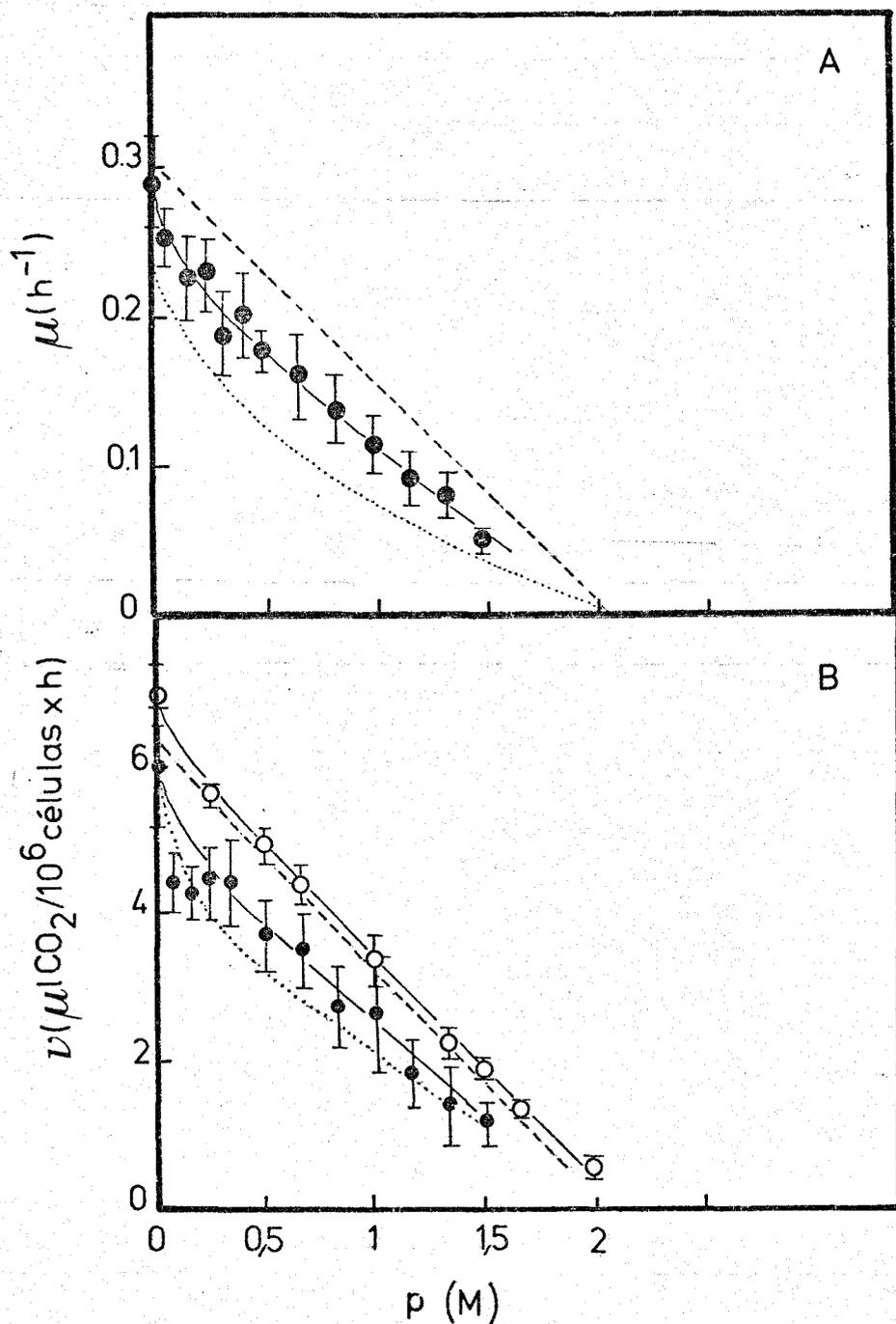


FIGURA 14. A. Inhibición de la tasa de crecimiento  $\mu$  en función de la concentración molar de etanol  $p$  en la estirpe "grande" S288C de *S. cerevisiae* en condiciones de anaerobiosis permanente (por células totales). B. Inhibición de la tasa de fermentación  $v$  en función de la concentración molar de etanol en la misma estirpe en condiciones de anaerobiosis inmediata (O) y de anaerobiosis permanente (●) (por células totales). La línea de trazos representa la inhibición de  $\mu$  en la estirpe ya mencionada y la punteada en la "petite" BE288-1, ambas cultivadas en aerobiosis a 26°C. Cada resultado representa la media y desviación típica de 4-5 experimentos.

sobre la viabilidad medida como proporción de células viables/células totales presentes en cada cultivo. Los resultados (Fig. 15) indican que las bajas concentraciones de etanol no afectan significativamente la viabilidad en la estirpe "grande" S288C en aerobiosis o en anaerobiosis; en la estirpe "petite" se observa una disminución poco significativa pero creciente de la viabilidad. A concentraciones de etanol superiores a 1,3 M la letalidad aumenta drásticamente en todos los casos estudiados.

#### 4.1.4 Rendimiento biomasa/sustrato $Y_{XS}$ en función de la concentración de etanol

Se ha estudiado también el rendimiento biomasa/sustrato  $Y_{XS}$  en relación con el etanol, rendimiento que ha sido determinado según la expresión (9):  $Y_{XS} = \mu / v$ ; para ello, se han transformado los  $\mu\text{l}$  de  $\text{CO}_2$  desprendidos en mg de glucosa consumidos (1  $\mu\text{l}$  de  $\text{CO}_2$  desprendido equivale a 4 mg de glucosa consumida). Según se deduce de la Fig. 16, ni en la estirpe "grande" (en aerobiosis o anaerobiosis) ni en su mutante "petite" se ha encontrado un cambio significativo del rendimiento  $Y_{XS}$  en función de la concentración de etanol.  $Y_{XS}$  en la estirpe "petite" posee un valor siempre inferior al de la estirpe "grande" (se producen  $1,0 \times 10^7$  células/mg glucosa en la estirpe "petite" frente a  $1,2-1,3 \times 10^7$  en la "grande").

Por tanto, el rendimiento es independiente de la concentración de etanol, tanto si existe respiración como si no.

#### 4.2. Variación de la constante de inhibición del etanol, para las tasas de crecimiento, fermentación y respiración, en función de la presencia o ausencia de funciones respiratorias.

Las constantes de inhibición de  $\mu$ ,  $v$  y  $\rho$  han sido determinadas según las ecuaciones que mejor expresan la relación entre estos parámetros y la concentración de etanol,  $p$ . No obstante, a concentraciones de etanol por debajo de 0,85 M la relación entre los

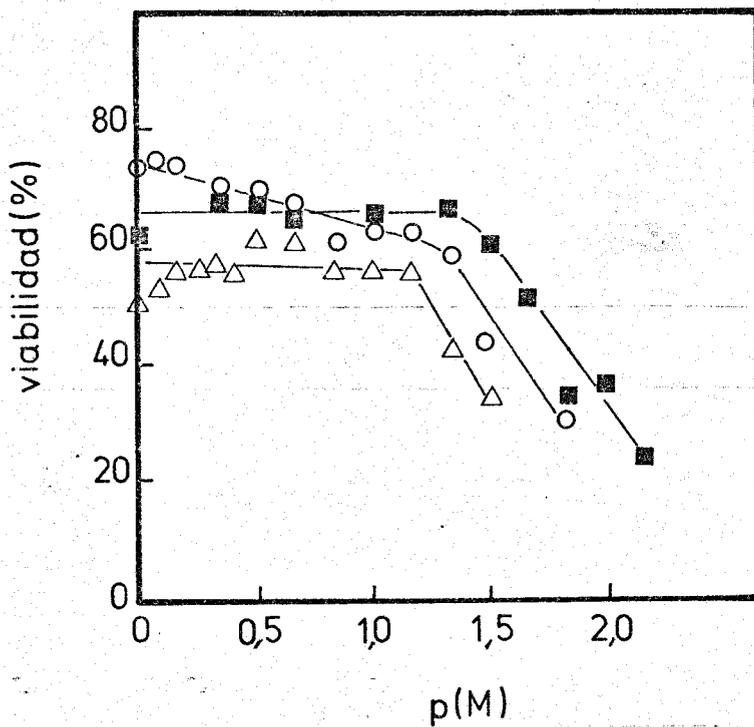


FIGURA 15. Viabilidad de las estirpes de *S. cerevisiae* "grande" S288C en aerobiosis (■) y anaerobiosis (△), y "petite" BE288-1 en aerobiosis (○), cultivadas en medio YEPDE con distintas concentraciones molares de etanol, p. Cada resultado representa la media y desviación típica de 4-5 experimentos.

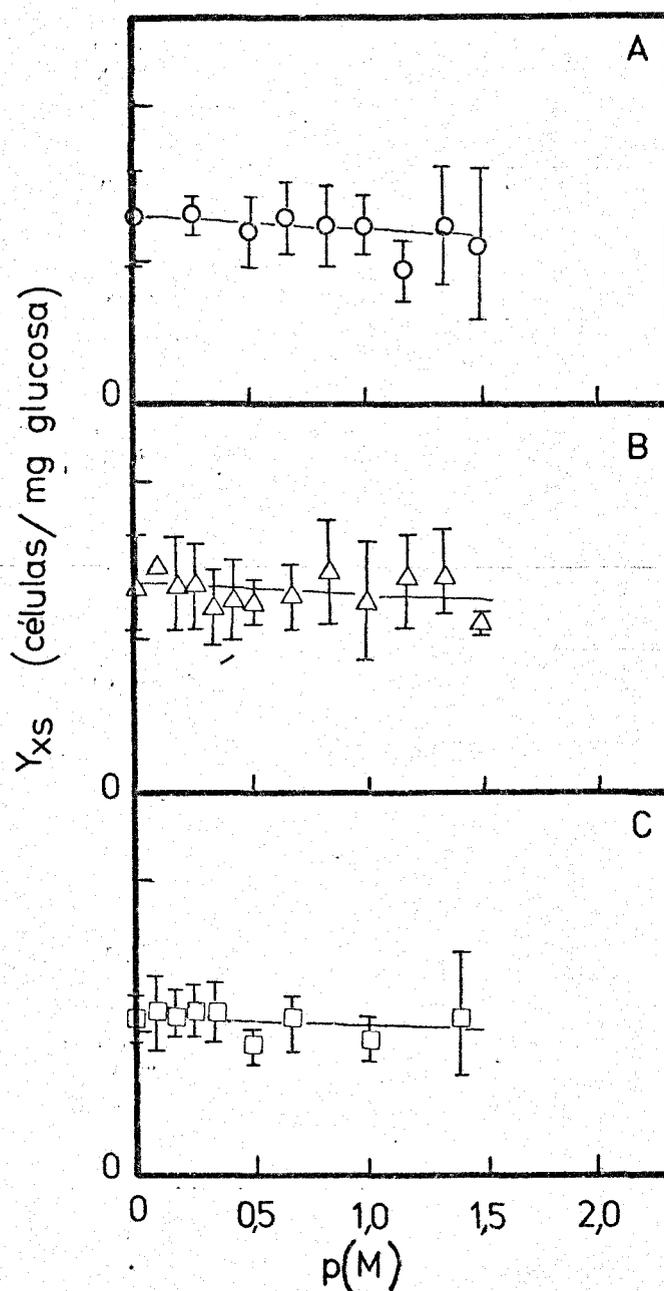


FIGURA 16. Rendimiento biomasa/sustrato  $Y_{XS}$  en función de la concentración molar de etanol  $p$  en las estirpes de *S. cerevisiae* "grande" S288C, cultivada en aerobiosis (A) y anaerobiosis (B) y "petite" BE288-1 (C) en aerobiosis. Cada resultado representa la media y desviación típica de 4-5 experimentos.

parámetros estudiados y  $p$ , puede ajustarse en todos los casos (coeficiente de correlación  $> 0.95$ ) a una relación hiperbólica (particularmente en los casos en que no hay respiración) expresada por la ecuación de Monod para un inhibidor no competitivo como el etanol (Pirt, 1975):

$$v = v_0 \frac{K_i}{K_i + p} \quad \text{para } s \gg K_s \quad (45)$$

Esta expresión se ha utilizado también para calcular el valor de  $K_i$ .

Los valores de  $K_i$ , obtenidos según las ecuaciones determinadas en este trabajo, son similares a aquellos obtenidos con la ecuación de Monod para concentraciones de etanol por debajo de 0,85 M (Tabla V). Cuando *S. cerevisiae* se cultiva en condiciones en las que la respiración es posible (la estirpe "grande" S288C cultivada

*TABLA V. Valores de la constante de inhibición  $K_i$  del etanol para la tasa de crecimiento  $\mu$ , de fermentación  $v$  y de respiración  $\rho$  en las estirpes de *S. cerevisiae* "grande" S288C, cultivada en condiciones de aerobiosis (1), anaerobiosis "inmediata" (2) y anaerobiosis permanente (3), y "petite" BE288-1, en aerobiosis (4).  $K_{ie}$ :  $K_i$  determinada a partir de las ecuaciones empíricas que mejor se ajustan en cada caso;  $K_{im}$ :  $K_i$  determinada por la ecuación de Monod; a) en función de las células totales; b) en función de las células viables.*

	(1)	(2)	(3)	(4)
	$K_{ie} \quad K_{im}$	$K_{ie} \quad K_{im}$	$K_{ie} \quad K_{im}$	$K_{ie} \quad K_{im}$
$\mu$	1,0 1,5 1,2 1,3	- - - -	0,7 0,7 - -	0,7 0,6
$v$	1,1 1,3 1,0 1,0	1,0 1,1 1,2 1,1	0,8 0,7 0,8 0,7	0,6 0,7 0,9 0,7
$\rho$	1,2 1,8 1,2 2,0	- - - -		

en aerobiosis) los valores de  $K_i$  para  $\mu$ ,  $v$  y  $\rho$  oscilan alrededor de 1,1 M cuando se deducen de las ecuaciones obtenidas en esta Tesis; y alrededor de 1,3 M para  $\mu$  y  $v$ , y 1,8 M para  $\rho$ , cuando

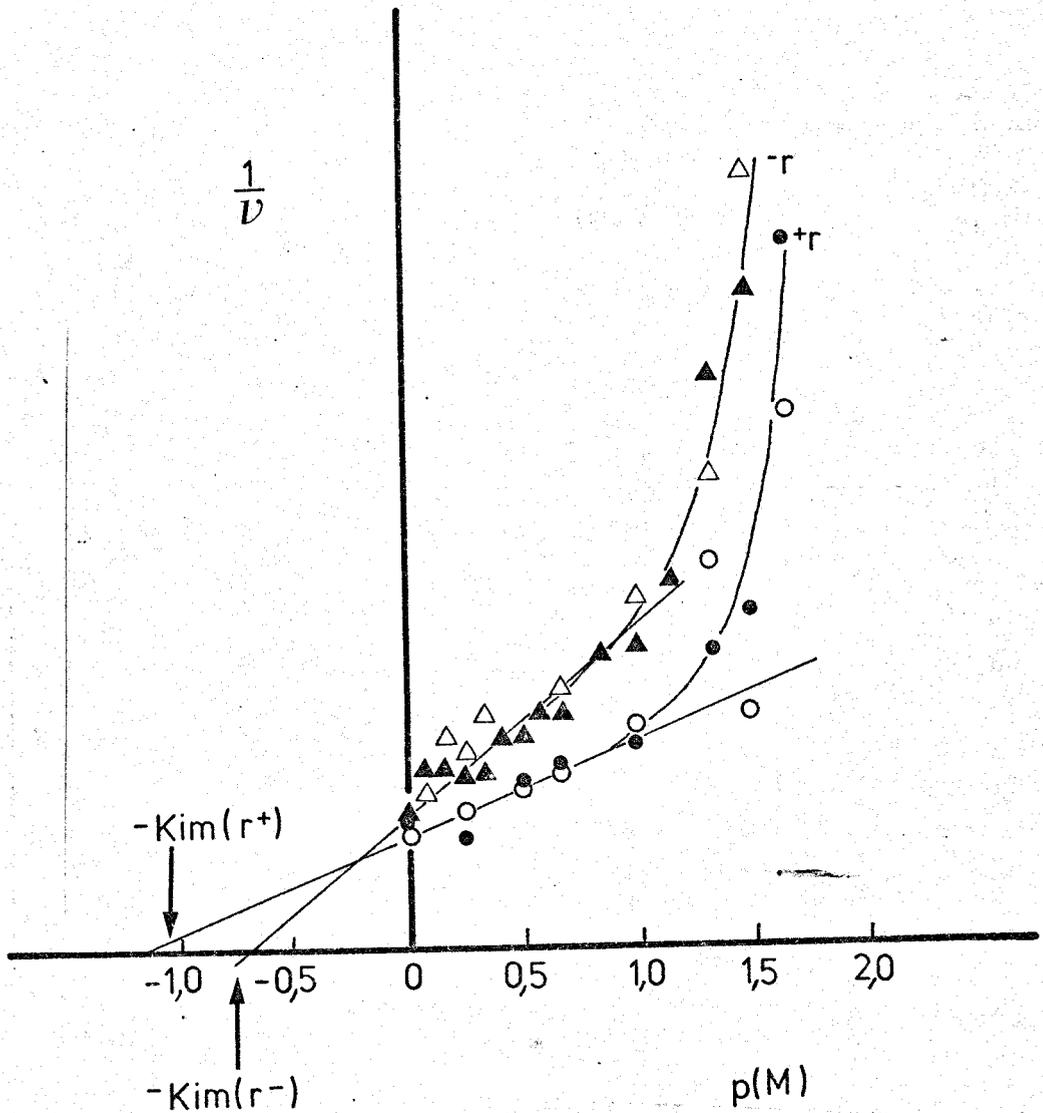


FIGURA 17. Representación de Lineweaver-Burk del inverso de la tasa de fermentación  $v$  en función de la concentración de etanol  $p$  en las estirpes de *S. cerevisiae* "grande" S288C cultivada en condiciones de aerobiosis ( $\bullet$ ), anaerobiosis inmediata ( $\circ$ ) y anaerobiosis permanente ( $\Delta$ ) y "petite" BE288-1 en aerobiosis ( $\blacktriangle$ ).  $k_{im}$ : constante de inhibición del etanol;  $r^+$ : con respiración; y  $r^-$  sin respiración.

se deducen de la ecuación de Monod. Cuando *S. cerevisiae* se cultiva en condiciones en las que la respiración no es posible (la estirpe "grande" S288C cultivada en anaerobiosis, y la estirpe "petite" BE288-1 en aerobiosis) los valores de  $K_i$  oscilan alrededor de 0,7 M independientemente del método utilizado para su cálculo.

La representación de Lineweaver-Burk (Fig. 17) refleja claramente las diferencias encontradas en el valor de la constante de inhibición del etanol para cada uno de estos procesos, según que las células sean cultivadas en condiciones en las que la respiración es o no posible.

#### 4.3. Las mitocondrias como responsable de los diferentes tipos de inhibición del crecimiento y la fermentación en las estirpes "grande" y "petite".

El objetivo de este apartado es determinar si los factores responsables de la diferente inhibición del crecimiento y la fermentación por etanol en las estirpes "grande" S288C y "petite" BE288-1 de *S. cerevisiae* son citoplásmicos. Para ello se ha transferido citoplasma con mitocondrias funcionales desde la estirpe AH28X (isogénica de S288C pero con marcadores adicionales apropiados

**TABLA VI.** Tasa de crecimiento ( $h^{-1}$ ) y de fermentación ( $\mu l CO_2/10^6$  células  $\times h$ ) en las estirpes "grande" S288C y BE288-SC y "petite" BE288-1 y BE288-SP de *S. cerevisiae* en YEPD e YEPDE (1M etanol). %i: % de inhibición de  $\mu$  o  $v$  en YEPDE (1 M) respecto de YEPD.

Estirpes	$\mu$			$v$		
	YEPD	YEPDE (1M)	%i	YEPD	YEPDE (1M)	%i
S288C	0,390	0,185	53,6	8,6	4,3	50,0
BE288-1	0,345	0,095	72,5	8,4	2,6	58,5
BE288-SC	0,380	0,190	50,0	6,8	4,0	42,6
BE288-SP	0,330	0,098	70,3	6,7	2,5	61,7

para este tipo de experimento) a la estirpe "petite" BE288-1 y se ha estudiado nuevamente su comportamiento en etanol. Como intermediario de la transferencia se utilizó el mutante de fusión nuclear XW5/1-3C. A partir de esta estirpe se obtuvo, mediante tratamiento con bromuro de etidio (Materiales y Métodos, apartado 9.2.) un mutante "petite" que se cruzó seguidamente con la estirpe AH28X. Sembrando la mezcla conjugante en medio selectivo con glicerol se seleccionaron los heteroplasmones que contenían el núcleo de XW5/1-3C y citoplasma (incluidas las mitocondrias) de ambas estirpes. Esta nueva estirpe se cruzó con la BE288-1 y sembrando en medio mínimo con glicerol se seleccionaron los heteroplasmones con el núcleo de BE288-1 y el citoplasma de ambas (incluidas las mitocondrias funcionales de AH28X). El hecho de que se consigán este tipo de heteroplasmones indica que la mutación "petite" de BE288-1 era de tipo mitocondrial.

En este experimento se aislaron 4 colonias distintas, que fueron sometidas al ensayo de nivel de ploidía (Materiales y Métodos, apartado 11.3.). De las cuatro colonias seleccionadas sólo una resultó ser haploide y se la denominó BE288-SC; las otras tres eran poliploides, debido probablemente a endomitosis inducida por la propia mutación *kar* (Polaina y Conde, 1982). Posteriormente, se obtuvieron mutantes "petite" espontáneos de cada una de las estirpes, y tanto a éstas como a sus respectivos parentales "grande" se les determinaron las tasas de crecimiento y fermentación en medio YEPDE. En la Tabla VI se observa que la nueva estirpe BE288-SC se comporta igual que la estirpe "grande" S288C, y que el "petite" espontáneo BE288-SP (procedente de la cepa "grande" BE288-SC) se comporta como el "petite" BE288-1. El porcentaje de inhibición en YEPDE (1 M etanol); tanto para  $\mu$  como para  $v$ , es en todas las estirpes estudiadas (incluidas los tres diploides obtenidos, no reflejados en la Tabla) de alrededor del 70% en los mutantes sin mitocondrias funcionales y alrededor del 50% cuando poseen mitocondrias funcionales.

4.4. La adaptación como posible causa de la diferente inhibición por etanol de  $\mu$  y  $v$  en las estirpes "grande" y "petite"

En el apartado anterior se vio que  $\mu$  y  $v$  eran inhibidos por etanol de forma diferente en la estirpe "grande" y en el mutante "petite". Los valores de  $\mu$  y  $v$  se han determinado en todos los casos después de que los cultivos han permanecido unas 24 h en contacto con el etanol. Por esta razón, se decidió investigar si el diferente comportamiento observado en las estirpes "grande" y "petite" se debía a la existencia de algún proceso de adaptación al etanol distinto en cada estirpe.

Para ello se determinó en primer lugar  $\mu$  y  $v$  en las estirpes "grande" y "petite" cuando eran cultivadas en medio YEPD; en segundo lugar, cuando se transfería a YEPDE (1 M etanol), pero dentro de las dos primeras horas que seguían a la transferencia; finalmente en YEPDE (1 M etanol), después de 24 ó 48 h de permanencia en dicho medio (Tabla VII).

*TABLA VII. Tasas de crecimiento  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) y fermentación  $v$  ( $\mu l CO_2/10^6$  células  $\times$  h) de las estirpes "grande" S288C y "petite" BE288-1 de *S. cerevisiae* cultivadas en YEPD y en YEPDE (1 M de etanol) entre 1 y 2 h (YEPDE [2]) y 24 h después (YEPDE [24]) de haber sido transferidas desde YEPD. %i: Porcentaje de inhibición de  $\mu$  y  $v$  en medio YEPDE (1 M etanol) respecto de YEPD.*

	Estirpes	$\mu - v$			% i	
		YEPD	YEPDE [2]	YEPDE [24]	YEPDE [2]	YEPDE [24]
$\mu$	S288C	0,340 $\pm$ 0,012	0,185 $\pm$ 0,021	0,190 $\pm$ 0,031	45,6	44,1
	BE288-1	0,275 $\pm$ 0,020	0,135 $\pm$ 0,021	0,095 $\pm$ 0,007	50,9	65,5
$v$	S288C	4,80 $\pm$ 0,06	2,42 $\pm$ 0,12	2,64 $\pm$ 0,26	49,6	45,0
	BE288-1	4,31 $\pm$ 0,32	2,18 $\pm$ 0,19	1,46 $\pm$ 0,08	49,4	66,1

Cuando se determinó  $\mu$  y  $v$  inmediatamente después de la transferencia desde un cultivo en plena fase exponencial ( $D.O.660 = 0.4$ ) a medio con etanol, se observó que el porcentaje de inhibición de  $\mu$  y  $v$  era el mismo en ambas estirpes (45-50%). A las 24 h o más de cultivo en este medio, el porcentaje de inhibición se mantenía para la estirpe

"grande" S288C, pero aumentaba hasta los valores normales obtenidos en esta Tesis (apartado 4.1.) en la estirpe "petite" (65%). Los resultados manifiestan, a diferencia de lo que ocurre en la estirpe "grande", una incapacidad de la estirpe "petite" para mantener los niveles iniciales de inhibición (45-50%).

TABLA VIII. Constantes de inhibición,  $K_i$ , del etanol para la tasa de crecimiento en las estirpes "grande" S288C y "petite" BE288-1 de S. cerevisiae a diferentes temperaturas de incubación (T)

T	$K_i$ (M)	
	S288C	BE288-1
22°C	1,1	0,6
26°C	1,1	0,6
30°C	1,1	0,6
37°C	0,7	0,7

#### 4.5. Efecto de la temperatura sobre la inhibición por etanol del crecimiento y la fermentación en las estirpes "grande" y "petite"

##### 4.5.1. Inhibición de la tasa de crecimiento

Ya que la tolerancia al etanol varía con la temperatura (Lee et al., 1982) se ha determinado la influencia de ésta sobre la inhibición de  $\mu$  por etanol en las estirpes "grande" S288C y "petite" BE288-1 de S. cerevisiae. Para ello se ha estudiado esta inhibición a 22, 30 y 37°C. En ambas estirpes y a cualquier temperatura (Fig.18)  $\mu$  es inhibida de modo similar al que tiene lugar a 26°C: linealmente en la estirpe "grande" y exponencialmente en la "petite". En la Tabla VIII se observa que la constante de inhibición en la estirpe "petite" no varía con la temperatura dentro del rango estudiado, mientras en la estirpe "grande" el valor de  $K_i$  es alrededor de 1,1 M a las temperaturas iguales o inferiores a la óptima de crecimiento, y decrece de forma sensible a 37°C, asemejándose al de la estirpe "petite" (0,7 M).

Por último, la representación de Arrhenius de la Fig. 18 muestra que el etanol hace descender la temperatura máxima de crecimiento en ambas estirpes.

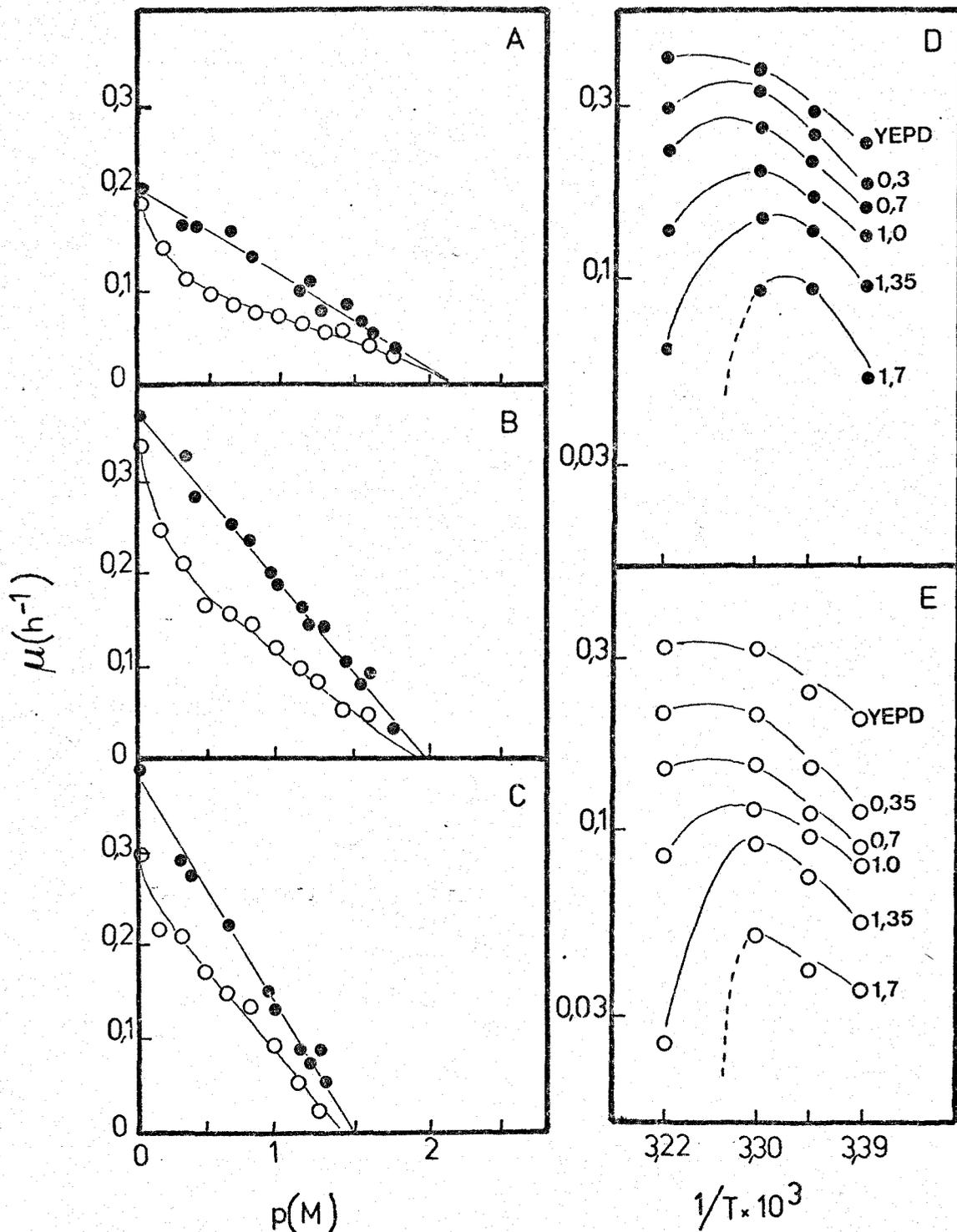


FIGURA 18. Inhibición de la tasa de crecimiento  $\mu$  en función de la concentración molar de etanol  $p$  en las estirpes "grande" S288C (●) y "petite" BE288-1 (○) de *S. cerevisiae* a las temperaturas de 22°C (A), 30 (B) y 37°C (C), y representación de Arrhenius de la tasa de crecimiento en función del inverso de la temperatura en las mismas estirpes S288C (D) y BE288-1 (E). El número de cada curva equivale a la concentración molar de etanol de cada medio YEPDE. Cada resultado representa la media de 4 experimentos.

#### 4.5.2. Tolerancia de la fermentación al etanol

La tolerancia de la fermentación al etanol (concentración máxima de etanol a la que es posible la fermentación), ha sido determinada en las estirpes "grande" y "petite" en medio YEPDE a 22, 26, 30 y 37°C. Según se observa en la Fig. 19 esta tolerancia es la misma a temperaturas iguales o inferiores a la óptima de crecimiento (30°C) (hay fermentación hasta concentraciones de 2,4 M de etanol), mientras que es menor a 37°C (fermentación sólo hasta 1,4 M de etanol), con valores similares en ambas estirpes, a cada temperatura. Por tanto, la presencia o ausencia de respiración no afecta a la tolerancia de la fermentación al etanol en S. cerevisiae.

#### 4.6. Composición lipídica de S. cerevisiae

La necesidad del oxígeno en la formación de ácidos grasos insaturados y la importancia de estos y del ergosterol en la tolerancia al etanol, son datos perfectamente establecidos y de los que hay abundante información en la literatura (Hunter y Rose, 1971). En este apartado se ha intentado determinar el papel que juegan estos lípidos en las diferencias encontradas en la inhibición por etanol de las estirpes "grande" y "petite". Para ello se ha analizado la composición de ácidos grasos y esteroides de las estirpes S288C y BE288-1 en función de la concentración de etanol, en las mismas condiciones en las que se detectaron diferencias en la K<sub>i</sub>, y a 30°C.

##### 4.6.1. Análisis de los lípidos en función de la edad del cultivo

Hay que tener en cuenta, que la composición lipídica de levaduras no es constante sino que depende de las condiciones de crecimiento a las que están sometidas, la edad de cultivo, la temperatura, etc. (Hunter y Rose, 1971). Por esta razón se ha estudiado previamente, la composición de ácidos grasos de la estirpe S288C

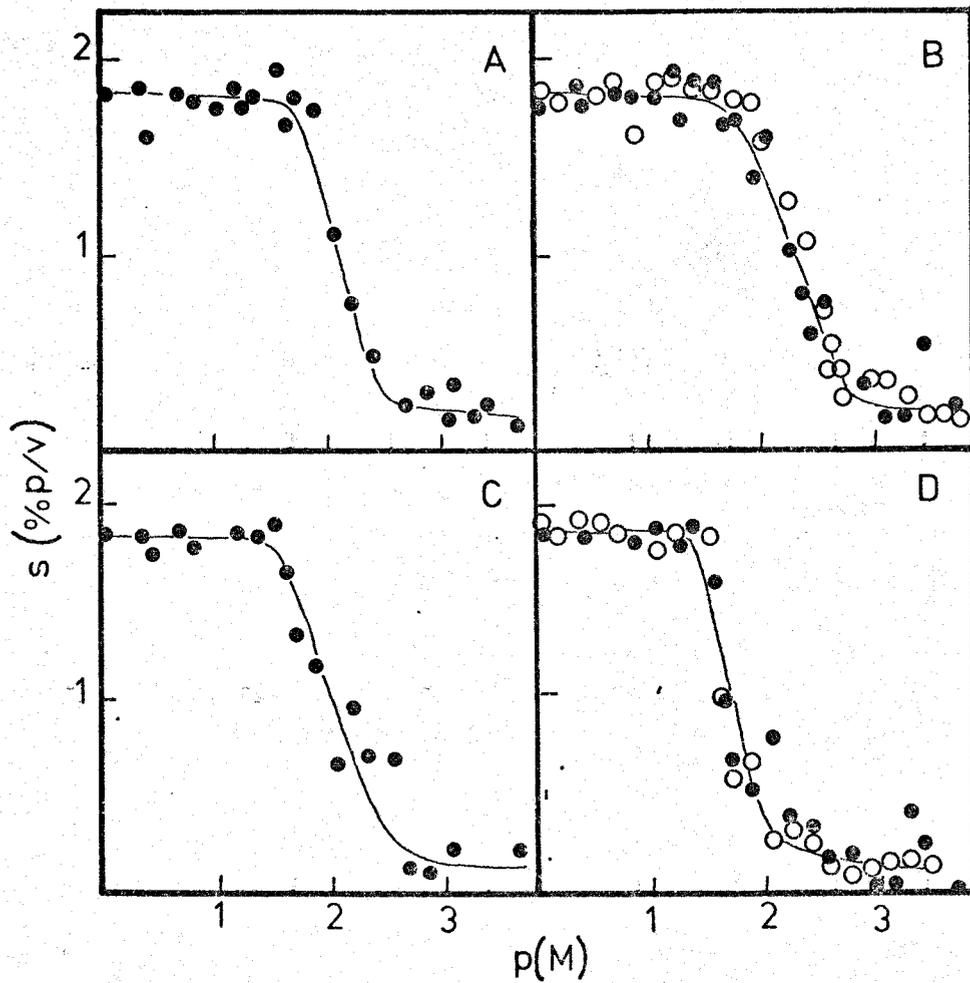


FIGURA 19. Glucosa consumida  $s$  a los 7 días de incubación en medio YEPDE en función de la concentración molar de etanol  $p$ , en las estirpes "grande" S288C (●) y "petite" BE288-1 (○) de S. cerevisiae a 22 (A), 26 (B), 30 (C) y 37°C (D).

en función de la edad de cultivo. Según se observa en la Tabla IX, el grado de saturación de sus ácidos grasos, en células cultivadas en medio YEPD a 30°C, disminuye cuando el cultivo envejece, pasando de ser 30% en las primeras horas, a 20% en cultivos de más de 48 horas. Sin embargo, la longitud media de las cadenas, expresada como la proporción de ácidos grasos de 16 átomos de C frente a los de 18 (C16/C18), se mantiene constante. Todo esto es consecuencia de un aumento de la proporción de ácido palmítoleico (16:1) y una disminución de la de palmítico (16:0), que afecta sólo al grado de saturación y no a la longitud media de las cadenas de los ácidos grasos.

TABLA IX. Composición lipídica de *S. cerevisiae* S288C en función de la edad del cultivo en medio YEPD a 30°C. <: ácidos grasos con menos de 16 átomos de C; 16:0: palmítico; 16:1: palmítoleico, 18:0: estearico; 18:1: oleico; GS: grado de saturación (%); C16/C18: relación entre ácidos grasos de 16 y de 18 átomos de carbono.

t(h)	D.O. 660nm	Ácidos grasos (%)					GS	C16/C18
		<	16:0	16:1	18:0	18:1		
2	0,30	2,9	23,5	44,1	2,9	26,5	29,3	2,3
5	0,74	3,3	27,3	43,8	3,3	22,3	33,9	2,8
9	0,84	2,5	25,0	42,5	3,8	26,2	31,3	2,3
16	1,50	2,1	20,9	48,0	5,0	24,0	27,3	2,4
30	1,50	1,5	19,4	49,2	3,5	26,4	24,4	2,3
54	1,50	1,6	15,9	56,2	2,3	24,0	19,8	2,7

#### 4.6.2. Análisis de los lípidos en función de la concentración de etanol y la capacidad respiratoria

Una vez conocido como varía la composición de ácidos grasos de *S. cerevisiae* con la edad del cultivo se ha determinado la composición lipídica de las estirpes "grande" S288C y "petite" BE288-1 en función de la concentración de etanol en medio YEPDE a 30°C, recogiendo los cultivos a una concentración celular

constante (alrededor de  $10^8$  células/ml).

En la Tabla X se observa que en ambas estirpes el grado de saturación de los ácidos grasos es el mismo (22-23%) cualquiera que sea la concentración de etanol, mientras la longitud de sus cadenas aumenta (el cociente C16/C18 disminuye). Esto es debido a una disminución de las proporciones de ácido palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1) y un aumento de las de esteárico (18:0) y oleico (18:1). En ambas estirpes la relación entre el peso de los ácidos grasos y el peso seco de levaduras (AG/B) disminuye ligeramente con la concentración de etanol. No obstante, la longitud media de las cadenas y la concentración de ácidos grasos totales por peso seco de levadura suele ser siempre ligeramente superior en la estirpe "petite".

TABLA X. Composición lipídica de las estirpes de *S. cerevisiae* "grande" S288C y "petite" BE288-1 en función de la concentración molar de etanol,  $p$ , en medio YEPDE a 30°C. <: ácidos grasos con menos de 16 átomos de C; 16:0: palmítico; 16:1: palmitoleico; 18:0: esteárico; 18:1: oleico; GS: grado de saturación (%); C16/C18: relación entre ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono; AG/B:  $\mu\text{g}$  de ácidos grasos/mg de peso seco de levadura.

Estirpes	p(M)	Acidos grasos (%)					GS	C16/C18	AG/B
		<	16:0	16:1	18:0	18:1			
S288C	0	1,6	14,8	47,2	3,9	32,6	23,0	1,7	1,7
	0,35	1,2	11,7	44,9	4,0	38,4	-	1,4	1,8
	0,70	0,9	13,2	40,2	5,6	40,0	23,7	1,2	1,4
	1,0	0,6	8,6	38,3	6,1	46,4	-	0,9	1,4
	1,35	0,8	12,9	37,3	6,7	42,3	22,2	1,0	1,1
	1,70	1,4	11,6	37,9	6,8	42,8	23,7	1,1	1,1
BE288-1	0	1,3	16,3	43,9	5,0	33,5	22,6	1,6	2,1
	0,35	0,6	16,5	36,6	7,3	39,0	24,4	1,2	2,1
	0,70	0,6	15,0	33,4	8,1	42,8	23,7	1,0	1,8
	1,0	0,6	14,1	33,5	7,6	44,3	22,2	0,9	2,0
	1,35	0,8	11,6	33,2	7,9	46,4	22,1	0,8	1,4
	1,7	0,7	13,5	39,2	6,2	40,5	20,3	1,2	1,7

Cada resultado representa la media de 3-4 experimentos.

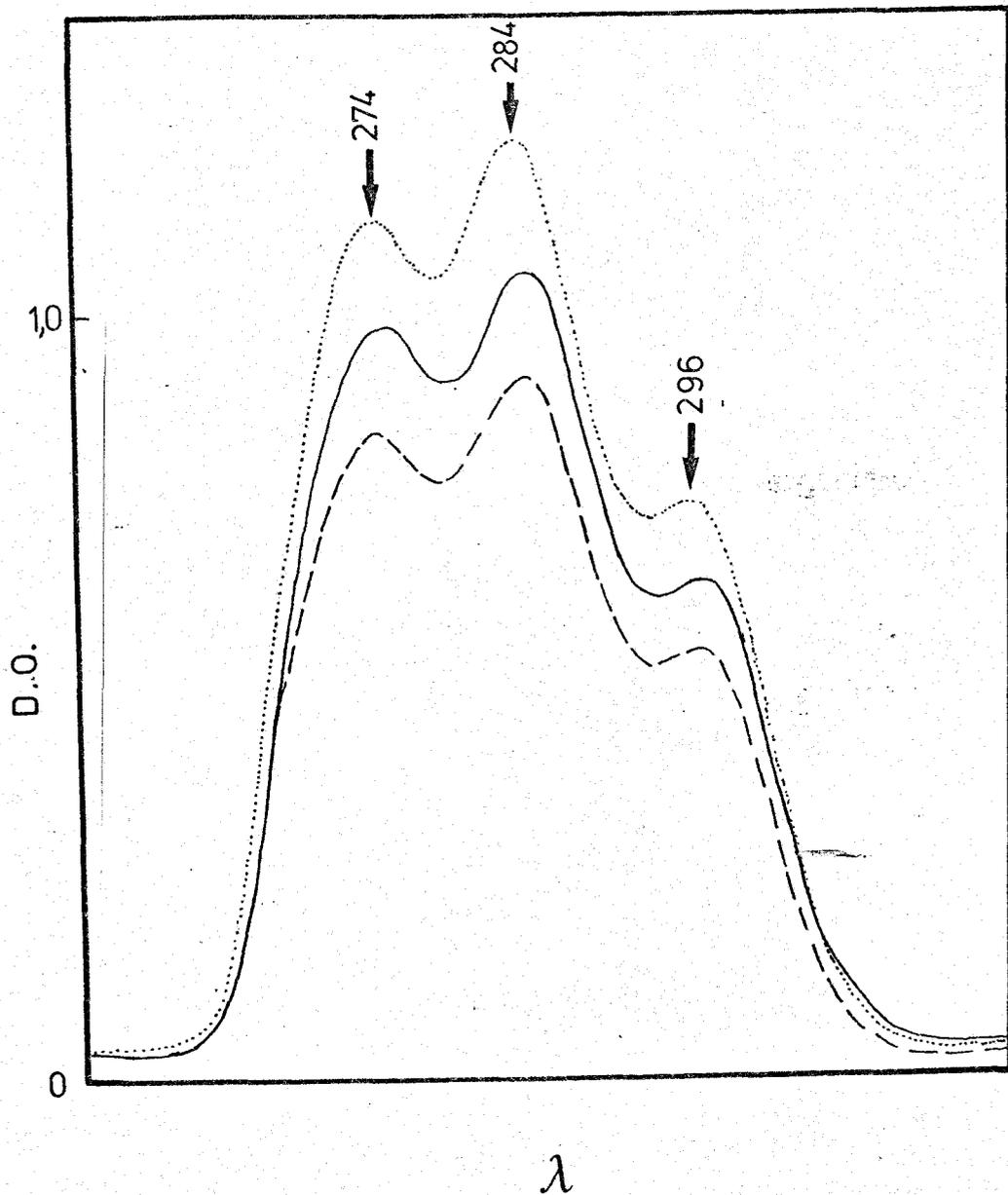


FIGURA 20. Espectro de absorción de la fracción de lípidos no saponificables de las estirpes de *S. cerevisiae* "grande" S288C (—) y "petite" BE288-1 (---), y del ergosterol (.....), disueltos en cloroformo.

El ergosterol aparece en todos los casos como el componente principal de los esteroides totales (Fig. 20). La concentración de ergosterol es la misma para ambas estirpes a cada concentración de etanol estudiada (Tabla XI).

TABLA XI. Concentración relativa de ergosterol en las estirpes "grande" S288C y "petite" BE288-1 de *S. cerevisiae* cultivadas en medio YEPDE con diferentes concentraciones molares de etanol, p, tomando como unidad la concentración de ergosterol de la estirpe S288C en medio YEPD.

p (M)	S288C	BE288-1
0	1,0	1,1
0,7	1,0	1,0
1	0,6	0,6

## 5. GENÉTICA DE LA SENSIBILIDAD A ETANOL EN *S. cerevisiae*

En este capítulo se ha investigado la base genética de la tolerancia al etanol en *S. cerevisiae*, en mutantes más sensibles a etanol que la estirpe silvestre. Estos mutantes se han obtenido por tratamiento con Nitrosoguanidina, se han caracterizado genéticamente mediante estudios de dominancia-recesividad y complementación, y fisiológicamente, determinando el efecto del etanol sobre su crecimiento, viabilidad, fermentación y composición lipídica.

### 5.1. Obtención de mutantes sensibles a etanol

La estirpe *S. cerevisiae* S288C se trató con Nitrosoguanidina (Materiales y Métodos, apartado 9.1.). Se seleccionaron aquellos mutantes que siendo capaces de crecer y formar colonias en cajas con medio YEPD, eran incapaces de hacerlo en cajas con medio YEPDE con una concentración de etanol a la que la estirpe silvestre si

crecía y formaba colonias (Materiales y Métodos, apartado 10).

Se realizaron 4 tratamientos mutagénicos en los cuales la supervivencia fue alrededor del 33%. De los tres primeros, realizados con objeto de optimizar el método de selección, se obtuvo, un solo mutante monogénico (PSA1) a partir de 2130 colonias aisladas de cajas con medio YEPD, YEPG y SD (este mutante se estudia junto con los obtenidos posteriormente). En el último tratamiento mutagénico se aislaron 13.880 colonias que habían crecido en cajas con medio YEPD, YEPG y SD. De ellas, 572 fueron incapaces de crecer en cajas con medio YEPDE (1,2 M) durante 3 días de incubación a 30°C. A continuación se determinó el grado de sensibilidad de estos mutantes, estudiando su tasa de crecimiento en medio líquido YEPD e YEPDE (1 M etanol) a 30°C, con objeto de seleccionar sólo aquellos mutantes con tasa de crecimiento similar a la del parental silvestre en medio YEPD, pero incapaces de crecer, o con crecimiento muy inhibido, en medio YEPDE (1 M etanol). En los mutantes cultivados en este último medio se encontraron, básicamente, tres tipos de comportamiento marcadamente distintos al de la estirpe silvestre: 37 colonias alcanzaban la fase estacionaria a concentraciones celulares inferiores ( $DO_{660\text{ nm}} = 0,4-0,6$ ) a las que alcanza la estirpe silvestre S288C ( $DO_{660\text{ nm}} = 1,3$ ), o bien poseían una curva de crecimiento bifásica; 39 presentaban una fase de latencia entre 20 y más de 100 horas (en la estirpe S288C ésta no es mayor de 6 h), y 64 poseían un tiempo de generación superior a 20 h.

En la Fig. 21A se representa la distribución de los tiempos de generación en medio YEPDE (1 M) de los 572 mutantes preseleccionados, donde se observa una mayoría de mutantes con comportamiento similar al de la estirpe silvestre. Esta distribución no es consecuencia del comportamiento de estos mutantes en medio YEPD (Fig. 21B), ya que los que poseen un tiempo de generación similar al del tipo silvestre en medio YEPD muestran una distribución de sus tiempos

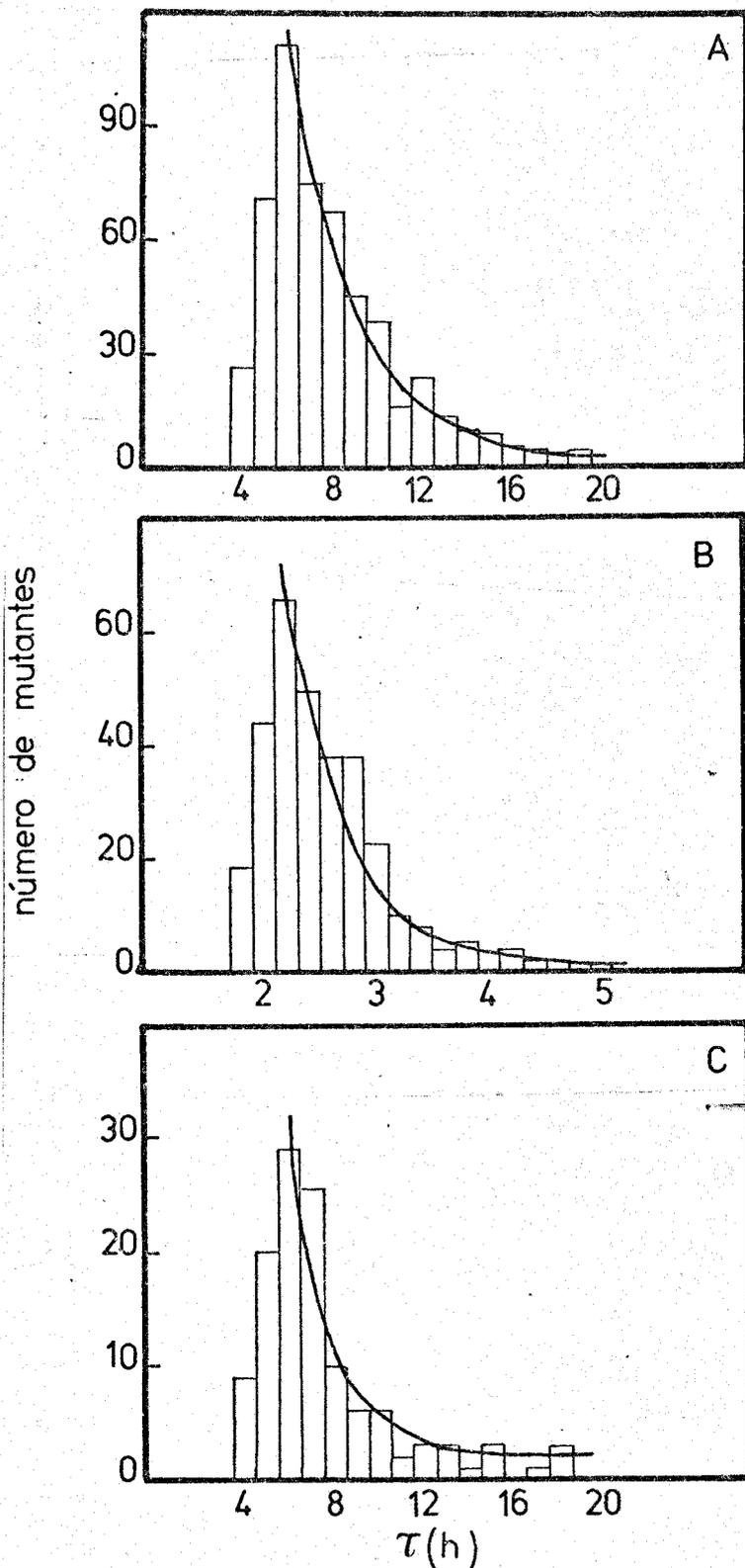


FIGURA 21. A. Distribución de los tiempos de generación  $\tau$ , en medio YEPDE (1 M etanol) a 30°C de 572 mutantes sensibles a etanol de la estirpe S288C de *S. cerevisiae*, obtenidos tras tratamiento con nitrosoguanidina. B. Distribución de  $\tau$  en medio YEPD a 30°C, de 274 de los mutantes anteriores. C. Distribución de  $\tau$  en medio YEPDE (1 M de etanol) de 122 mutantes de los 264 anteriores cuyo  $\tau$  en medio YEPD es similar al de la estirpe parental S288C, a 30°C.

de generación en medio YEPDE (1 M etanol) (Fig. 21C) igual a la del total de los mutantes. Con objeto de estudiar aquellas mutaciones que alteran drásticamente la sensibilidad del crecimiento a etanol se han seleccionado los 46 mutantes que, o bien eran incapaces de crecer en medio YEPDE (1 M etanol) a las 70 h de incubación, o bien poseían un tiempo de generación superior a 20 h.

## 5.2. Caracterización genética de los mutantes obtenidos

### 5.2.1. Estudios de dominancia-recesividad

A continuación se estudió la relación de dominancia o recesividad que poseen estas mutaciones con el alelo silvestre correspondiente. Los 46 mutantes seleccionados se cruzaron con la estirpe AH28X, isogénica de S288C pero de sexo a y auxótrofa para histidina. Los diploides se aislaron por micromanipulación (Materiales y Métodos, apartado 11.2.) y se determinó si eran incapaces de crecer en cajas de medio YEPDE (1,2 M etanol), en el que los mutantes sensibles a etanol no lo hacen tras incubación a 30°C durante 48h. Todos los diploides crecieron, de lo que se deduce que todas las mutaciones en estudio son recesivas.

### 5.2.2. Análisis de tétradas

Los diploides descritos en el apartado anterior se esporularon, y ascas procedentes de cada uno de ellos se micromanipularon y analizaron. De los 47 mutantes seleccionados (incluido el mutante PSA1) sólo se estudió la segregación de 40 de sus diploides, concretamente de aquellos que mostraron un grado de esporulación a 22°C en 15 días superior al 1% y de germinación de sus esporas por encima del 70%. Se analizó la segregación del crecimiento de entre 8 y 20 tétradas de cada diploide en cajas de medio SD, YEPD (1,2 M etanol) y YEPDE (1,5 M etanol) a 30°C, y en medio YEPD a 37°C. Como se esperaba, todas las tétradas estudiadas segregaron 2+:2- para el crecimiento en medio SD. En 23 de los 40 diploides

TABLA XII. Segregación del crecimiento en medio YEPDE (1,2 M etanol) y YEPDE (1,5 M etanol) a 30°C de las tétradas de los diploides obtenidos de cruces entre la estirpe AH28X y los mutantes sensibles a etanol. G: germinación; TAM: mutantes afectados en el tamaño de sus colonias, tss: mutantes con fenotipo termosensible

Estirpes mutantes	G(%)	YEPDE			*
		2+:2-	0+:4-	1+:3-	
PSA1	100	17	0	0	
MSE1	93	10	0	1	TAM
MSE2	88	14	0	0	
MSE3	96	15	0	0	TAM
MSE4	91	10	0	0	
MSE5	86	13	0	0	TAM
MSE6	100	7	0	0	
MSE7	96	6	0	0	
MSE8	99	16	0	0	TAM
MSE9	89	5	0	0	
MSE10	84	7	0	1	
MSE11	96	6	0	0	
MSE12	99	17	0	1	tss
MSE13	96	5	0	0	tss
MSE14	96	15	0	1	
MSE15	100	6	0	0	tss
MSE16	93	6	0	0	tss
MSE17	96	5	0	0	tss
MSE18	100	7	0	0	
MSE19	89	5	0	0	tss
MSE20	100	6	0	0	
MSE21	93	6	0	0	tss
MSE22	100	6	0	0	tss
MDS1	93	1	1	4	

\* Otros caracteres que cosegregan con la sensibilidad al etanol.

(Tabla XII) todas las tétradas segregaron 2+:2- para el crecimiento en YEPDE (1,2 M etanol) y YEPDE (1,5 M etanol), lo que indica que la sensibilidad al etanol de cada mutante parental era determinada por un solo gen. Esta segregación era típica de dos alelos no ligados (4 [1+:3-], 1 [0+:4-] y 1 [2+:2-]), y en los 16 restantes, las segregaciones no correspondían a las típicas de caracteres monogénicos o digénicos. De los 23 mutantes monogénicos obtenidos, 8 son además termosensibles (incapaces de crecer en medio YEPD a 37°C, pero sí a 30°C), y 4 forman colonias más pequeñas que el tipo silvestre en medio YEPD a 30°C (Fig.22). Ambos caracteres

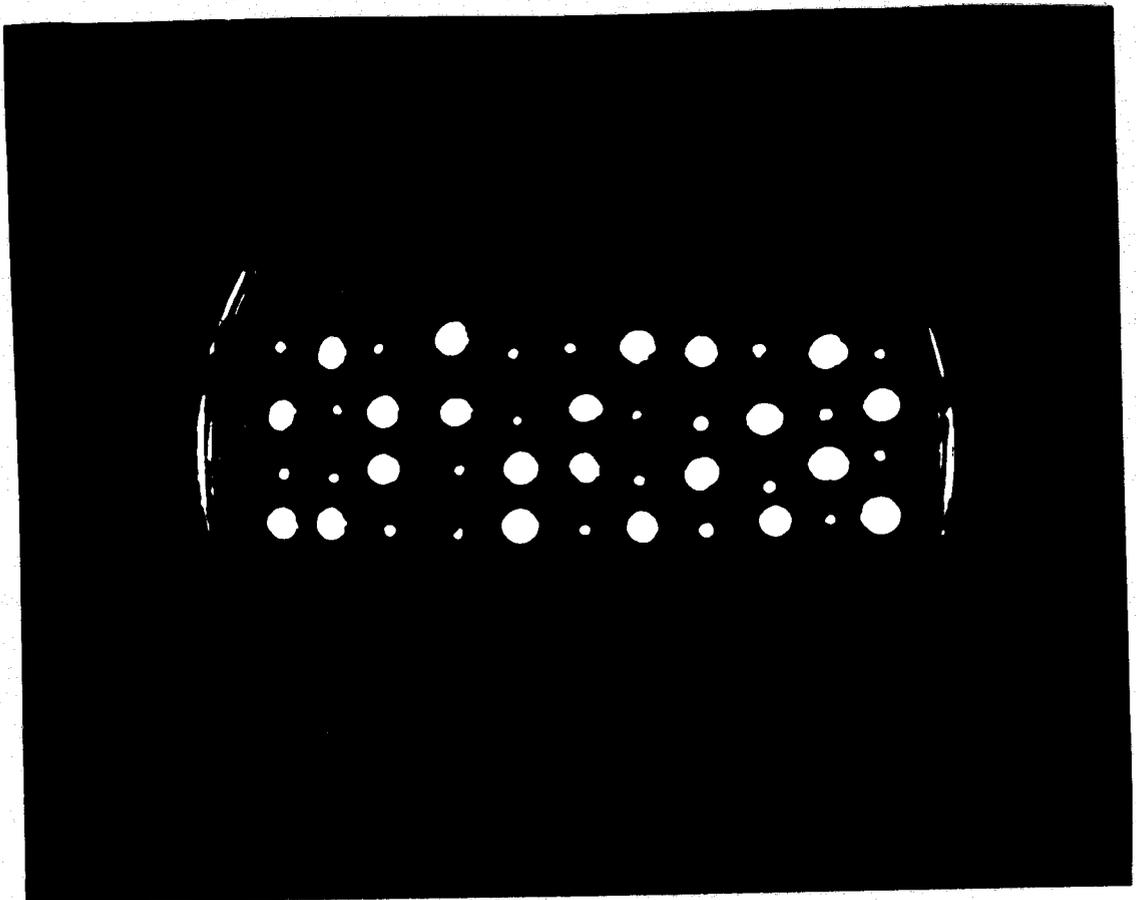


FIGURA 22. Segregación del tamaño de las colonias de las tétradas de los diploides del cruzamiento entre la estirpe AH28X y el mutante sensible a etanol MSE1, en YEPD a 30°C (segregación similar se observa con los mutantes MSE3, MSE5 y MSE8). La colonia grande es la típica del parental silvestre.

están ligados al de la sensibilidad al etanol. Todos los mutantes monogénicos son protótrofos y de fenotipo "grande", y alguno de ellos presentan alteraciones en la morfología celular (Fig. 23).

### 5.2.3. Estudios de complementación

Se han investigado a cuantos grupos de complementación distintos pertenecen los mutantes monogénicos sensibles a etanol. Para ello, se seleccionó una espora de sexo  $\alpha$  y otra de sexo  $a$  de entre las sensibles a etanol obtenidas del cruzamiento de cada mutante con el tipo silvestre, y a continuación, se realizaron todos los cruza- mientos posibles entre ellos. La mezcla conjugante formada por los parentales haploides y los cigotos diploides se transfirió de cajas con medio YEPD a medio líquido YEPDE (1 M) etanol observándose el cre- cimiento de los diploides tras 48 h de incubación a 30°C (las estir- pes haploides parentales eran incapaces de crecer en estas condicio- nes). Los resultados mostraron que 21 mutantes monogénicos estudia- dos definen 20 grupos de complementación distintos. Sólo las estir- pes MSE13 y MSE15 no complementaron, es decir, sus mutaciones se lo- calizan en el mismo gen.

## 5.3. Caracterización fisiológica de los mutantes monogénicos

### 5.3.1. Inhibición de la tasa de crecimiento

Se ha determinado la tasa de crecimiento de los mutantes monogénicos en medios YEPD y YEPDE con concentraciones de etanol de 0,35, 0,5, 0,7, 0,9, 1,0 y 1,2 M, a 30°C (Tabla XIII). Sólo cuatro de ellos manifestaron una tasa de crecimiento en YEPD inferior a la de la estir- pe silvestre S288C. El efecto que cada mutación ejerce sobre la tasa de crecimiento en YEPDE es diferente: su constante de inhibición del eta- nol  $K_i$  oscila desde valores inferiores a 0,35 M en 6 de los mutantes has- ta valores de 0,8 M en los 2 mutantes menos sensibles ( $K_i$  de S288C=1,05 M).

La concentración máxima de etanol a la que es posible el cre- cimiento (Fig. 24) se describe junto con los datos de producción de etanol de cada mutante.

### 5.3.2. Viabilidad frente a etanol

Con objeto de saber si las mutaciones obtenidas afectan

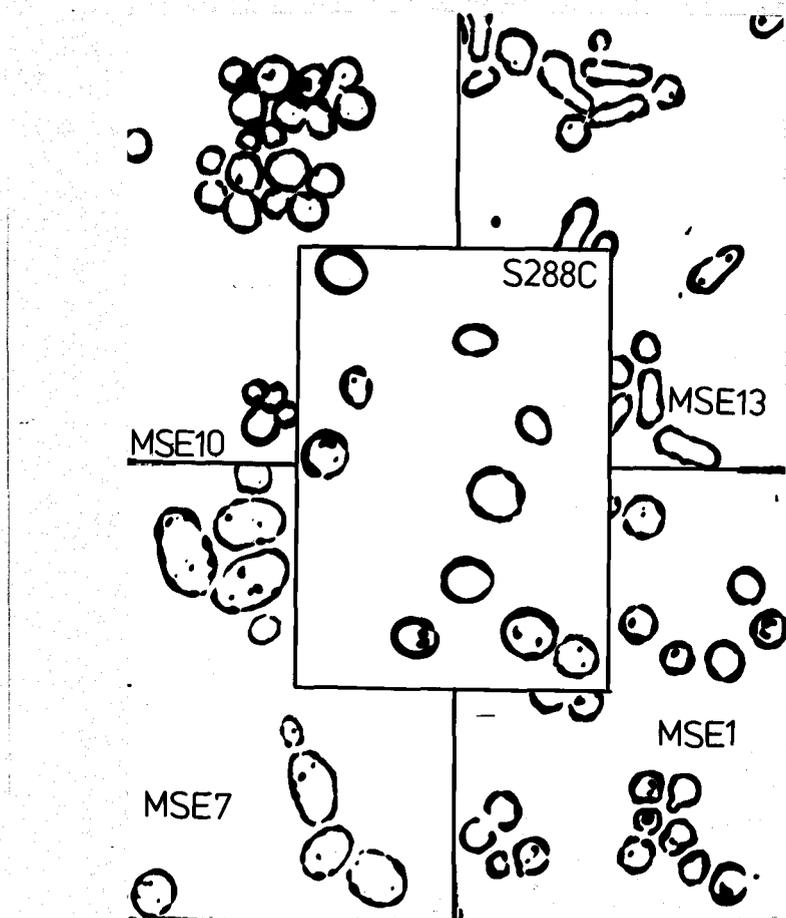


FIGURA 23. Morfología que presentan algunos de los mutantes sensibles a etanol (400x).

TABLA XIII. Valores de algunos parámetros fisiológicos de 21 mutantes monogénicos sensibles a etanol y de la estirpe silvestre S288C.  $\mu$  (YEPD): tasa de crecimiento en medio YEPD a 30°C;  $K_i$  (M): constante de inhibición del etanol (en concentración molar) para la tasa de crecimiento;  $M$  (2,5 M): mortalidad respecto del tipo silvestre (considerado su valor, 50%, como la unidad) en tampón  $PO_4H_2K$  67 mM pH 4,5 (2,5 M etanol) tras 48 h a 30°C.

$K_i$ (M)	Estirpes	$\mu$ (YEPD)	$M$ (2,5 M)
0,35	MSE1	0,248	50
	MSE2	0,182	$5 \times 10^4$
	MSE3	0,375	1
	MSE4	0,405	$5 \times 10^5$
	MSE5	0,375	2
	MSE7	0,345	$5 \times 10^5$
	0,45	MSE6	0,231
MSE9		0,385	100
0,50	PSA1	0,385	1
	MSE8	0,204	$< 5 \times 10^5$
	MSE14	0,405	20
	MSE16	0,405	1
0,70	MSE10	0,365	100
	MSE11	0,365	100
	MSE12	0,347	10
	MSE13	0,405	20
	MSE15	0,385	100
	MSE17	0,365	1
	MSE18	0,405	10
	0,80	MSE19	0,405
MSE20		0,405	5
1,05	S288C	0,390	1

específicamente al crecimiento en YEPDE o afectan también a otras funciones celulares, se ha determinado la viabilidad de los mutantes monogénicos en tampón  $PO_4H_2K$  67 mM a pH 4,5 suplementado con 2,5 M de etanol a las 48 h de incubación a 30°C (Tabla XIII). Los mutantes obtenidos cuya osmolabilidad (medida como viabilidad en  $H_2O$  tras 24 h a 30°C) era similar a la del tipo silvestre (entre 80 y 100%) presentan una gran diversidad de respuestas respecto de su viabilidad en tampón 2,5 M de etanol: mientras algunos muestran niveles de viabilidad similares a los del tipo silvestre, otros poseen una acusada mortalidad ( $5 \times 10^5$  veces superior). No existe ningún tipo de correlación entre la inhibición por etanol de la tasa

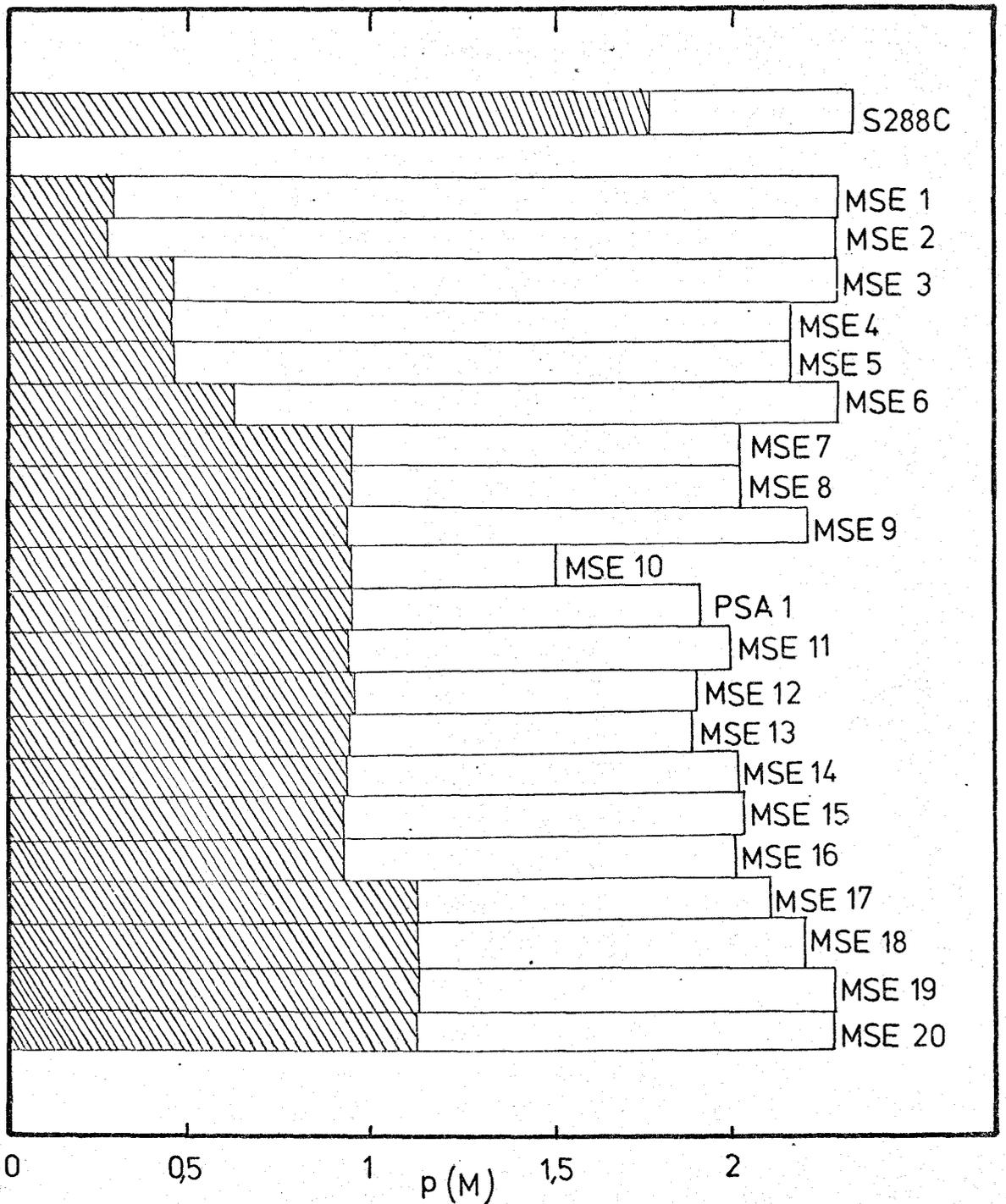


FIGURA 24. Concentración máxima de etanol,  $p$ , a la que es posible el crecimiento en medio YEPDE (▨) y que es capaz de producir a partir de 27% p/v glucosa en medio YEPD (□), cada mutante monogénico y la estirpe S288C cultivados a 30°C.

de crecimiento y la mortalidad. Así, mientras que en el mutante MSE3 la tasa de crecimiento es fuertemente inhibida por etanol ( $K_i = 0,35$  M) y los niveles de viabilidad no son afectados (valores similares a los de la estirpe silvestre), el mutante MSE19, cuya tasa de crecimiento es menos inhibida por etanol ( $K_i = 0,8$  M), posee una alta mortalidad en tampón con 2,5 M de etanol (100 veces superior).

### 5.3.3 Producción de etanol

Se ha estudiado la capacidad fermentativa de los mutantes monogénicos en YEPD con 20 y 27% p/v de glucosa, a 30°C. Según se observa en la Fig. 24, existe una enorme diferencia entre la máxima concentración de etanol a la que puede crecer cada mutante y el etanol que puede producir. Así mientras los mutantes MSE1, MSE2, MSE3, MSE4 y MSE5 no son capaces de crecer en 0,5 M etanol, si son capaces de producir por encima de 2,2 M, es decir, una cantidad de etanol similar a la que produce la estirpe silvestre en las mismas condiciones. A excepción del mutante MSE10 que sólo produce 1,5 M de etanol, todos los demás producen al menos 2,0 M. Estos resultados indican una falta de absoluta correlación entre el máximo de etanol al que puede crecer una estirpe y el máximo que es capaz de producir. El etanol es producido a velocidades similares en los cultivos de todos los mutantes, incluido el MSE10, y de la estirpe silvestre (Fig. 25).

Estos mutantes, a excepción del MSE10, no parecen estar afectados, pues, en genes directamente relacionados con la ruta glicolítica de S. cerevisiae.

### 5.3.4. Análisis de lípidos

Dada la importancia de los lípidos en la diferente tolerancia a etanol en diversos organismos (Ingram, 1976), en este apartado se han analizado los ácidos grasos y esteroides de los mutantes monogénicos, a fin de valorar la función que los genes implicados

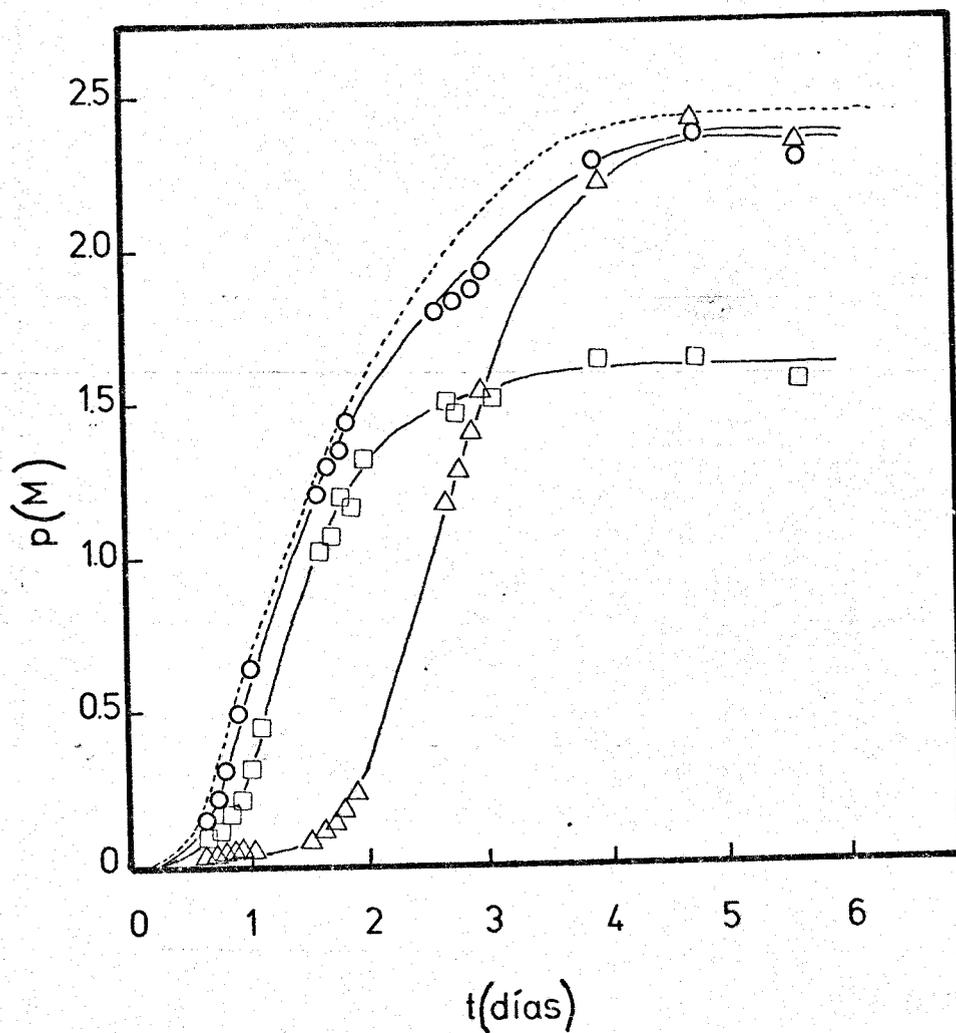


FIGURA 25. Concentración molar de etanol  $p$  producida en función del tiempo en los mutantes monogénicos MSE2 ( $\Delta$ ), MSE5 ( $\circ$ ) y MSE10 ( $\square$ ) y en la estirpe silvestre S288C (----), en medio YEPD (27% p/v glucosa) a 30°C.

en su biosíntesis pudieran tener en la sensibilidad a etanol en S. cerevisiae. Tanto los ácidos grasos como los esteroides fueron determinados a partir de cultivos en fase estacionaria de los mutantes en medios YEPD y YEPDE con una concentración de etanol igual al valor de la  $K_i$  de cada uno de ellos, a 30°C. Esta última determinación se hizo con objeto de detectar algún posible mutante con una enzima etanol-sensible de las rutas lipídicas, de forma que sólo se manifestaría el fenotipo mutante en presencia de etanol.

- Ácidos grasos. Cuando las células se cultivaron en YEPD (Tabla XV) en ninguno de los mutantes analizados se encontraron diferencias significativas con respecto a la estirpe silvestre, ni en los distintos tipos de ácidos grasos ni en la concentración total de estos. En cultivos en YEPDE (Tabla XVI) tampoco se observaron diferencias que puedan explicar la acusada sensibilidad al etanol de los mutantes (las ligeras diferencias observadas en algunos de ellos pueden ser explicadas por simples errores de determinación o bien por la diferente concentración de etanol del medio donde se cultivó cada mutante).

- Esteroides. Se extrajeron los esteroides totales de cada mutante y se analizó su espectro de absorción. En todos los mutantes tanto en medio YEPD como YEPDE todos los esteroides poseían el espectro de absorción típico del ergosterol, por lo que éste es su componente esteróidico principal al igual que en la estirpe silvestre S288C. La concentración de ergosterol de cada mutante es similar a la de la estirpe silvestre tanto en medio YEPD (Tabla XIV) como YEPDE (Tabla XV). Estos resultados se ven apoyados por la falta de resistencia a nistatina (Woods, 1971) de todos los mutantes (determinada estudiando la capacidad de crecimiento a 30°C en medio SD suplementado con concentraciones de nistatina desde 0,5 a 20 µg/ml).

Los resultados indican que la composición de ácidos grasos y esteroides no está afectada en estos mutantes o al menos que

TABLA XIV. Composición lipídica de los 23 mutantes monogénicos sensibles a etanol cultivados hasta fase estacionaria en medio YEPD a 30°C. <: porcentaje de ácidos grasos con menos de 16 átomos de carbono; 16:0: palmítico; 16:1: palmitoleico; 18:0: esteárico; 18:1: oleico; AG/B:  $\mu\text{g}$  ácidos grasos/mg peso seco de levadura; E: concentración relativa de ergosterol respecto de la de la estirpe silvestre S288C, cuyo valor se toma como la unidad.

Mutantes	Acidos grasos (%)					AG/B	E
	<	16:0	16:1	18:0	18:1		
PSA1	1,4	12,5	50,3	4,4	31,4	1,5	0,7
MSE1	4,6	14,8	46,3	4,6	29,6	-	0,8
MSE2	1,4	12,6	49,1	4,7	32,2	-	1,1
MSE3	2,1	15,4	56,0	2,1	24,5	1,5	0,9
MSE4	1,8	12,0	47,4	3,9	34,8	2,2	-
MSE5	2,0	14,4	51,5	3,7	28,4	1,9	1,2
MSE6	1,6	15,6	54,0	4,0	24,8	1,9	1,0
MSE7	1,4	10,1	53,6	3,9	31,1	2,0	0,8
MSE8	4,2	18,8	51,0	4,2	21,9	1,9	0,7
MSE9	2,1	11,7	52,2	3,2	30,8	1,6	-
MSE10	1,1	11,1	48,3	4,6	34,9	1,8	-
MSE11	1,4	14,9	51,0	3,5	29,2	1,8	1,0
MSE12	2,0	13,7	45,5	4,2	34,7	2,2	0,7
MSE13	1,1	14,9	48,9	3,8	31,3	1,7	0,8
MSE14	1,5	15,7	49,0	3,6	30,2	1,1	0,6
MSE15	1,6	11,4	47,9	4,4	34,6	1,7	0,8
MSE16	0,9	12,3	47,6	4,1	35,1	1,8	0,8
MSE17	1,9	14,1	49,8	3,7	30,3	1,6	1,0
MSE18	1,9	14,3	50,6	3,5	29,7	1,8	0,8
MSE19	1,4	14,0	48,6	4,4	31,6	1,7	0,9
MSE20	2,1	15,6	49,7	3,8	28,8	1,9	0,9
MSE21	1,5	11,1	46,5	5,5	35,4	1,9	0,7
MSE22	1,7	18,2	46,9	4,8	28,3	1,3	1,1

las diferencias observadas no son suficientes para explicar su alta sensibilidad a etanol.

#### 5.4. Interrelación de genes y sensibilidad a etanol en dobles mutantes

En este apartado se ha estudiado el tipo de interacción existente entre dos mutaciones monogénicas cuando se encuentran presentes simultáneamente en una misma célula. Se pretendía así establecer

TABLA XV. Concentración lipídica de los 23 mutantes monogénicos sensibles a etanol cultivados hasta fase estacionaria en medio YEPDE con concentraciones molares de etanol,  $p$ , similares a la  $K_i$  de cada mutante, a 30°C. <: porcentaje de ácidos grasos con menos de 16 átomos de carbono; 16:0: palmítico; 16:1: palmitoleico; 18:0: esteárico; 18:1: oleico; AG/B:  $\mu\text{g}$  ácidos grasos/mg peso seco de levaduras; E: concentración relativa de ergosterol respecto de la estirpe silvestre S288C, cuyo valor se toma como la unidad.

Mutantes	p(M)	Acidos grasos (%)					AG/B	E
		<	16:0	16:1	18:0	18:1		
PSA1	0,7	1,2	11,6	37,8	7,1	42,4	1,2	0,6
MSE1	-	-	-	-	-	-	-	-
MSE2	0,35	2,5	22,5	43,8	4,4	26,9	1,8	0,8
MSE3	0,35	1,2	13,1	41,5	5,0	39,2	1,3	0,9
MSE4	0,35	2,2	12,1	38,8	4,9	42,0	1,6	0,7
MSE5	0,35	0,3	10,3	46,0	4,9	38,5	1,9	1,2
MSE6	0,45	4,5	22,7	36,4	6,8	29,5	1,2	0,6
MSE7	0,35	0,8	8,4	41,4	6,7	42,5	-	-
MSE8	0,50	2,4	17,5	42,2	7,3	30,6	2,1	-
MSE9	0,45	2,1	14,0	46,1	4,6	33,2	1,1	1,0
MSE10	0,70	1,2	10,7	44,0	5,0	39,0	-	1,2
MSE11	0,70	-	6,8	47,5	3,4	42,4	-	1,0
MSE12	0,70	1,0	8,1	41,7	4,8	41,7	2,5	0,6
MSE13	0,70	0,8	12,6	41,3	5,0	40,3	1,6	1,3
MSE14	0,50	1,4	12,2	44,2	6,1	36,1	1,5	1,0
MSE15	0,70	0,7	8,2	40,5	4,8	45,7	1,6	-
MSE16	0,70	1,9	18,5	33,3	9,3	37,0	-	-
MSE17	0,70	2,0	12,2	43,4	5,3	37,1	1,9	-
MSE18	0,70	0,6	11,0	45,0	4,5	38,9	2,5	-
MSE19	0,70	1,0	10,8	39,0	5,8	43,3	2,4	-
MSE20	0,70	1,0	9,1	43,9	5,6	40,4	-	1,2
MSE21	0,70	1,6	10,0	33,4	8,3	46,7	1,1	0,9
MSE22	-	-	-	-	-	-	-	-

si existe algún efecto cooperativo (aditivo o multiplicativo) de dos mutaciones, o sí simplemente existen efectos epistáticos (o sea que el doble mutante posea el nivel de sensibilidad a etanol que le confiere la mutación de mayor sensibilidad). Para ello, se eligieron los once mutantes más sensibles a etanol, que eran de sexo  $\alpha$ , y se cruzaron por las esporas de sexo  $a$  (apartado 5.2.3.) que contenían cada una de las once mutaciones en estudio. Los

TABLA XVI. Segregación del crecimiento en medio YEPDE (1,2 M etanol) a 30°C, de las tétradas de los diploides obtenidos de cruzamientos entre cada par de mutantes sensibles a etanol. G: germinación; DP: ditipo parental (0+:4-); DR: ditipo recombinante (2+:2-); T: tetratipo (1+:3-).

Diploides		G%	YEPDE		
$\alpha$	a		DP	DR	T
PSA1xMSE7		87,5	3	2	8
PSA1xMSE9		43,8	1	1	6
MSE1xPSA1		87,5	0	3	7
MSE1xMSE3		84,4	2	2	4
MSE1xMSE4		76,7	3	0	4
MSE1xMSE5		82,4	4	1	9
MSE1xMSE9		76,7	2	0	4
MSE2xPSA1		92,2	0	3	10
MSE2xMSE5		86,7	0	1	7
MSE2xMSE7		71,7	1	0	1
MSE3xPSA1		87,5	3	12	1
MSE3xMSE4		41,1	3	3	2
MSE3xMSE6		75,0	0	0	1
MSE3xMSE7		70,0	1	9	2
MSE3xMSE9		32,1	0	1	1
MSE4xPSA1		93,3	7	5	1
MSE4xMSE6		72,9	0	0	1
MSE4xMSE7		96,9	4	3	5
MSE4xMSE9		95,3	7	2	4
MSE5xPSA1		63,4	0	2	1
MSE5xMSE3		83,3	5	7	0
MSE5xMSE4		96,2	4	8	0
MSE5xMSE7		93,8	3	3	6
MSE5xMSE9		90,6	4	9	1
MSE7xMSE9		27,3	1	0	0
MSE8xPSA1		89,3	4	1	5
MSE8xMSE2		85,7	1	5	10
MSE8xMSE4		97,1	1	3	11
MSE9xMSE6		62,5	2	0	0
MSE10xPSA1		61,1	2	0	1
MSE10xMSE3		81,3	8	1	5
MSE10xMSE5		81,3	4	0	4
MSE10xMSE9		59,4	1	1	1

diploides se seleccionaron por su crecimiento en medio líquido YEPDE (1,2 M etanol) tras 24 h de incubación a 30°C. A continuación se seleccionaron en cajas con medio YEPD una colonia de cada diploide, a los que se indujo a esporular. Se micromanipularon y analizaron entre 17 y 20 tétradas procedentes de cada diploide y se estudió la segregación de las mutaciones de sensibilidad a etanol sembrando las esporas en cajas de medio YEPDE (1 M etanol) e incubándolas a 30°C durante 48 h. En algunos casos la viabilidad de las esporas en medio YEPD era tan baja (menos del 50%) que no se pudo obtener ninguna tétrada completa. La Tabla XVI muestra los resultados obtenidos para aquellos diploides de los que se pudo obtener al menos una tétrada con las 4 esporas viables. En la mayoría de ellas, la viabilidad fue superior al 80% y los resultados son compatibles con la existencia de dos genes mutados en los diploides obtenidos. Se observan casos claros de ligamiento entre genes, como los existentes entre *ETA4* (gen mutado del mutante MSE3, ver Tabla I) y *ETA11* (MSE10) o *ETA5* (MSE4) y *ETA10* (MSE9); casos en que los genes están ligados a centrómeros como los *ETA1* (PSA1) o *ETA6* (MSE5), y casos de genes no ligados a centrómeros, como los *ETA9* (MSE8) o *ETA10* (MSE9), o no ligados entre sí, como *ETA1*(PSA1) y *ETA8* (MSE7), o *ETA1*(PSA1) y *ETA10* (MSE9). No obstante, hay situaciones en las que las segregaciones son difíciles de explicar como es el caso de la alta frecuencia de tétradas "ditipo recombinante" que aparecen en los cruces PSA1 x MSE3 ó MSE3 x MSE7, y que merecerían un estudio más completo.

De tétradas "ditipo recombinante" se seleccionaron las dos esporas sensibles a etanol por ser presumiblemente las portadoras de dos mutaciones. En la Tabla I están descritos todos los dobles mutantes a los que se determinó la sensibilidad del crecimiento a etanol. Por las mutaciones que llevan se sabe de qué cruce parental proviene cada uno de ellos. La sensibilidad fue determinada cultivando estas esporas en cajas de medio YEPDE con 0,35, 0,5, 0,7, 0,85 y 1 M de etanol a 30°C. En todos los casos se observó que los dobles mutantes poseían una sensibilidad a etanol similar a la de la estirpe parental más sensible, indicando relaciones de tipo epistático entre cada par de mutaciones.

#### IV. DISCUSIÓN

## 1. RELACION ENTRE CRECIMIENTO, FERMENTACION Y RESPIRACION. EFECTO DE LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO.

El objeto de esta Tesis ha sido estudiar la Genética de la Tolerancia al etanol en S. cerevisiae. El etanol es producto principal de la fermentación e inhibidor de los procesos metabólicos celulares (Aiba et al., 1968; Nagodawithana y Steinkraus, 1976). Los procesos aquí estudiados han sido básicamente crecimiento, fermentación y respiración, por lo que se ha determinado en primer lugar, la relación existente entre estos parámetros. Ya que también ha sido necesario determinar la concentración máxima de etanol que cada estirpe es capaz de producir a partir de altas concentraciones de azúcar iniciales, también se ha estudiado el efecto de estas altas concentraciones de azúcar sobre los citados procesos.

El crecimiento celular depende directamente del metabolismo energético de los organismos, concretamente en levaduras, de la fermentación y respiración (Sols et al., 1971). En esta Tesis se ha comprobado de hecho, que la tasa de fermentación está directamente relacionada con la tasa de crecimiento en S. cerevisiae (Resultados, apartado 1.2). No obstante, el ligamiento entre estos dos procesos no es total. Cuando las células de S. cerevisiae dejan de crecer al agotarse el sustrato limitante (sulfato amónico), manifiestan aún una tasa de fermentación residual que en la estirpe "petite" posee un valor de alrededor de 0,006 mg de glucosa/10<sup>6</sup> células x h. Este valor es muy pequeño (20 veces inferior al que las células poseen cuando  $\mu = 0,1$ , por ejemplo), pero suficiente para que S. cerevisiae consuma toda la glucosa del medio. Esta fermentación sin crecimiento se traduce en un aumento del rendimiento  $Y_{SX}$ , cuando las células entran en fase estacionaria en cultivo discontinuo, o alcanzan valores de  $\mu$  próximos a 0.

Se han encontrado resultados similares estudiando la relación de la tasa de respiración con la de crecimiento (Tabla IV). Cuando esta última se extrapola a 0, se detecta una actividad respiratoria

residual, responsable de que el cociente  $Y_{OX}$  aumente al disminuir  $\mu$ .

Los valores de  $\mu$  y  $v$  residuales no se mantienen indefinidamente, sino que decaen con el tiempo, posiblemente debido a la desaparición de sustrato del medio (concentraciones muy bajas de sustrato influyen sobre la tasa de fermentación, según la expresión (22) de Monod), o a una disminución de la propia actividad enzimática, como ocurre con la producción de penicilina en Penicillium (Pirt, 1975).

Tanto la fermentación como la respiración poseen pues una fase ligada al crecimiento y otra independiente de él. De la expresión (18) utilizada normalmente en la literatura (Hitchener et al., 1979; Tsuchiya y Kimura, 1982), se deduce que el valor residual de la fermentación corresponde al coeficiente de mantenimiento,  $m$ , o "coeficiente de consumo de sustrato aparentemente no finalizado" (Goma et al., 1979). En las expresiones descritas en esta Tesis para procesos parcialmente ligados (Resultados, apartado 1.1) este valor corresponde a la constante  $K$ , cumpliéndose las predicciones de Stouthamer y Bettenhausen (1973), según las cuales el corte de la recta que representa la tasa de un proceso metabólico con el eje de abscisas ( $\mu$ ), equivale al coeficiente de mantenimiento,  $m$  (Fig. 5). Por otra parte, el rendimiento  $Y_{XS}$  "verdadero",  $Y_{EG}$  de Pirt (1975), equivale al valor  $1/Y_{SX}$  cuando  $\mu = 0,1$ , según la expresión (19), y por tanto a la constante  $K'$  de la expresión (36).

A la tasa de fermentación no ligada al crecimiento se debe el que la concentración de etanol a la que dejan de fermentar las células sea sensiblemente superior a la concentración a la que ya no es posible el crecimiento (Resultados, apartado 4.1). Resultados similares han sido encontrados en estirpes naturales de Saccharomyces (Day et al., 1975; Benítez et al., 1983). Este intervalo de concentración de etanol dependerá del valor  $m$  de cada estirpe, que a su vez depende de las condiciones de cultivo (Van Uden y Madeira López, 1976). Además, permite que se puedan

obtener mutantes de crecimiento sensible a etanol que son capaces de producir concentraciones muy superiores a la máxima concentración de etanol a la que son capaces de crecer. La inhibición por etanol del crecimiento puede ser, pues, diferente a la de otros parámetros (entre ellos, fermentación) debido a la fase de éstos no ligada a  $\mu$ . Por lo tanto, aunque a altas tasas de crecimiento, y como consecuencia del bajo valor de  $m$ , en S. cerevisiae, el ligamiento entre  $\mu$  y  $v$  sea prácticamente total, es necesario estudiar cada proceso independientemente.

Por otro lado, se ha observado una curva de inhibición de forma sigmoidal de la tasa de crecimiento con concentraciones crecientes de azúcar, según una expresión que recuerda la de las inhibiciones de tipo alostérico. Este efecto puede ser debido a la inhibición alostérica de alguna enzima clave del metabolismo de los hidratos de carbono por altas concentraciones de algún metabolito intermediario (Taketa y Pogell, 1965; Wurster y Hess, 1976) o bien a la alta presión osmótica causada por concentraciones elevadas de azúcar (Panchal y Stewart, 1980). Al menos ésta debe ser la explicación de los efectos letales causados por concentraciones superiores al 40% p/v de sacarosa. Aunque el tipo de inhibición de  $\mu$  por altas concentraciones de azúcar es el mismo a cualquier temperatura (Fig. 7B), el grado de inhibición aumenta con la temperatura, como consecuencia de una disminución de la temperatura máxima de crecimiento,  $T_{max}$ , a altas concentraciones de azúcar. Esto podría ser debido, como se deduce de la relación existente entre la tasa de muerte celular y la tasa de crecimiento a temperaturas supraóptimas de crecimiento (van Uden y Madeira-Lopes, 1975), a una activación de la muerte térmica por altas concentraciones de azúcar, análogamente a lo que ocurre con las altas concentraciones de etanol (Leao y van Uden, 1982a).

S. cerevisiae cultivado en medio YEPS (20% p/v sacarosa) consume todo el azúcar a temperaturas iguales o inferiores a la óptima de crecimiento (30°C), siendo  $\mu$  prácticamente similar a la de las células en medio YEPD. Resultados similares se han obteni-

do en Zymomonas anaerobia (Kosarick et al., 1982). La concentración de sacarosa inicial, de entre las estudiadas, a la que el consumo resulta ser máximo es 30% p/v. Esto equivale a una producción de etanol similar a la concentración máxima de etanol a la que S. cerevisiae es capaz de fermentar (Fig. 19). A 40% p/v de sacarosa la mitad del azúcar queda sin consumir, concentración que aumenta con el porcentaje de azúcar inicial. Esto implica que hasta concentraciones iniciales de sacarosa de alrededor del 30% p/v, la fermentación se detiene como consecuencia de la inhibición por la concentración de etanol alcanzada en el medio. Por encima de esta concentración de azúcar, la fermentación es nula porque las altas concentraciones de sacarosa no consumida en el medio actúan sinérgicamente con las altas concentraciones de etanol producidas, de un modo similar a lo que ocurre en Candida pseudotropicalis cuando se cultiva en altas concentraciones de lactosa o glucosa (Moulin et al., 1980). En estos casos la concentración de etanol alcanzada es inferior a la máxima que tolera la fermentación.

Por lo tanto, para determinar la máxima concentración de etanol que una estirpe de S. cerevisiae es capaz de producir, las células han de cultivarse en medio con una concentración de azúcar no superior a 30% p/v y a la temperatura de 30°C, condiciones en las que las tasas metabólicas apenas están inhibidas por altas concentraciones de sustrato.

## 2. PAPEL DE LA HERENCIA EXTRACROMOSOMICA EN LA TOLERANCIA A ETANOL.

### 2.1 Importancia del metabolismo oxidativo mitocondrial en la inhibición por etanol de S. cerevisiae.

En esta Tesis se ha estudiado la importancia de las funciones respiratorias y mitocondriales en la tolerancia al etanol de S. cerevisiae, inicialmente mediante el estudio de la inhibición por etanol de las tasas de crecimiento y fermentación en las estirpes "grande" S288C y "petite" BE288-1, en distintas condiciones

de aireación. Cuando la estirpe S288C se cultiva en aerobiosis, su tasa de crecimiento es inhibida linealmente por concentraciones crecientes de etanol (Fig. 11). Este resultado es análogo a los obtenidos en Bacterium lactis aerogenes (Hinshelwood, 1946) o los más recientes de Kluyveromyces marxianus (Bajpai y Margaritis, 1982) o S. cerevisiae (Wasungu y Simard, 1982). La inhibición es también lineal para la fermentación (Fig. 12). Resultados similares fueron encontrados en Saccharomyces fermentando zumo de uvas en fase estacionaria (Holzberg et al., 1967). Todos estos trabajos tienen en común el haber sido realizados con estirpes "grande" en condiciones en que es posible la respiración. Sin embargo, en la estirpe "grande" S288C cultivada en anaerobiosis permanente y en la "petite" BE288-1 de S. cerevisiae, la inhibición de las tasas de crecimiento y fermentación por etanol es de tipo exponencial (Figs. 11, 12 y 14). Resultados similares fueron encontrados por Aiba et al. (1968) en un mutante "petite" de S. sake, y más recientemente por Moulin et al. (1980) en Candida pseudotropicalis cultivada en anaerobiosis. Todos estos experimentos están realizados en condiciones en que no es posible la respiración. De los resultados de este trabajo puede concluirse que en S. cerevisiae la existencia o no de respiración o de mitocondrias funcionales se traduce en una forma diferente de inhibición por etanol de su actividad celular, conclusión que cuando se consideran los casos descritos en la bibliografía, puede hacerse general. Cuando se dan procesos respiratorios, las tasas de crecimiento y fermentación en función de la concentración de etanol, se rigen por la expresión lineal  $v_o = v (1 - p/K_i)$ , mientras que cuando no tienen lugar estos procesos, o las mitocondrias no funcionan plenamente, esta relación pasa a tomar la forma exponencial  $v = v_o e^{-p \ln 2 / K_i}$ . Estas diferencias son consecuencia de una inhibición más drástica del crecimiento y la fermentación en condiciones en que la respiración no es posible lo que se traduce en una menor  $K_i$  del etanol (0,7 M sin respiración frente a 1,05 M con respiración). Además no son diferencias inducidas específicamente en el crecimiento, sino que son probablemente

un reflejo de lo que ocurre con la fermentación. No obstante, aunque los parámetros metabólicos de la estirpe "grande" cultivada en anaerobiosis y la "petite" sean inhibidos por etanol de un modo parecido, y en ambos casos las  $K_i$  de  $\mu$  y  $v$  sean similares, los resultados no son idénticos, indicando que el estado fisiológico de las células en ambas situaciones puede ser diferente (Lagunas, 1981).

Se ha comprobado que el metabolismo respiratorio no afecta directamente al crecimiento y la fermentación (Fig. 13) ya que éstos son inhibidos por etanol de forma similar ( $K_i = 1,2$  M etanol). Las diferencias obtenidas deben ser consecuencia del diferente estado fisiológico en que se encuentran las células "petite" o "grande" en anaerobiosis por una parte y la estirpe "grande" en aerobiosis por otra. De hecho, cuando la estirpe "grande" cultivada en aerobiosis se transfiere a condiciones de anaerobiosis, se observa que las células manifiestan un tipo de inhibición y unos valores de  $K_i$  del etanol similares a los que poseen en aerobiosis. Sin embargo, cuando han sido cultivadas permanentemente en anaerobiosis poseen diferente inhibición de la tasa de fermentación y valores más bajos de  $K_i$ . Esto es consecuente con la idea de que las células "grande" de *S. cerevisiae* son diferentes cuando se cultivan en aerobiosis que cuando crecen en anaerobiosis (Hunter y Rose, 1971).

Se podría pensar que la respiración, y en general, las funciones mitocondriales, serían capaces de proporcionar los elementos necesarios para que las células pudieran "responder" al etanol en el medio, adaptando su fisiología a las nuevas condiciones. Se observa que cuando la estirpe "grande" es transferida desde medio sin etanol a medio con 1 M etanol,  $\mu$  y  $v$  se inhiben de un modo similar a como lo hacen cuando la transferencia tiene lugar desde medio con 1 M etanol (50% inhibición). Por tanto, no se puede decir que exista adaptación (mejora del crecimiento y la fermentación) de la estirpe "grande" a la presencia de etanol en el medio. En la estirpe "petite" se observa un fenómeno distinto. Cuando las células son transferidas desde medio sin etanol a medio con 1 M etanol, la inhibición es similar a la que ocurre en la

estirpe "grande" (  $\sim 50\%$ ), y aumenta (hasta el 65%) cuando las células crecen durante varias generaciones en medio con etanol. Aparentemente, ambos tipos celulares cuando crecen en medio sin etanol presentan un estado fisiológico similar con respecto a su capacidad de respuesta al etanol en el medio. Sin embargo, cuando las células crecen en presencia de etanol, la estirpe "petite" sufre modificaciones que la hacen más sensible a la inhibición por etanol que la estirpe "grande", es decir, hay una incapacidad de las células "petite" de responder al etanol como lo hace la estirpe "grande". Estos procesos son reversibles y originados por la ausencia de mitocondrias funcionales, puesto que cuando éstas se transfieren de nuevo a la estirpe "petite", las células recuperan todas las características de la "grande", incluida una  $K_i$  del etanol de 1,05 M (Tabla VIII).

Concentraciones crecientes de etanol hacen disminuir la  $T_{max}$  de crecimiento, fenómeno ya observado por van Uden y da Cruz Duarte (1981). Esto se debe a una activación de la muerte térmica por etanol (Leao y van Uden, 1975), como se deduce de la relación existente entre tasa de crecimiento y tasa de muerte celular a temperaturas supraóptimas (van Uden y Madeira-Lopes, 1975). El tipo de inhibición por etanol de  $\mu$  y  $v$  en las estirpes "grande" y "petite" es independiente de la temperatura. Sin embargo, en la estirpe "petite" la  $K_i$  del etanol para  $\mu$  y  $v$  posee un valor de 0,7 M a cualquier temperatura, mientras en la "grande" este valor es de 1,05 M a temperaturas iguales o inferiores a la óptima, 30°C, y disminuye hasta valores similares a los de la  $K_i$  de la estirpe "petite" a temperaturas superiores. Las posibilidades de una mejor respuesta al etanol que proporciona el metabolismo mitocondrial, desaparece, pues, a temperaturas superiores a la óptima. Las concentraciones máximas de etanol que las estirpes "grande" y "petite" son capaces de producir (Fig. 8) y a las que son capaces de crecer y fermentar, coinciden en ambas estirpes a cualquier temperatura, y son menores a 37°C (Figs. 18 y 19). Aunque se han descrito diversos efectos de la temperatura sobre la fermentación, (Kosarick et al., 1982; Brown y Oliver, 1982), de los resultados obtenidos en esta Tesis se deduce que la producción de etanol y la

mayor concentración de etanol que tolera la fermentación son máximas a temperaturas no superiores a la óptima de crecimiento. Conocido el efecto del etanol y la temperatura sobre los lípidos de membrana (Ingram, 1982) y que su acción activadora de la muerte celular posiblemente reside en los lípidos de membrana (Cabeça-Silva, 1982; Leao y van Uden, 1982a), la inhibición aquí encontrada puede estar relacionada con esta acción. Por otro lado, el que a altas concentraciones de etanol o a temperaturas supraóptimas, la estirpe "grande" pierda la capacidad de tolerar etanol que le confieren las mitocondrias, adquiriendo un grado de inhibición de sus tasas metabólicas idéntico al de la estirpe "petite", puede ser debido a que en esas condiciones, ambas estirpes son fisiológicamente similares, como consecuencia de la pérdida de la actividad mitocondrial. De hecho, esta actividad (medida como respiración) está bastante inhibida por altas concentraciones de etanol (Fig. 13) y como sugieren Cabeça-Silva et al. (1982) la inactivación celular por etanol y altas temperaturas puede estar relacionada con la inactivación mitocondrial. También es conocida la inducción de mutantes "petite" por altas concentraciones fisiológicas de etanol (Juan Jiménez, comunicación personal) que varía en función de la temperatura (Cabeça-Silva et al., 1982). Según esto, sería interesante ver si es posible mejorar la tolerancia a etanol de Saccharomyces mejorando la tolerancia a etanol de sus mitocondrias.

El rendimiento  $Y_{XS}$  no es afectado por la presencia de etanol, coincidiendo con los resultados de Aiba et al. (1982). El mantenimiento de las células en etanol no supone, pues, un mayor gasto energético que repercuta en el valor del rendimiento  $Y_{XS}$ . Este rendimiento es siempre menor en la estirpe "petite" frente a la "grande" (Resultados, apartados 1.2. y 4.1.4.). Esto concuerda con los resultados de Bacila y Horii (1978) obtenidos en mutantes "petite" de S. uvarum. Ellos observaron que estos mutantes a pH

3,0 producen en 24 h algo menos de la mitad de biomasa que su parental "grande", convirtiendo el 80% de la glucosa consumida en etanol, mientras su parental sólo convierte el 40% (a pH 6,0 no se dan estas diferencias). Es decir, para producir la misma cantidad de biomasa, la estirpe "petite" necesita consumir más glucosa, lo que implica una mayor eficiencia en la producción de etanol (Bacila y Horii, 1979). Además ellos observaron, al igual que Moulin et al. (1982) en un mutante "petite" de Candida pseudotropicalis, que el rendimiento  $Y_{ps}$  (etanol producido/glucosa consumida) es mayor que el de la estirpe "grande". En esta Tesis, se observa que parte de la glucosa se metaboliza en la estirpe "grande" a través de la ruta oxidativa, aunque esta proporción es sólo del 1,7% de la glucosa total consumida (Resultados, apartado 4.1). Por lo tanto, aunque el fenotipo "petite" confiera a las células una mayor eficiencia en la producción de etanol a partir de concentraciones bajas de sustrato (Bacila y Horii, 1979), las células "petite" son más fuertemente inhibidas por etanol que las que poseen mitocondrias funcionales.

La estirpe "petite", al igual que la "grande" en anaerobiosis posee un tipo de inhibición por etanol distinto al de la estirpe "grande" en aerobiosis, y un grado de inhibición mayor. Esto es consecuencia de un diferente estado fisiológico de las células, debido a la presencia o no de metabolismo oxidativo o mitocondrial y que se manifiesta expresamente cuando éstas se cultivan en presencia de etanol. Por lo tanto, la herencia extracromosómica, concretamente, las mitocondrias, juegan en S. cerevisiae el importante papel de conferir a las células una capacidad de respuesta al etanol que no tendrían sin mitocondrias funcionales.

## 2.2 Importancia de la composición lipídica en la inhibición por etanol de S. cerevisiae.

Puesto que la producción de etanol depende de la composición lipídica de los organismos (Hayashida y Ohta, 1981), se han analizado los lípidos de S. cerevisiae a fin de detectar posibles variaciones responsables de la diferente inhibición de  $\mu$  y  $v$  en las estirpes

"grande" y "petite". Ya que la composición lipídica en levaduras se modifica a lo largo de la curva de crecimiento (Hunter y Rose, 1971), se ha estudiado previamente este efecto en S. cerevisiae S288C con objeto de estandarizar la fase de cultivo en la que es conveniente recoger las células para analizar sus lípidos.

En S. cerevisiae, el grado de saturación de los ácidos grasos disminuye con la edad del cultivo, debido a un aumento de la proporción de ácido palmitoléico (16:1) y una disminución del palmítico (16:0). En otros organismos se han encontrado diversas modificaciones en la composición lipídica. Así, en Candida utilis (Dawson y Craig, 1966), se han encontrado también una disminución del grado de saturación como consecuencia de un aumento de las proporciones de linoleico (18:2) y linolénico (18:3). En S. cerevisiae, se ha detectado en diferentes estirpes tanto disminución (Hunter y Rose, 1972) como aumento de este parámetro (Beaven et al., 1982). También en Megasphaera elsdenii (Johnston y Goldfine, 1982), se ha detectado aumento del grado de saturación con la edad del cultivo. En general, parece que la modificación de la composición lipídica depende de cada estirpe y de las condiciones de cultivo. En el caso de S. cerevisiae S288C, es fácil suponer que, cuando el cultivo envejece, el sistema Desaturasa I (Introducción, apartado 5.1), sigue actuando sobre los ácidos palmítico o esteárico, produciendo más palmitoléico u oléico, disminuyendo con ello el grado de saturación de los ácidos grasos.

Cuando las estirpes "grande" S288C y "petite" BE288-1 de S. cerevisiae, se cultivan en presencia de concentraciones crecientes de etanol, el grado de saturación de los ácidos grasos se mantiene constante, mientras que la longitud de sus cadenas aumenta, debido a un incremento de las proporciones de los ácidos esteárico y oléico y a una disminución de las de palmítico y palmitoléico (Tabla X ). Estos resultados contrastan con los obtenidos en E. coli (Ingram, 1976; Buttke e Ingram, 1978) o en S. cerevisiae NCYC 366 (Beaven et al., 1982) donde el grado de insaturación

aumenta en presencia de etanol y de alcoholes de menos de 4 carbonos, y con los obtenidos en E. coli (Butkke e Ingram, 1980), donde la longitud de las cadenas disminuye con la concentración de etanol.

Los organismos alteran la composición lipídica de sus membranas, cuando son cultivados en presencia de etanol. Esto puede ir encaminado a corregir el aumento de fluidez y la debilitación de los enlaces hidrofóbicos que proporciona el etanol (Ingram, 1982). En esta Tesis se observa que la estirpe S. cerevisiae S288C contrarresta la mayor fluidez que el etanol proporciona a las membranas aumentando la proporción de ácidos grasos de cadena larga, lo que se traduce en una mayor rigidez de las membranas (Keith et al., 1973). La estirpe "petite" BE288-1 posee una composición lipídica similar a la de la "grande", incluida la composición esterólica (posee la misma concentración de ergosterol, a cada concentración de etanol estudiada). La longitud de los ácidos grasos y la relación lípidos totales/biomasa, parece ser ligeramente superior, pero poco significantes. Además el incremento del último índice puede ser consecuencia de una menor proporción de proteínas en la estirpe "petite" (Bacila y Horii, 1979).

Es difícil valorar el papel que estas posibles diferencias en la composición lipídica pudieran tener en la inhibición de  $\mu$  y  $v$  de las estirpes "grande" y "petite". Los resultados de esta Tesis, al igual que los encontrados en Zymomonas mobilis (Carey e Ingram, 1983), sugieren que en S. cerevisiae S288C el grado de insaturación en medio sin etanol es tan alto (alrededor del 70%) que una posible adaptación de las células a la presencia de etanol en el medio difícilmente se haría por aumento de este grado de insaturación de los ácidos grasos, como ocurre en la mayoría de los casos estudiados (Ingram, 1976; Beaven et al., 1982), sino por el aumento de la longitud de las cadenas, con el objeto de permitir una mejor funcionalidad de las membranas en presencia de etanol. A pesar de todo, los resultados obtenidos ponen en duda hasta qué punto en S. cerevisiae S288C y BE288-1 los cambios en su composición lipídica son un mecanismo adaptativo,

o son debidos simplemente al efecto inhibitorio del etanol sobre la síntesis de los ácidos grasos (Buttke e Ingram, 1980), produciendo tales diferencias. Así, cuando las células "grande" son transferidas de medio sin etanol a medio con 1 M etanol, poseen el mismo grado de inhibición que si hubieran sido transferidas desde este último medio. Esto implica que las alteraciones en la composición lipídica, sufridas por las células al haber sido cultivadas en presencia de etanol, no han supuesto ninguna adaptación que se expresara en un menor grado de inhibición al ser transferidas de nuevo a medio con etanol. Además, la estirpe "petite" cuando es transferida a medio con etanol desde medio sin etanol (inhibición  $\sim$  50%), posee menor grado de inhibición de  $\mu$  y  $\nu$  que cuando es transferida desde medio con etanol (inhibición  $\sim$  65%); lo que significaría que el cambio en la composición de las membranas tendría efectos negativos en las células "petite". Es más fácil pensar pues, que las alteraciones en la composición lipídica que tienen lugar en ambos tipos celulares, son consecuencia de la propia inhibición que el etanol ejerce sobre la síntesis lipídica, y que las diferencias de ambas estirpes, causantes de la distinta inhibición de  $\mu$  y  $\nu$ , no residen precisamente en dicha composición lipídica sino en otros procesos celulares. Estas conclusiones no se pueden, en principio, extrapolar a las diferencias encontradas en la estirpe "grande" en aerobiosis y anaerobiosis. Aunque en anaerobiosis la proporción de ácidos grasos insaturados y ergosterol deberían ser muy inferiores a la existente en condiciones aeróbicas (Brown y Rose, 1971), como ocurre en Kluyveromyces (Janssens et al., 1982), habría que comprobarlo experimentalmente ya que el extracto de levaduras presente en el medio puede proporcionar los elementos necesarios para que las membranas no sean excesivamente diferentes.

La ausencia de mitocondrias funcionales altera enormemente la fisiología de las células de levaduras, cambiando las propiedades de sus enzimas (Chapman y Bartley, 1965) o alterando su concentración, al igual que ocurre con algunas enzimas glicolíticas cuyas concentraciones en la célula aumentan (Bacila y Horii, 1978).

Como sugieren Leao y van Uden (1982b), el tipo de inhibición de  $\mu$  o  $v$  podría estar determinado por un paso "clave" en los procesos metabólicos, cuya cinética enzimática, y con ello su  $K_i$  del etanol, determinaría en gran medida la inhibición general de  $\mu$  o  $v$ . Este paso "clave" podría ser el propio transporte de glucosa (Leao y van Uden, 1982b) o estar más directamente relacionado con la actividad mitocondrial o alguna enzima glicolítica. No obstante no debe descartarse la posibilidad de que las diferencias encontradas entre células con capacidad respiratoria y células carentes de ella, pueda residir en varios componentes y no en uno sólo. La resultante de la cinética enzimática de todos ellos sería la responsable de los diferentes tipos de inhibición y  $K_i$  del etanol encontrados.

### 3. GENETICA DE LA SENSIBILIDAD AL ETANOL

Se ha investigado en esta Tesis cuál es la base genética que hace de Saccharomyces un organismo adaptado al etanol, capaz de fermentar y crecer en medios con concentraciones de etanol muy superiores a las que toleran las bacterias y otros organismos. Previamente se observó que el nivel de ploidía no afecta en S. cerevisiae ni al grado de inhibición por etanol de  $\mu$  ni a la tolerancia del crecimiento y la fermentación (Tabla IV).

Con el fin de establecer cuántos genes son responsables de la alta tolerancia al etanol en S. cerevisiae, se han obtenido mutantes con crecimiento más sensible al etanol que la estirpe silvestre. Cada mutante presenta una respuesta diferente respecto a la tolerancia de su crecimiento en etanol (Fig. 20). Esto podría sugerir que existen una gran cantidad de mutaciones con efectos distintos sobre la tolerancia al etanol en S. cerevisiae, es decir, que se han obtenido, o bien mutaciones de diferentes efectos sobre un mismo gen, o bien sobre genes distintos, o bien se están dando las dos situaciones. Existen, pues, mutaciones cuya importancia en la tolerancia sería pequeña y otras cuyo efecto sería mucho más considerable. Estas últimas son las que han sido estudiadas en esta Tesis. De entre los mutantes obtenidos, 23 debían su alta

sensibilidad a etanol a una mutación en un solo gen, observándose que 21 de estos mutantes definían 20 grupos de complementación distintos. Esto confirma, coincidiendo con las conclusiones de Ismail y Ali (1971), que existe un elevado número de genes cuyo funcionamiento es necesario para que S. cerevisiae posea una alta tolerancia a etanol.

Se puede calcular cual es el número más probable N, de genes distintos implicados en la tolerancia al etanol, para que haya 20 genes diferentes mutados en 21 mutantes estudiados. Si se asume que la probabilidad de mutación es la misma para cada gen, y que existe igual número de copias de cada uno de ellos en el genomio, la probabilidad de obtener este resultado es:

$$L = \frac{21!}{2} \left( \frac{1}{N} \right)^{21} \cdot \frac{N!}{20!(N-20)!} \times 20 \quad (46)$$

Igualando a cero la derivada del logaritmo de esta expresión, se obtiene el valor de N que hace máxima la "verosimilitud" del resultado (estimación por máxima verosimilitud)\*. El número más probable de genes obtenidos es 203, aunque, debido al pequeño tamaño de la muestra (21 mutantes), el intervalo de confianza al 95% es muy grande (+ 385 genes). Este valor de N, es el mínimo que puede estimarse, ya que si la probabilidad de mutación de cada gen fueradistinta y/o si no existiera igual número de copias por gen en el genomio, N sería superior.

Todas las mutaciones obtenidas son recesivas, de lo que se deduce que en los mutantes correspondientes, se ha producido probablemente pérdida total o parcial de la función de un gen. Mas de 1/3 de las mutaciones definidas proporcionan, además de incapacidad para crecer en medio con 1,2 M etanol, incapacidad de crecer a 37°C, es decir, termosensibilidad. Otros determinan además diferencias con el tipo silvestre en la viabilidad celular en tampón con etanol (Tabla XIII), morfología celular (Fig. 23), tamaño de las colonias (Fig. 22) y tasa de crecimiento en YEPD.

\* El método de "estimación por máxima verosimilitud" puede consultarse en cualquier texto de estadística, como por ejemplo: "An Introduction to Genetic Statistics" de Oscar Kempthorne, (John Wiley & Sons, eds.) Iowa, USA (1969).

Esto indica que las mutaciones de sensibilidad del crecimiento al etanol dan lugar a efectos pleiotrópicos. Por tanto, los genes relacionados con la tolerancia a etanol tienen sobre todo una función específica y esencial en el metabolismo celular. La alteración de estas funciones se refleja en el grado de tolerancia a etanol en S. cerevisiae. Estos resultados sugieren además, la existencia de dos tipos de mutaciones: unas no condicionales, que impedirían síntesis de proteínas funcionales necesarias para una buena tolerancia a etanol y que se expresarían independientemente de la presencia o ausencia de etanol (por ejemplo, mutantes cuyo fenotipo de sensibilidad a etanol cosegrega con el de tamaño de las colonias en medio YEPD) y otras condicionales, que determinarían proteínas que son funcionales sólo en ausencia de etanol, pero que se inactivarían en presencia de éste (caso de los mutantes que son además termosensibles). Trabajos ahora en curso, han permitido la obtención de mutantes condicionales que expresan su fenotipo sólo en presencia de etanol. Dos de ellos son auxótrofos, otro es incapaz de respirar glicerol (fenotipo "petite") y un cuarto mutante parece no fermentar glucosa. Aunque estos trabajos son incompletos y necesitan ser confirmados, apoyan en principio, la existencia de proteínas que por mutación en los genes que las determinan, pueden hacerse etanol-sensibles. Estas proteínas mutadas se inactivarían en presencia de etanol, de forma similar a lo que ocurre con las termosensibles a altas temperaturas.

Se ha estudiado en dobles mutantes el efecto que sobre el fenotipo produce la coexistencia de dos mutaciones, cada una de las cuales tiene efectos profundos sobre la tolerancia al etanol. En todos los casos estudiados (11 grupos de complementación), la mutación de efectos más drásticos sobre la tolerancia es epistática sobre la otra, es decir que el doble mutante es tan sensible al etanol como el mutante monogénico más sensible. Estas relaciones de epistasia podrían ser explicadas según tres hipótesis: a) que los 11 genes estudiados estén implicados en una misma ruta metabólica; esta posibilidad es bastante improbable ya que dado el elevado

número de genes implicados en la tolerancia al etanol, es muy difícil que todos ellos determinen proteínas de la misma ruta; b) que cada gen esté implicado en una ruta diferente; hipótesis también improbable, ya que es muy difícil que entre este número elevado de genes, no existan al menos dos relacionados con la misma ruta; c) que los genes estén implicados en diversas rutas metabólicas, y que pueda haber varios de ellos en una misma ruta; esta hipótesis parece la más probable, dado el elevado número de genes supuestamente implicados en la tolerancia al etanol de S. cerevisiae.

Es difícil sacar conclusiones sobre la situación relativa de cada gen en el genomio de S. cerevisiae, debido a que el número de tétradas completas obtenidas del cruce de cada par de mutantes, no ha sido suficientemente grande. No obstante, se ha observado (Tabla XVI) que existen genes ligados a centrómero (por ejemplo, *ETA1*, *ETA5*), genes ligados entre sí (por ejemplo, *ETA5*, *ETA10*) y genes que pertenecen a grupos de ligamientos distintos, y están alejados del centrómero. A pesar de que la segregación de las tétradas de los diploides confirman que cada mutante es monogénico, existen algunos casos difíciles de explicar, como la segregación de los diploides PSA1 x MSE3 o MSE3 x MSE7, donde los ditipos recombinantes aparecen con una frecuencia excesivamente alta. Esto puede ser debido al bajo número de tétradas completas obtenidas, o a que el método de análisis de los fenotipos de las esporas, no ha sido suficientemente eficaz para diferenciar cada tipo de tétrada en estos casos. Estos tipos de segregaciones merecen, pues, un estudio más detallado.

Todos los mutantes sensibles a etanol se han seleccionado por su incapacidad de crecer en medio con una concentración de etanol (1,2 M) considerablemente inferior a aquella a la que el tipo silvestre es capaz de crecer (1,8 M). La constante de inhibición del etanol para el crecimiento es, en todos los mutantes, más pequeña que en la estirpe silvestre parental y diferente en

cada mutante (mientras en algunos  $K_i = 0,35$  M etanol, en otros  $K_i = 0,8$  M). Además, se han descrito mutantes que en medio con 0,5 M de etanol son incapaces de crecer, mientras que otros crecen igual que la estirpe silvestre. De aquí se deduce que, dentro del elevado número de genes implicados en la alta tolerancia a etanol en S. cerevisiae, pueden existir genes cuya importancia es mucho mayor que la de otros. La misma alteración de bases produciría efectos más drásticos de sensibilidad a etanol en unos genes que en otros. Pero también puede ser un simple efecto de rezumancia de las mutaciones: por ejemplo, no determinará el mismo grado de sensibilidad a etanol un cambio de fase o un fin de mensaje que un cambio de sentido en la secuencia de bases de un gen. Así, según el tipo de mutación, un mismo gen determinará efectos diversos en el fenotipo. Lo más razonable es que la variabilidad observada en el grado de sensibilidad del crecimiento a etanol sean consecuencia de las dos causas descritas.

Entre los mutantes incapaces de crecer en medio con etanol, se ha encontrado una gran diversidad de respuestas respecto de la viabilidad en tampón fosfato con etanol: mutantes muy afectados en la tolerancia del crecimiento (incapaces de crecer en medio con 0,5 M de etanol), poseen niveles de viabilidad similares a los de la estirpe silvestre. Sin embargo, otros mutantes con sensibilidad del crecimiento menos acusada, (incapaces de crecer en medio con 1,2 M etanol) presentan una alta tasa de mortalidad en tampón con etanol ( $5 \times 10^5$  veces menos viables que el tipo silvestre en tampón con 2,5 M etanol) (Tabla XIII). Esto implica una total falta de correlación entre la viabilidad en tampón con etanol y el crecimiento en medio con etanol, sugiriendo que, algunas proteínas son necesarias tanto para el mantenimiento de la viabilidad celular como para el crecimiento, y otras necesarias sólo para el crecimiento o para la viabilidad celular, sin que haya dependencia entre ambos procesos

Todos los mutantes obtenidos menos uno, son capaces de producir concentraciones de etanol similares a las del tipo silvestre (Fig. 24). Este tipo de mutaciones son muy interesantes desde un punto de vista práctico ya que impiden el crecimiento a concentraciones de 0,5 M de etanol y sin embargo, no alteran la fermentación que puede continuar hasta producir 2,4 M etanol. Estos mutantes no deben estar afectados en ninguna enzima relacionada con la ruta glicolítica, de forma que éstas siguen funcionando a concentraciones de etanol muy superiores a la máxima que el crecimiento es capaz de tolerar.

Finalmente, dada la importancia de los lípidos en la tolerancia al etanol (Introducción, apartado 8.1), se ha estudiado si algunos de los mutantes estaban sensiblemente afectados en la composición de ácidos grasos o esteroides en medio con y sin etanol. En ningún caso se encontraron diferencias significativas en la composición lipídica que expliquen la alta sensibilidad a etanol (Tabla XV y XVI). Hayashida y Ohta (1981) han descrito cambios en la composición lipídica de membranas que proporcionan una mayor tolerancia de la fermentación al etanol, aunque la mejora descrita sólo es de algunos grados de etanol. Diferencias en la tolerancia al etanol, tan drásticas como las que se observan en los mutantes de esta Tesis, sugieren que los genes implicados en la síntesis de los enzimas de las rutas metabólicas de los lípidos no son en absoluto los únicos importantes o necesarios.

S. cerevisiae es altamente tolerante a etanol, debido a que posee un elevado número de proteínas especialmente adaptadas a tolerarlo. Así, es fácil conseguir mutantes con estas proteínas alteradas presentando, como consecuencia, alta sensibilidad a etanol. Esto estaría apoyado por los datos de Llorente y Sols (1969) que observaron que los enzimas de la glicolisis, cinasa de las hexosas, cinasa de la fructosa-6-P, cinasa del piruvato y deshidrogenasa del alcohol de Saccharomyces aviformis poseían una actividad residual en 10% v/v etanol siempre superior a la de la levadura Kloeckera apiculata, más sensible a etanol.

La conclusión de este trabajo es, pues, que existe un elevado número de genes que determinan la alta tolerancia del crecimiento al etanol en S. cerevisiae. Estos genes no están necesariamente relacionados ni con las enzimas de la síntesis de lípidos, ni con los de la ruta glicolítica. Los genes descritos en esta Tesis, y definidos como *ETA* están específica y exclusivamente involucrados en el crecimiento, aunque algunos de ellos afecten también a los niveles de viabilidad celular en tampón con etanol. Los productos determinados por estos genes han de tener funciones específicas en la célula, de forma que su alteración se traduce en un menor crecimiento en medio YEPD, distinta morfología celular, diferente tamaño colonial, termosensibilidad, además de un fenotipo de sensibilidad del crecimiento al etanol.

## V. BIBLIOGRAFÍA

ACKMAN, R.G. 1977.  $\text{BF}_3$ -MeOH: A single reagent for ozonolysis of monoethylenic unsaturation. *Lipids* 12: 293-296.

AIBAS, S., M.SHODA y M.NAGATANI. 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotech. Bioeng.* 10: 845-864.

ASTELL, C.R., L.AHLSTROM-JONESSON, M.SMITH, K.TATCHELL, K.A.NASMYTH y B.D.HALL. 1981. The sequence of the DNAs coding for the mating type loci of Saccharomyces cerevisiae. *Cell* 27: 15-23.

AUGUSTIN, H.W., G.KOPPERSCHLAGEN, H.STEFFEN y E.HOFFMAN. 1965. Hexokinase als begrenzender Faktor des anaeroben Glucoseverbrauchs von Saccharomyces carlsbergensis NCYC 74. *Biochim. Biophys. Acta* 110: 437-439.

BACILA, M. y J.HORII. 1978. Induction of respiration-deficient mutants of Saccharomyces and evaluation of their efficiency for ethanol production, p. 577-594. En "Biochemistry and Genetics of Yeasts" (M. Bacila, B.L. Horecker y A.O.M. Stoppani, eds.) Academic Press. London

BACILA, M. y J.HORII. 1979. Improving the efficiency of alcohol production with respiration deficient yeast mutants. *Trends Biochem. Sci.* 4: 59-61.

BAILEY, R.B. y L.W.PARKS. 1975. Yeast sterol esters and their relationship to the growth of yeast. *J. Bacteriol.* 124: 606-612.

BAJPAI, P. y A.MARGARITIS. 1982. Ethanol inhibition kinetics of Kluyveromyces marxianus growth on Jerusalem artichoke juice. *Appl. Environm. Microbiol.* 44: 1325-1329.

BALDASSARE, J.J., K.B.RHINEHART y D.F.SILBERT. 1976. Modification of membrane lipid: physical properties in relation to fatty acid structure. *Biochemistry* 15: 2986-2994.

BANDAS, E.L. y I.A.ZAKHAROV. 1980. Induction of  $\rho^-$  mutations in yeast Saccharomyces cerevisiae by ethanol. *Mut. Res.* 71: 193-199.

BARNETT, R.E. y C.M.GRISHAM. 1972. The interrelation of membrane and protein structure in the functioning of the  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$  activated ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 266: 613-624.

BEAVEN, M.J., C.CHARPENTIER y A.H.ROSE. 1982. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in Saccharomyces cerevisiae NCYC 431. *J. Gen. Microbiol.* 128: 1447-1455.

BECKER, I.V. y A.BETZ. 1972. Membrane transport as controlling pacemaker of glycolysis in Saccharomyces carlsbergensis. *Biochim. Biophys. Acta.* 274: 584-597.

- BELL, R.M. y R.A. COLEMAN. 1980. Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 459-487.
- BENÍTEZ, T., L. DEL CASTILLO, A. AGUILERA, J. CONDE y E. CERDA-OLMEDO. 1983. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Appl. Environm. Microbiol.* 45: 1429-1436.
- BLOOMFIELD, D.K. y K. BLOCH. 1960. The formation of  $\Delta^9$ -insaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 235: 337-345.
- BORST, P. y L.A. GRIVELL. 1978. The mitochondrial genome of yeast. *Cell* 15: 705-723.
- BRITTON, R.J. y D.E. KOHNE. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529-540.
- BROWN, C.M. y A.H. ROSE. 1969. Fatty-acid composition of Candida utilis as affected by growth temperature and dissolved oxygen tension. *J. Bacteriol.* 99: 371-378.
- BROWN, G.G. y D.S. BEATTIE. 1978. Formation of the yeast mitochondrial membrane. V. Differences in the assembly process of cytochrome oxidase and coenzyme QH<sub>2</sub>: cytochrome c reductase during respiratory adaptation. *Biochim. Biophys. Acta* 538: 173-187.
- BROWN, S.W. y S.G. OLIVER. 1982. The effect of temperature on the ethanol tolerance of the yeast, Saccharomyces uvarum. *Biotech. Lett.* 4: 269-274.
- BROWN, S.W. y S.G. OLIVER. 1983. Isolation of ethanol-tolerant mutants of yeast by continuous selection. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 16: 119-122.
- BUTTKE, T.M. y L.O. INGRAM. 1978. Mechanism of ethanol-induced changes in lipid composition of Escherichia coli: inhibition of saturated fatty acid synthesis in vivo. *Biochem.* 17: 637-644.
- BUTTKE, T.M. y L.O. INGRAM. 1980. Ethanol-induced changes in lipid composition of Escherichia coli: inhibition of saturated fatty acid synthesis in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* 203: 505-571.
- BUTTKE, T.M., S. JONES y K. BLOCH. 1980. Effect of sterol side chains on growth and membrane fatty acid composition of Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.* 144: 124-130.
- BYERS, B. y L. GOETSH. (1975). Electron microscopic observations on the meiotic karyotype of diploid and tetraploid Saccharomyces cerevisiae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 5056-5060.
- CABECA-SILVA, C., A. MADEIRA-LOPES y N. VAN UDEN. 1982. Temperature relations of ethanol-enhanced petite mutation in Saccharomyces cerevisiae: Mitochondria as targets of thermal death. *FEMS Microbiol. Lett.* 15: 149-152.
- CALDERÓN, I.L. y E. CERDA-OLMEDO. 1983. Induction by N-methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidine of nuclear and cytoplasmic mutations in Saccharomyces cerevisiae. *Mut. Res.* 108: 133-146.

CAREY, V.C. y L.O. INGRAM. 1983. Lipid composition of Zymomonas mobilis: effects of ethanol and glucose. J. Bacteriol. 154: 1291-1300.

CARTER, B.L.A. 1975. The organization and replication of genetic material in yeast. Cell, 6: 259-268.

CIFERRI, O., S.SORA y O.TIBONI. 1969. Effect of gene dosage on tryptophan synthetase activity in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 61: 567-576.

CIRIACY, M. 1975a. Genetics of alcohol dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae. I. Isolation and genetic analysis of adh mutants. Mut. Res. 29: 315-326.

CIRIACY, M. 1975b. Genetics of alcohol dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. Molec. Gen. Genet. 138: 157-164.

CIRIACY, M. 1976. Cis-dominant regulatory mutations affecting the formation of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADH II) in Saccharomyces cerevisiae. Molec. Gen. Genet. 145: 327-333.

CIRIACY, M. 1979. Isolation and characterization of further cis- and trans-acting regulatory elements involved in the synthesis of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADH II) in Saccharomyces cerevisiae. Molec. Gen. Genet. 176: 427-431.

CIRILLO, V.P. 1962. Mechanism of glucose transport across the yeast cell membrane. J. Bacteriol. 84: 485-491.

COBOM, G.S. y J.M. HASLAM. 1973. The effect of altered membrane sterol composition on the temperature dependence of yeast mitochondrial ATPase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 52: 109-132.

CONDE, J. y G.R. FINK. 1976. A mutant of Saccharomyces cerevisiae defective for nuclear fusion. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73: 3651-3655.

CRONAN, J.E. Jr. 1975. Thermal regulation of the membrane lipid composition on Escherichia coli. J. Biol. Chem. 250: 7074-7077.

CRONAN, J.E. Jr. 1978. Molecular Biology of Bacterial membrane lipids. Ann. Rev. Biochem. 47: 163-189.

CRONAN, J.E. Jr. y E.P. GELMANN. 1975. Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. Bacteriol. Rev. 39: 232-256.

CHAPMAN, C. y W. BARTLEY. 1968. The kinetics of enzyme changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. Biochem. J. 107: 455-465.

- CHAPMAN, D., J. URBINA y K. M. KEOUGH. 1974. Biomembrane phase transitions: studies of lipid-water systems using differential scanning calorimetry. *J. Biol. Chem.* 249: 2512-2521.
- CHUNG, C. W. y W. J. NICKERSON. 1954. Polysaccharide synthesis in growing yeasts. *J. Biol. Chem.* 208: 395-407.
- DAWSON, P. S. S. y B. M. CRAIG. 1966. Lipids of Candida utilis: changes with growth. *Can. J. Microbiol.* 12: 775-785.
- DAY, A., E. ANDERSON y P. A. MARTIN. 1975. Ethanol tolerance of brewing yeasts. *European Brew. Conv. Proc. Congr.* 377-391.
- DE LA FUENTE, G. y A. SOLS. 1962. Transport of sugars in yeasts. II. Mechanisms of utilization of disaccharides and related glycosides. *Biochim. Biophys. Acta* 56: 49-62.
- DUJON, B. 1981. Mitochondrial genetics and functions, p. 505-635. En "The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Life cycle and inheritance" (J. N. Strathern, E. W. Jones y J. R. Broach, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- DUNTZE, W., D. NEUMANN, J. M. GANCEDO, W. ATZPODIEN y H. HOLZER. 1969. Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in Saccharomyces cerevisiae. *Eur. J. Biochem.* 10: 83-89.
- EATON, L. C., G. W. ERDOS, N. L. VREELAND y L. O. INGRAM. 1981. Failure of Escherichia coli to alter its fatty acid composition in response to cholesterol-induced changes in membrane fluidity. *J. Bacteriol.* 146: 1151-1153.
- ENTIAN, K. D. y F. K. ZIMMERMANN. 1980. Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of Saccharomyces cerevisiae. *Molec. Gen. Genet.* 177: 345-350.
- ERWIN, J. A. 1973. Comparative biochemistry of fatty acids in eukaryotic microorganisms, p. 41-143. En "Lipids and biomembranes of eukaryotic microorganisms" (J. A. Erwin, ed.) Academic Press, New York.
- FARREL, J. y A. M. ROSE. 1971. Temperature effects on solute accumulation by Candida utilis. *Arch. Microbiol.* 79: 122-139.
- FRAENKEL, D. G. 1982. Carbohydrate metabolism, p. 1-38. En "The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression". (J. N. Strathern, E. W. Jones y J. R. Broach, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

FRIED, V.A. y A. NOVICK. 1973. Organic solvents as probes for the structure and function of the bacterial membrane: effects of ethanol on the wild type and an ethanol-resistant mutant of Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 114: 239-248.

FULCO, A.J. 1969. Biosynthesis of unsaturated fatty acids in bacilli. I: temperature induction of the desaturation reaction. J. Biol. Chem. 244: 889-895.

GANCEDO, J.M. y C. GANCEDO. 1979. Inactivation of gluconeogenic enzymes in glycolytic mutants of Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. 101: 455-460.

GOMA, G., R. MOLETTA y M. NOVAK. 1979. Comments on the "maintenance coefficient" changes during alcohol fermentation. Biotech. Lett. 1: 415-420.

GOMORI, G. 1955. Preparation of buffers for use in enzyme studies, p. 138-146. En "Methods in Enzymology" (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, eds.) Vol 1, Academic Press, New York.

GOODWIN, T.W. 1973. Comparative biochemistry of sterols in eukaryotic microorganisms, p. 1-40. En "Lipids and biomembranes of eukaryotic microorganisms" (J.A. Enwin, ed.) Academic Press, New York.

GRISHAM, C.M. y R.E. BARNETT. 1973. The effects of long-chain alcohols on membrane lipids and the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>) ATPase. Biochim. Biophys. Acta. 311: 417-422.

GUERRERO, M.G., C. MANZANO, J. CARDENAS y M. LOSADA. 1974. Manometría. Publicaciones de la Universidad de Sevilla.

HARRISON, J.S. 1970. Miscellaneous products from yeast, p. 529-545. En "The Yeasts" (Rose, A.H. y J.S. Harrison, eds.) Vol. 3. Academic Press, London.

HARTWELL, L.H. 1970. Biochemical genetics of yeast. Ann. Rev. Genet. 4: 373-396.

HARTWELL, L.H. 1974. Saccharomyces cerevisiae. Cell Cycle. Bacteriol. Rev. 38: 164-198.

HATEFI, Y. y W.G. HANSTEIN. 1974. Destabilization of membranes with chaotropic ions, p. 770-790. En: "Methods in Enzymology" (S. Fleischer y L. Packer, eds.) vol. 31. Academic Press, New York.

HAYASHIDA, S., D.D. FENG y M. HONGO. 1974. Function of high concentration alcohol-producing factor. Agr. Biol. Chem. 38: 2001-2006.

HAYASHIDA, S., D.D. FENG y M. HONGO. 1975. Physiological properties of yeast cells grown in the proteolipid-supplemented media. Agr. Biol. Chem. 39: 1025-1031.

- HAYASHIDA, S., D.D.FENG, K.OHTA, S.CHAITIUMVONG y M.HONGO. 1976. Compositions and a role of Aspergillus oryzae - proteolipid as a high concentration alcohol-producing factor. Agr. Biol. Chem. 40: 73-78.
- HAYASHIDA, S. y K.OHTA. 1981. Formation of high concentrations of alcohol by various yeasts. J. Inst. Brew. 87: 42-44.
- HENRY, S.A. 1982. Membrane lipids of yeast: biochemical and genetic studies, p. 101-158. En "The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression" (J.N. Strattern, E.W. Jones y J.R. Broach, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- HEREDIA, C.F., A.SOLS y G.DE LA FUENTE. 1968. Specificity of the constitutive hexose transport in yeast. Eur. J. Biochem. 5: 321-329.
- HICKS, J.B. y I.HERSKOWITZ. 1976. Interconversion of yeast mating types. I. Direct observations of the action of the homothallicism (HO) gene. Genetics 83: 245-258.
- HICKS, J.B. y I.HERSKOWITZ. 1977. Interconversion of yeast mating types. II. Restoration of mating ability to sterile mutants in homothallic and heterothallic strains. Genetics 85: 373-393.
- HINSHELWOOD, C.M. 1946. Chemical kinetics of the bacterial cell. Oxford University Press. London.
- HITCHENER, B.J., A.F.EGAN y P.J.ROGERS. 1979. Energetics of Microbacterium thermosphactum in glucose-limited continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 37: 1047-1052.
- HOLZBERG, J., R.K.FINN y K.H.STEINKRAUS. 1967. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. Biotech. Bioeng. 9: 413-427.
- HORACK, J. y A.KOTYK. 1973. Isolation of a glucose-binding lipoprotein from yeast plasma membrane. Eur. J. Biochem. 32: 36-41.
- HOSSACK, J.A. y A.H.ROSE. 1976. Fragility of plasma membranes in Saccharomyces cerevisiae enriched with different sterols. J. Bacteriol. 127: 67-75.
- HUI, F.K. y P.G.BARTON. 1973. Mesomorphic behavior of some phospholipids with aliphatic alcohols and other nonionic substances. Biochim. Biophys. Acta 296: 510-517.
- HUNTER, K. y A.H.ROSE. 1971. Yeast lipids and membranes. p. 211-270. En "The Yeasts". (A.H. Rose y J.S. Harrison, eds.) Vol. 2 Academic Press. London.

HUNTER, K. y A.H. ROSE. 1972. Lipid composition of Saccharomyces cerevisiae as influenced by growth temperature. Biochim. Biophys. Acta 260: 639-653.

INGRAM, L.O. 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. J. Bacteriol. 125: 670-678.

INGRAM, L.O. 1977. Preferential inhibition of phosphatidyl ethanolamine synthesis in E. coli by alcohols. Can. J. Microbiol. 23: 779-789.

INGRAM, L.O. 1981. Mechanism of lysis of Escherichia coli by ethanol and other chaotropic agents. J. Bacteriol. 146: 331-336.

INGRAM, L.O. 1982. Regulation of fatty acid composition in Escherichia coli: a proposed common mechanism for changes induced by ethanol, chaotropic agents, and a reduction of growth temperature. J. Bacteriol. 149: 166-172.

INGRAM, L.O. y N.S. VREELAND. 1980. Differential effects of ethanol and hexanol on the Escherichia coli cell envelope. J. Bacteriol. 144: 481-488.

INGRAM, L.O., N.S. VREELAND y L.C. EATON. 1980. Alcohol tolerance in Escherichia coli. Pharmac. Biochem. Behav. 13: Sup. 1: 191-195.

ISMAIL, A.A. y A.M.M. ALI. 1971. Selection of high ethanol-yielding Saccharomyces. II. Genetics of ethanol tolerance. Folia Microbiologica 16: 350-354.

JANSSENS, J.H., N. BURRIS, A. WOODWARD y R.B. BAILEY. 1983. Lipid-enhanced ethanol production by Kluyveromyces fragilis. Appl. Environm. Microbiol. 45: 598-602.

JASPERS, H.T.A. y J. VAN STEVENINCK. 1975. Transport-associated phosphorylation of 2-deoxy-D-glucose in Saccharomyces fragilis. Biochim. Biophys. Acta 406: 370-385.

JOHNSTON, J.R. y R.K. MORTIMER. 1959. Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. J. Bacteriol. 78: 292-297.

JOHNSTON, N.C. y H. GOLDFINE. 1982. Effects of growth temperature on fatty acid and Alk-1-Enyl group composition of Veilonella parvula and Megasphaera elsdenii phospholipids. J. Bacteriol. 149: 567-575.

JOLLOU, D., G. KELLERMAN y A. LINNANE. 1968. The biogenesis of mitochondria. III. The lipid composition of aerobically y anaerobically grown Saccharomyces cerevisiae as related to the membrane systems of the cells. J. Cell. Biol. 37: 221-230.

- JONES, P.D., P.W. HOLLOWAY, R.O. PELUFFO y J.J. WAKIL. 1969. A requirement for lipids by the microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *J. Biol. Chem.* 244: 744-754.
- KAPLAN, N.O. y M.M. GIOTTI. 1957. Enzymatic determination of ethanol, p. 253-255. En "Methods in Enzymology" (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, eds.) vol 3. Academic Press, New York.
- KARGER, B.L., L.R. SNYDER y C. HORVATH. 1973. An introduction to separation science. (John Wiley & Sons, eds.) Wiley-Interscience Publication, New York.
- KATES, M. 1964. Simplified procedures for hydrolysis or methanolysis of lipids. *J. Lipid Res.* 5: 132-135.
- KEITH, A.D., B.J. WISNIESKI, S. HENRY y J.C. WILLIAMS. 1973. Membranes of yeast and *Neurospora*: lipid mutants and physical studies, p. 259-321. En "Lipids and biomembranes of eukaryotic microorganisms" (J.A. Erwin, ed.) Academic Press, New York.
- KOSARICK, N., S.L. ONG y Z. DUVNJAK. 1982. Fuel alcohol biosynthesis by *Zymomonas anaerobia*: optimization studies. *Biotech. Bioeng.* 24: 691-701.
- KOTYK, A. y D. MICHALJANICOVA. 1974. Nature of the uptake of D-galactose, D-glucose and  $\alpha$ -methyl-D-glucoside by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 332: 104-113.
- LAGUNAS, R. 1976. Energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. Discrepancy between ATP balance and known metabolic functions. *Biochim. Biophys. Acta* 440: 661-674.
- LAGUNAS, R. 1979. Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Mol. Cell. Biochem.* 27: 139-146.
- LAGUNAS, R. 1981. Is *Saccharomyces cerevisiae* a typical facultative anaerobe? *Trends Biochem. Sci.* 6: 201-202.
- LAGUNAS, R. y J.M. GANCEDO. 1973. Reduced pyridine-nucleotides balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 37: 90-94.
- LARUE, F., S. LAFON-LAFOURCADE y P. RIBEREAU-GAYON. 1980. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environm. Microbiol.* 39: 808-811.
- LEAO, C. y N. VAN UDEN. 1982a. Effects of ethanol and other alkanols on the kinetics and the activation parameters of thermal death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* 24: 1581-1590.
- LEAO, C. y N. VAN UDEN. 1982b. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* 24: 2601-2604.

- LEE, J.H., D.WILLIAMSON y P.L.ROGERS. 1980. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by Saccharomyces uvarum. Biotech. Lett. 2: 141-146.
- LEE, K.J., M.L.SKOTNICKI, D.E.TRIBE y P.L.ROGERS. 1981. The kinetics of ethanol production by Zymomonas mobilis on fructose and sucrose media. Biotech. Lett. 3: 207-212.
- LEES, N.D., S.L.LOFTON, R.A.WOODS y M.BARD. 1980. The effects of varied energy source and detergent on the growth of sterol mutants of Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol. 118: 209-214.
- LOUREIRO, V. y N.VAN UDEN. 1982. Effects of ethanol on the maximum temperature for growth of Saccharomyces cerevisiae: A model. Biotech. Bioeng. 24: 1881-1884.
- LYNEN, F. 1969. Fatty acid synthase, p. 17-33. En "Methods in Enzymology" (J.M. Lowenstein, ed.) Vol. 14. Academic Press, London.
- LYNEN, F. 1980. On the structure of fatty acid synthetase of yeast. Eur. J. Biochem. 112: 431-442.
- LLORENTE, P. y A.SOLS. 1969. Ethanol inactivation of glycolytic enzymes in yeasts with different alcohol resistance. 6th FEBS Meeting.
- MARR, A.G. y J.L.INGRAHAM. 1962. Effects of temperature on the composition of fatty acids in Escherichia coli. J. Bacteriol. 84: 1260-1267.
- MARTIN, CH.E., D.SIEGEL y L.R.AARONSON. 1981. Effects of temperature acclimation on Neurospora phospholipids. Biochim. Biophys. Acta 665: 399-407.
- MATILE, P.H., H.MOOR y C.F.ROBINOW. 1969. Yeast Cytology, p. 219-302. En "The Yeasts" (A.H. Rose y J.S.Harrison, eds.) Vol. 1. Academic Press, London.
- METCALFE, L.D. y A.A.SCHMITZ. 1961. Rapid preparation of fatty acid ester for gas chromatography analysis. Anal. Chem. 33: 363-364.
- MONOD, J. 1942. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann. Paris.
- MORTIMER, R.K. y D.C.HAWTHORNE. 1969. Yeast genetics, p. 385-460. En "The Yeasts" (A.H. Rose y J.J. Harrison, eds.) Vol. 1. Academic Press, London.

- MORTIMER, R.K. y D.SCHILD. 1982. Genetic map of Saccharomyces cerevisiae, p. 639-650. En "The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression". (J.N. Strathern, E.W. Jones y J.R. Broach, eds.) Cold Spring Harbor, New York.
- MOULIN, G., H. BOZE y P. GALZY. 1980. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. *Biotech. Bioeng.* 22: 2375-2381.
- MOULIN, G., H. BOZE y P. GALZY. 1981. A comparative study of the inhibitory effect of ethanol and substrates on the fermentation rate of parent and a respiratory-deficient mutant. *Biotech. Lett.* 3: 351-356.
- MOULIN, G., H. BOZE y P. GALZY. 1982. Utilization of a respiratory deficient mutant for alcohol production. *J. Ferment. Technol.* 60: 25-29.
- NAGODAWITHANA, T.W. y K.H. STEINKRAUS. 1976. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of Saccharomyces cerevisiae in "Rapid fermentation". *Appl. Environm. Microbiol.* 31: 158-162.
- NAGODAWITHANA, T.W., J.T. WHITT y A.J. CUTAIA. 1977. Study of the feedback effect of ethanol on selected enzymes of the glycolytic pathway. *ASBC Journal* 35: 179-183.
- NASMYTH, K.A. 1982. Molecular genetics of yeast mating type. *Ann. Rev. Genet.* 16: 439-500.
- NAVARRO, J.M. 1980. Fermentation alcoolique: influence des conditions de culture sur l'inhibition par l'ethanol. *Cell. Mol. Biol.* 26: 241-246.
- NAVARRO, J.M. y G. DURAND. 1978. Fermentation alcoolique: influence de la temperature sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levures. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 129B: 215-221.
- NELSON, D.A., W.R. BELTZ y R.L. RILL. 1977. Chromatin subunits from baker's yeast: isolation and partial characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 1343-1347.
- NES, W.R., B.C. SEKULA, W.D. NES y J.H. ADLER. 1978. The functional importance of structural features of ergosterol in yeast. *J. Biol. Chem.* 253: 6218-2225.
- NOVACK, M., P. STREHAIANO y M. MORENO. 1981. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotech. Bioeng.* 23: 201-211.

OKUYAMA, H., K. YAMADA, Y. KAMEYAMA, H. MEZAWA, Y. AKAMATSU y S. NOJIMA. 1977. Regulation of membrane lipid synthesis in Escherichia coli after shifts in temperature. *Biochemistry* 16: 2668-2673.

OLSON, G.J. y L.O. INGRAM. 1975. Effects of temperature and nutritional changes on the fatty acids on Agmenellum quadruplicatum J. *Bacteriol.* 124: 373-379.

PAINTER, P.R. y A.G. MARR. 1968. Mathematics of microbial populations. *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 519-548.

PANCHAL, C.J. y G.G. STEWART. 1980. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. *J. Inst. Brew.* 86: 207-210.

PARKS, L.W. 1978. Metabolism of sterols in yeast. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 6: 301-341.

PATTERSON, S.J., K.W. BUTLER, P. HUANG, J. LABELLE, I.C.P. SMITH y H. SCHNEIDER. 1972. The effects of alcohols on lipid bilayers: a spin label study. *Biochim. Biophys. Acta* 266: 597-602.

PIRT, S.J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

POLAINA, J. y J. CONDE. 1982. Genes involved in the control of nuclear fusion during the sexual cycle of Saccharomyces cerevisiae. *Molec. Gen. Genet.* 186: 253-258.

POLAKIS, E.S. y W. BARTLEY. 1965. Changes in the enzyme activities of Saccharomyces cerevisiae during aerobic growth on different carbon sources. *Biochem. J.* 97: 284-297.

PRESCOTT, D.J. y P.R. VAGELOS. 1972. Acyl carrier protein, p. 269-311. En: "Advances in Enzymology" (A. Meister, ed.) vol 36. John Wiley & Sons, New York.

PRINGLE, J.R. y L.H. HARTWELL. 1981. The Saccharomyces cerevisiae cell cycle, p. 97-142. En "The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Life cycle and inheritance" (J.N. Strathern, E.W. Jones y J.R. Broach, eds.) Cold Spring Harbor. New York.

PROUDLOCK, J.W., L.W. WHEELDON, D.J. JOLLOW y A.W. LINNANE. 1968. Role of sterols in Saccharomyces cerevisiae. *Biochim. Biophys. Acta*: 434-437.

RAMAIAH, A., J.A. HATHAWAY y D.E. ATKINSON. 1964. Adenylate as a metabolic regulator. Effect on yeast phosphofructokinase kinetics. *J. Biol. Chem.* 239: 3619-3622.

RANCK, J.L., L. MATEU, D.M. SADLER, A. TARDIEU, T. GULIK-KRZYWICKI V. LUZZATI. 1974. Order-disorder conformational transitions of the hydrocarbon chains of lipids. *J. Mol. Biol.* 85: 249-277.

RATTRAY, J.B.M., A.SCHIBECI y D.K.KIDFY. 1975. Lipids of yeasts. Bacteriol. Rev. 39: 197-231.

ROSE, A.H. y M.J.BEAVAN. 1982. End-product tolerance and ethanol, p. 513-531. En "Trends in the biology of fermentation for fuels and chemicals. Basic Life Sciences". (A. Hollaender et al., eds.) Vol. 18. Plenum Press, New York.

SCHATZ, G. y T.L.MASON. 1974. The biosynthesis of mitochondrial proteins. Ann. Rev. Biochem. 43: 51-87.

SCHEKMAN, R. y P.NOVICK. 1982. The secretory process and yeast cell-surface assembly. En "The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression". (J.N. Strathern, E.W. Jones y J.R. Broach, eds.) p. 1-38. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

SCHILLING, R.J. y R.C.REITZ. 1980. A mechanism for ethanol-induced damage to liver mitochondrial structure and function. Biochim. Biophys. Acta 603: 266-277.

SCHROEPFER, G.J.Jr. 1981. Sterol Biosynthesis Ann. Rev. Biochem. 50: 585-621.

SHERMAN, F., G.R.FINK y C.W.LAWRENCE. 1979. "Methods in yeast genetics". Cold Spring Harbor Laboratory for quantitative biology, New York.

SHERMAN, F. y C.W.LAWRENCE. 1974. "Saccharomyces", p. 359-393. En "Handbook of Genetics" (R.C. King, ed.) Vol. 1. Plenum Press, New York.

SILBERT, D. 1975. Genetic modification of membrane lipid. Ann. Rev. Biochem. 44: 315-339.

SINENSKY, M. 1971. Temperature control of phospholipid biosynthesis in Escherichia coli. J. Bacteriol. 106: 449-455.

SLONIMSKI, P.P., G.PERRODIN Y J.H.CROFT. 1968. Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation cells into respiratory deficient nonchromosomal "petites". Biochem. Biophys. Res. Commun. 30: 232-239.

SO, A. y E.W.DAVIES. 1964. The effect of organic solvents on protein biosynthesis and their influence on the amino acid code. Biochemistry 3: 1165-1169.

SOLS, S. 1967. The Pasteur effect in the allosteric era, p. 199-207. En "Reflections in biochemistry. In honor of Severo Ochoa" (A. Kornberg, ed.) Academic Press, New York.

SOLS,A., C.GANCEDO y G.DE LA FUENTE. 1971. Energy-yielding metabolism in yeasts, p. 271-308. En "The Yeasts" (A.H. Rose y J.J. Harrison, eds.) Vol. 2. Academic Press, London.

SOLS,A. y M.L.SALAS. 1966. Phosphofructokinase, p. 436-442. En "Methods in enzymology" (W.A. Wood, ed.) Vol 9. Academic Press, London.

SULLIVAN,K.H., M.K.JAIN y A.L.KOCH. 1974. Activation of the  $\beta$ -galactoside transport system in Escherichia coli ML308 by n-alkanols. Biochim. Biophys. Acta 352: 287-297.

SUN,G.Y. y A.Y.SUN. 1983. Chronic ethanol administration induced an increase in phosphatidylserine in Guinea pig synaptic plasma membranes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 113: 262-268.

STEINER,S. y R.LESTER. 1972. In vitro studies of phospholipid biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 260: 222-243.

STOOPS,J., E.AWAD, M.ARSLANIAN, S.GUNSBERG, S.WAKIL y R.OLIVER. 1978. Studies on the yeast fatty acid synthetase: subunit composition and structural organization of a large multifunctional enzyme complex. J. Biol. Chem. 253: 4464-4475.

STOUTHAMER,A.H. y C.BETTENHAUSEN. 1973. Utilization of Energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. A reevaluation of the method for determination of ATP production by measuring molar growth yields. Biochim. Biophys. Acta, 301: 53-70.

STRATHERN,J.N. y J.HERSKOWITZ. 1979. Asymmetry and directionality in production of new cell types during clonal growth: the switching pattern of homothallic yeast. Cell 17: 371-381.

SUN ,G.Y. y A.Y.SUN. 1983. Chronic ethanol administration induced an increase in phosphatidylserine in Guinea pig synaptic plasma membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 113: 262-268.

TAKETA,K. y B.M.POGELL. 1965. Allosteric inhibition of rat liver fructose 1,6-diphosphatase by adenosine 5'-monophosphate. J. Biol. Chem. 240: 651-662.

TANAKA,R. y K.P. STRICKLAND. 1965. Role of phospholipid in the activation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -activated adenosine triphosphate of belf brain. Arch. Biochim. Biophys. 111: 583-592.

TAYLOR,F.R. y L.W.PARKS. 1978. Metabolic interconversion of free sterols and steryl esters in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 136: 531-537.

- THOMAS, D.S., J.A. HOSSACK y A.H. ROSE. 1978. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 117: 239-245.
- THOMAS, D.S. y A.H. ROSE. 1979. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by Saccharomyces cerevisiae as affected by plasma-membrane lipid composition. Arch. Microbiol. 122: 49-55.
- THOMPSON, E.D., R.B. BAILEY y L.W. PARKS. 1974. Subcellular location of S-adenosylmethionine:  $\Delta^{24}$ -sterol methyltransferase in Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 334: 116-126.
- TSUCHIYA, K. y T. KIMURA. 1982. Kinetics of substrate utilization in adenine-limited chemostat cultures of Bacillus subtilis KYA741. Appl. Environm. Microbiol. 43: 794-799.
- UYEDA, K. 1979. Phosphofructokinase, p. 193-244. En: "Advances in Enzimology" (A. Meister, ed.) vol. 48. John Wiley & Sons, New York.
- VAN DEN THILLART, G. y G. DE BRUIN. 1981. Influence of environmental temperature on mitochondrial membranes. Biochim. Biophys. Acta 640: 439-447.
- VAN UDEN, N. 1969. Kinetics of nutrient-limited growth. Ann. Rev. Microbiol. 23: 473-486.
- VAN UDEN, N. 1971. Kinetics and energetics of yeast growth, p. 75-118. En "The Yeasts" (A.H. Rose y J.J. Harrison, eds.) Vol. 2. Academic Press, London.
- VAN UDEN, N. y H. DA DRUZ DUARTE. 1981. Effects of ethanol on the temperature profile of Saccharomyces cerevisiae. Z. Allg. Mikrobiol. 18: 275-279.
- VAN UDEN, N. y A. MADEIRA-LOPES. 1975. Dependence of the maximum temperature for growth of Saccharomyces cerevisiae on nutrient concentration. Arch. Microbiol. 104: 23-28.
- VAN UDEN, N. y A. MADEIRA-LOPES. 1976. Yield and maintenance relations of yeast growth in the chemostat at superoptimal temperatures. Biotech. Bioeng. 18: 791-804.
- VIÑUELA, E., M.L. SALAS y A. SOLS. 1963. Two interconvertible forms of yeast phosphofructokinase with different sensitivity to endproduct inhibition. Biochem. Biophys. Res. Commun. 15: 243-149.
- WALES, D.S., T.G. CARTLEDGE y D. LLOYD. 1980. Effects of glucose repression and anaerobiosis on the activities and subcellular distribution of tricarboxylic acid and associated enzymes in Saccharomyces carlsbergensis. J. Gen. Microbiol. 116: 93-101.
- WASUNGU, K.M. y R.E. SIMARD. 1982. Growth characteristics of baker's yeast in ethanol. Biotech. Bioeng. 24: 1125-1134.

WESCOTT, J.Y. y H.WEINER. 1983. Effect of ethanol on synaptosomal (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>) ATPase in control and ethanol-dependent rats. Arch. Biochem. Biophys. 223: 51-57.

WICKNER, R.B., F.BOUTELET y F.HILGER. 1982. Evidence for a new chromosome in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 3: 415-420.

WILLIAMSON, V.M., J.BENNETZEN, E.T.YOUNG, K.NASMYTH y B.J.HALL. 1980. Isolation of the structural gene for alcohol dehydrogenase by genetic complementation in yeast. Nature 283: 214-216.

WOODS, R.A. 1971. Nystatin-resistant mutants of yeasts: alterations in sterol contents. J. Bacteriol. 108: 69-73.

WURSTER, B., B.HESS, T.A.W.KOERNER, Jr., R.J.VOLL y E.S.YONNATHAN. 1976. Tautomeric and anomeric specificity of allosteric activation of yeast pyruvate kinase by D-fructose 1,6-biphosphate and its relevance in D-glucose catabolism. FEBS Lett. 63: 17-21.

## AGRADECIMIENTOS

Al Prof. D. Enrique Cerdá-Olmedo por haberme ofrecido la oportunidad de realizar este Trabajo en su Departamento y por su ayuda durante estos años.

Al Dr. Jaime Conde Zurita por sus sugerencias y ayuda durante el desarrollo de este Trabajo.

A Juan Jiménez por su ayuda y colaboración durante estos años. A Isabel López Calderón por su ayuda y útiles consejos. A Enrique Flores, quien me introdujo y me permitió trabajar con manometría de Warburg. A Juan Luis Ramos por su colaboración en las determinaciones de oxígeno. A Richard Bailey y Neil Burris, gracias a los cuales aprendí a determinar lípidos. A Paco Rodríguez por su valiosa ayuda en los cálculos estadísticos. A Eduardo Rodríguez por su ayuda con las fotos. Asunción Fernández por su eficaz colaboración técnica. A Loli Suárez por haber mecanografiado esta Tesis. A Paco Castillo y M<sup>a</sup> del Mar por su ayuda en EE.UU.

Al I.N.A.P.E. y al Comité Conjunto Hispano-Norteamericano que proporcionaron la ayuda económica.

Al resto de los compañeros del Departamento por su apoyo durante estos años.

Y muy especialmente a Tahía Benítez Fernández, directora de esta Tesis. Su ayuda, colaboración y apoyo constantes han sido fundamentales. A ella.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO-MATEMÁTICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. Cuchis Aguilera López  
titulada "Genética y Embriología de la tolerancia  
al Etanol en Saccharomyces Cerevisiae"

ordó otorgarle la calificación de Sobresaliente "Cum Laude"

Sevilla, 4 de Noviembre 1.983

EL Vocal,  
[Signature]  
Presidente.

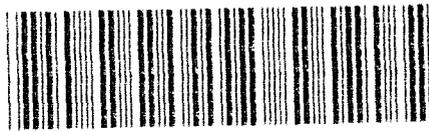
El Vocal,  
[Signature]  
El Secretario,

El Vocal,  
[Signature]  
El Director.

R. Verdá Olmedo

Talia Guiter

[Signature]



500293045  
FBI E TD-007

293045