



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA
ATPasa EN LAS CEPAS DE LEVADURAS OFF1, SLP1 Y MC4
AISLADAS DE HÁBITATS EXTREMOS”**

TESIS QUE PRESENTA:

p.Q.F.B.: JOSÉ ALBERTO MARTÍNEZ MORA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

ASESOR:

Doctor en Ciencias Biológicas: ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

CO-ASESOR:

**Maestro en Ciencias en Biología Experimental: JORGE ARTURO MEJÍA
BARAJAS**

MORELIA MICHOACÁN, DICIEMBRE DE 2014



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA
ATPasa EN LAS CEPAS DE LEVADURAS OFF1, SLP1 Y MC4
AISLADAS DE HÁBITATS EXTREMOS”**

TESIS QUE PRESENTA:

p.Q.F.B.: JOSÉ ALBERTO MARTÍNEZ MORA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

MORELIA MICHOACÁN, DICIEMBRE DE 2014

Dedicatoria

A Dios por brindarme la dicha de la vida, y guiarme por el buen camino en mi formación, siendo un apoyo incondicional para lograrlo.

A mis padres que me dieron vida, educación, consejos, etc., quienes permanentemente me apoyaron con su espíritu alentador a lograr mis metas y darme la fuerza que me impulsó a ser lo que soy, y que con su ejemplo aprendí a ser perseverante.

Agradecimientos

*A mi Asesor: **D.C. Alfredo Saavedra Molina**, y Co-Asesor: **M.C. Jorge Arturo Mejía Barajas**, quienes me brindaron su valioso tiempo, orientación y por compartir conmigo sus conocimientos en el presente trabajo de investigación.*

A mi familia por su comprensión y estímulo constante, además de su apoyo incondicional a lo largo de mis estudios.

Y a todas las personas que de una u otra forma apoyaron en la realización de este trabajo.

Reconocimiento



A mi maravillosa Facultad de Químico Farmacobiología, nido de muchos, que como yo eligieron esta extraordinaria carrera y que con mucho orgullo, amor, pasión y respeto, representaré.

A todos mis maestros de la carrera por sus conocimientos, consejos, confianza y formación.

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo de investigación y mi formación académica.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.0 INTRODUCCIÓN	
1.1. Las levaduras.....	3
1.2. Las levaduras como modelo de estudio.....	4
1.3. Usos de las levaduras.....	4
1.4. Condiciones de estrés a las que son sometidas las levaduras en la industria.....	6
1.5. Diferencias entre levaduras de laboratorio y silvestres.....	6
1.6. Efecto de la temperatura en el desarrollo de las levaduras.....	7
1.7. Ventajas del uso de levaduras termotolerantes en la industria.....	8
1.8. La mitocondria.....	8
1.9. La ATPasa mitocondrial y su relación con la CTE.....	9
1.10. Tipos de ATPasa y sus inhibidores.....	15
1.11. Funciones de la ATPasa de la membrana plasmática.....	15
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	17
4.0 OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo general.....	17
4.2. Objetivos específicos.....	17

5.0 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales.....	17
5.2. Cultivo de las cepas de levadura.....	18
5.3. Cinética de crecimiento de las levaduras.....	18
5.4. Viabilidad de las levaduras a diferentes temperaturas.....	18
5.5. Determinación del pH.....	18
5.6. Efecto de la azida de sodio en la viabilidad y termotolerancia de las levaduras.....	19
5.7. Aislamiento de mitocondrias de las levaduras.....	19
5.8. Determinación de la concentración de fosforo inorgánico (Pi).....	21
5.9. Lipoperoxidación celular y mitocondrial.....	21
5.10. Procesamiento estadístico.....	22

6.0 RESULTADOS

6.1. Cinética de crecimiento	23
6.2. Viabilidad de las levaduras a diferentes temperaturas.....	24
6.3. Determinación del Ph con y sin NaN_3	25
6.4. Efecto de la azida de sodio en la viabilidad y termotolerancia de las levaduras.....	28
6.5. Lipoperoxidación celular.....	30
6.6. Determinación de la concentración de fosfato inorgánico.....	31
6.7. Lipoperoxidación mitocondrial.....	32

7. DISCUSIÓN.....	33
-------------------	----

8. CONCLUSIÓN.....	40
--------------------	----

9. REFERENCIAS.....	40
---------------------	----

10. ABREVIATURAS.....	51
-----------------------	----

Resumen

Las levaduras son hongos unicelulares eucariontes que se reproducen principalmente por gemación y ocasionalmente por fisión (Walker, 2009), son los microorganismos más utilizados en la biotecnología a nivel mundial. Las levaduras durante los procesos industriales son sometidas a alta temperatura, donde se ha observado que la actividad de la proteína ATPasa es esencial, sin embargo, esto sólo se ha estudiado en levaduras de laboratorio, las cuales se encuentran en condiciones óptimas de crecimiento, sin considerar levaduras con condiciones fisiológicas alternas generadas por su entorno, por lo que es importante analizar la actividad de esta proteína en la resistencia a altas temperaturas en las cepas OFF1, SLP1 y MC4 aisladas de hábitats extremos. En el presente trabajo se analizó el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de las cepas OFF1, SLP1 y MC4, así como la actividad de las ATPasas de la membrana plasmática y la mitocondrial. Lo anterior se realizó mediante la medición de pH del medio extracelular y la producción de fosforo inorgánico (Pi), respectivamente. La lipoperoxidación celular y mitocondrial se evaluaron con el fin de observar si existía una relación entre el estado de las membranas donde se encuentra la ATPasa membranal y mitocondrial, respectivamente. Se observó que la temperatura aumenta la actividad de la ATPasa de membrana, al bombear más protones al medio extracelular y acidificar el medio. En las cepas aisladas (MC4, OFF1, SLP1) y la de laboratorio (W303), con el inhibidor de las ATPasas como lo es la azida de sodio (NaN_3), se observó que el medio fue más alcalino, debido a que el inhibidor impide el transporte de electrones y no hay bombeo de protones por parte de la ATPasa de la membrana plasmática.

Palabras clave: Levadura, ATPasa, temperatura, hábitat extremo, viabilidad.

ABSTRACT

Yeasts are eukaryotic unicellular fungi that mainly reproduce by gemmation and occasionally by fission (Walker, 2009), are the most used in biotechnology worldwide microorganisms. Yeasts during industrial processes are subjected to high temperature, where it was observed that the activity of the ATPase protein is essential, however, this has only been studied in yeasts of laboratory, which are in optimal growth conditions, without consider yeasts with alternate physiological conditions generated by their environment, so it is important to analyze the activity of this protein in resistance to high temperatures in the OFF1, SLP1 and MC4 strains isolated from extreme habitats. In this study the effect of temperature on the viability of OFF1, SLP1 and MC4 strains analyzed, as well as the activity of the plasma membrane ATPase and mitochondrial. This was done by measuring the pH of the extracellular medium and production of inorganic phosphorus (Pi), respectively. The cellular and mitochondrial lipid peroxidation were evaluated to see if there was a relationship between the state of the membranes where the membrane and mitochondrial ATPase respectively. It was observed that the temperature increases the activity of membrane ATPase, by pumping more protons to the extracellular medium and acidify the medium. Isolates in (MC4, OFF1, SLP1) and laboratory (W303) with the ATPase inhibitor such as the sodium azide (NaN_3), was observed that the medium was more alkaline, because the inhibitor prevents the transport of electrons and no proton pumping by the membrane plasmatic ATPase.

Keywords: Yeast, ATPase, temperature, extreme habitats, viability.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Las levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares que se reproducen principalmente por gemación y ocasionalmente por fisión (Walker, 2009). Son eucariontes unicelulares con características similares a las células eucariontes superiores. El tamaño varía entre las especies de levaduras, que va de los 3 a los 40 μm , al igual que su tiempo de reproducción siendo de 2 a 3 horas en las condiciones de crecimiento más favorables. Se conocen alrededor de 60 géneros y 500 especies de levaduras las cuales fueron identificadas por primera vez por Louis Pasteur en 1857 por su capacidad de fermentación. El término levadura proviene del latín “levare”, que significa “levantar”, ya que causa la expansión de las proteínas del gluten en la harina que hace que se expanda la masa, debido a la producción de CO_2 . Las levaduras no son tan comunes como las bacterias en el medio ambiente natural, sin embargo, pueden ser aisladas de suelo, agua, plantas, animales e insectos. Los hábitats de las levaduras son algunos tejidos de las plantas como hojas, flores y frutos, pero algunas especies se encuentran como comensales o creando relaciones parasitarias con los animales (Walker, 2009).

En un estudio realizado por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), se aislaron ocho cepas de levaduras expuestas a condiciones extremas de zonas mezcaleras de los estados de Jalisco, Durango, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí y Zacatecas (México), que pertenecen tres al género *Saccharomyces spp.*, dos al género *Kluyveromyces spp.*, una al género *Zygosaccharomyces spp.*, otra del género *Torulaspora spp.*, y una más del género *Cándida spp.* Se observó que al ser utilizadas para fermentar jugos de agaves obtenidos de las mismas regiones, las cepas de *Kluyveromyces* aisladas de diferentes regiones y clasificadas como OFF1 y SLP1, presentaron la mayor capacidad adaptativa, obteniendo los mayores rendimientos en la producción celular, de etanol y sustrato consumido. La cepa MC4 (*S. cerevisiae*)

presentó mayor velocidad de consumo de sustrato. Por lo cual se seleccionaron estas cepas con el fin de evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de su ATPasa.

1.2 Las levaduras como modelo de estudio

Las levaduras son eucariontes unicelulares que tienen características similares a la de las células eucariontes superiores, esto, junto con su facilidad de crecimiento, susceptibilidad a los análisis biológicos bioquímicos, genéticos, y moleculares, hacen que las levaduras sean ampliamente utilizadas como modelo de estudio en la biología celular (Walker, 2009).

1.3 Usos de las levaduras

Las levaduras tienen una amplia aplicación en la biotecnología tradicional y moderna, siendo los microorganismos más utilizados en esta disciplina, con usos como fuentes de obtención de etanol, vitaminas del complejo B, pigmentos, forrajes, enzimas, cofactores, proteínas de organismos unicelulares, biomasa y otros productos con valor añadido, adicionalmente las levaduras pueden ser utilizadas para biorremediación (Walker, 2009). Algunas de sus aplicaciones se resumen en la figura 1.

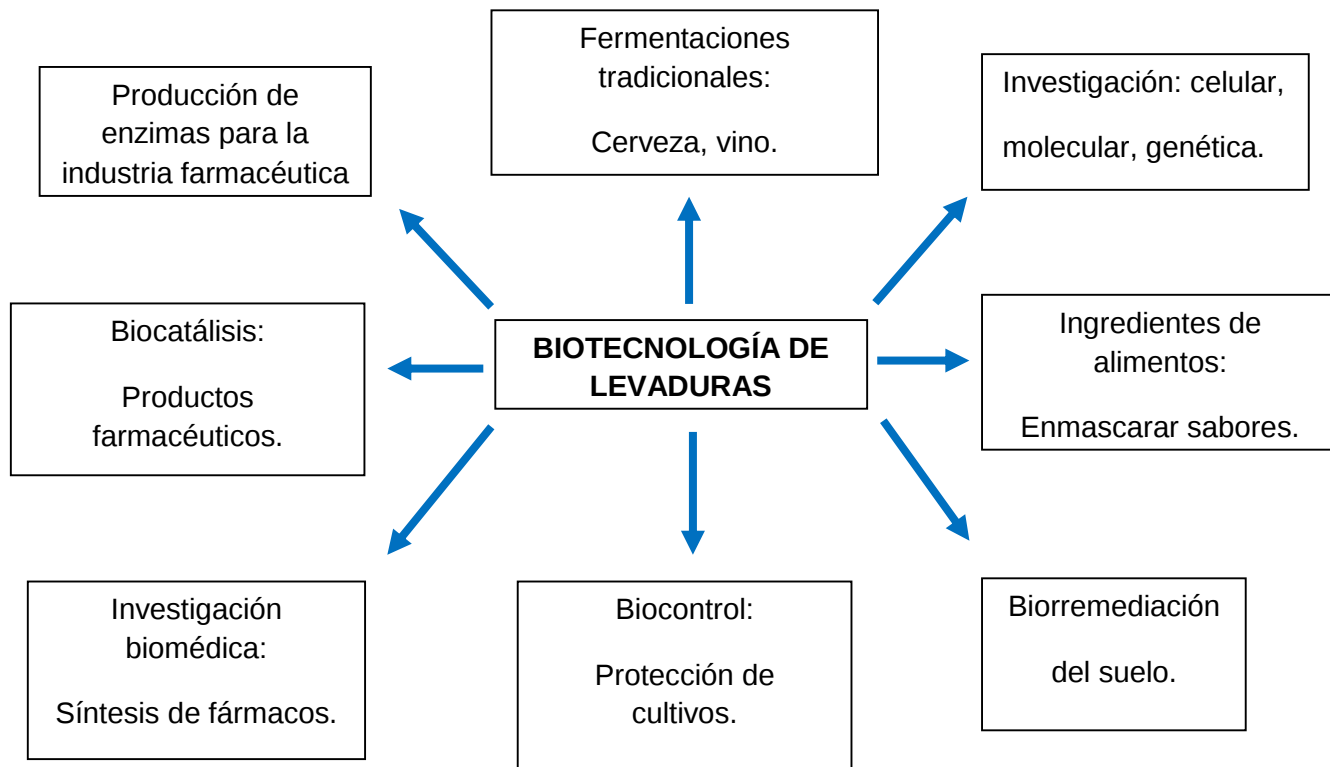


Figura 1. Usos de las levaduras en la biotecnología. Jhonson, 2013; Tomado y modificado de Walker, 1998.

Las levaduras se utilizan en muchos procesos industriales, tales como la producción de bebidas alcohólicas, biomasa y diversos productos metabólicos. La última categoría incluye enzimas, vitaminas, polisacáridos capsulares, carotenoides, lípidos, glucolípidos, ácido cítrico, etanol, CO₂ y compuestos sintetizados por la introducción de ADN recombinante. Algunos de estos productos se producen comercialmente, mientras que otros son potencialmente valiosos en biotecnología (Kurtzman y Fell, 1997). Algunas especies de levaduras tienen el potencial de ser usadas en las industrias de alimentos, bebidas y fermentación. Sin embargo, en el uso de estas levaduras se generan condiciones que producen diferentes tipos de estrés (Nevoigt, 2008).

1.4 Condiciones de estrés a las que son sometidas las levaduras en la industria

Las principales condiciones fisicoquímicas y de estrés biótico en que las levaduras están expuestas al ser utilizadas en la industria, o cuando se utilizan en aplicaciones de control biológico del medio ambiente son: daño mecánico, estrés osmótico, etanol/CO₂, anaerobiosis, deshidratación, inhibidores químicos, choque por pH, estrés oxidativo, estrés hipóxico, envejecimiento y choque térmico (Walker, 2011). *Pichia anomala* responde a tales condiciones de estrés con: acumulación de trehalosa y secreción de acetato de etilo bajo la limitación de oxígeno; síntesis de glicerol (al inicio) y arabitol (al final) durante el estrés con sal; induce la biosíntesis de las proteínas de choque térmico y alterando la estructura de las membranas celulares. Estas respuestas de estrés se observan también en otras levaduras (Walker y van Dijck, 2006). La síntesis de arabitol la realizan las células de *P. anomala* (Bellinger y Larher, 1988) y no es un fenómeno observable en *S. cerevisiae*. En cuanto a estrés hipóxico, Fredlund (2004) ha propuesto que la acumulación de trehalosa en *P. anomala* participa como respuesta específica a la limitación de oxígeno. El acetato de etilo actúa como una medida de protección contra el estrés, mediante la prevención de la acumulación intracelular de ácido acético tóxico y al mismo tiempo suprimir el crecimiento de microorganismos competidores (Fredlund, 2004).

1.5 Diferencias entre las cepas de laboratorio y silvestres

Se ha reportado que existen diferencias fisiológicas y de resistencia ante diferentes tipos de estrés entre cepas silvestres o industriales y cepas que se encuentran bajo condiciones controladas en laboratorio. Los cambios ambientales constantes a los que están expuestas las cepas industriales pueden ser responsables de incrementar su tolerancia al estrés. Los cambios ambientales causan estrés para los organismos, estrés al cual deben adaptarse con eficacia para sobrevivir. Este tipo de estrés se asocia frecuentemente con la producción de

especies reactivas de oxígeno (ERO) (Avery, 2011). Garay-Arroyo *et al.*, (2004), observaron que las cepas de levaduras aisladas de hábitats extremos muestran mayores tasas de supervivencia en comparación con las cepas de laboratorio cuando son expuestas a estrés oxidativo y choque térmico. Al estar a la intemperie las levaduras son afectadas por factores externos como luz ultravioleta, radiación iónica, metales pesados y choque térmico, que aumentan en la célula la producción de especies reactivas de oxígeno, al igual que su metabolismo, causando daño a los lípidos, proteínas, membranas (Dimova *et al.*, 2008).

1.6 Efecto de la temperatura en el desarrollo de las levaduras

La temperatura es uno de los parámetros ambientales que tiene influencia directa con el crecimiento, rendimiento y sobrevivencia de los organismos incluyendo las levaduras. Como todos los microorganismos, las levaduras exhiben características específicas cuando se cultivan a temperatura mínima, óptima o máxima. Existe una clasificación de las levaduras en base al rango de temperatura ideal a la cual se desarrollan, y fue propuesta por Arthur y Watson en 1976: 1) Levaduras psicrófilas, con límites de temperatura de crecimiento ideal de 2 a 20°C; 2) Levaduras mesófilas, con límites de temperatura de crecimiento ideal de 5 a 35°C; 3) Levaduras termófilas, con límites de temperatura de crecimiento favorable de 28 a 45°C; y 4) Levaduras termotolerantes con límites de temperatura de crecimiento favorable de 8 a 42°C. Para su crecimiento, las levaduras termófilas presentan valores de temperatura mínima $\geq 20^{\circ}\text{C}$, mientras que las levaduras termotolerantes poseen valores de temperatura óptima $> 40^{\circ}\text{C}$ (Koedrith *et al.*, 2008). Slapack *et al.* (1987) definen a las levaduras termotolerantes como aquellas capaces de crecer a temperaturas $\geq 40^{\circ}\text{C}$, mientras que McCracken y Gong (1982), las definen como levaduras con una temperatura de crecimiento máxima de 37 a 45°C. La temperatura, además de ser un fenómeno regulatorio en todas las células vivas, condicionando la velocidad de crecimiento y la supervivencia de los microorganismos, eleva la susceptibilidad hacia compuestos inhibitorios del crecimiento y exhiben una respuesta molecular más rápida.

1.7. Ventajas del uso de levaduras termotolerantes en la industria

Recientemente se ha generado un creciente interés en las levaduras capaces de crecer a temperatura elevada (superior a 40°C), ya que presentan ciertas ventajas en los procesos industriales sobre las que no son termotolerantes (Koedrith *et al.*, 2008). Tales ventajas se resumen en el siguiente cuadro (Roehr, 2001).

Reducción de contaminación y costos de enfriamiento en los procesos industriales.
Mayor actividad metabólica de las levaduras y velocidad de fermentación.
Mayor mantenimiento de condiciones anaerobias al disminuir la solubilidad del O ₂ y otros gases en el caldo de fermentación.
Disminución de la viscosidad del caldo de fermentación, y la consecuente reducción en la energía necesaria para la agitación.
Reducción de costos en el mantenimiento de una alta temperatura cuando se es necesario.
Reducción en la formación de subproductos indeseables debido a la lisis celular.

1.8 La mitocondria

Las mitocondrias son los orgánulos celulares encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular en los organismos eucariontes aerobios, al sintetizar ATP a expensas de los equivalentes reductores, como el NADH y FADH₂, por el proceso llamado fosforilación oxidativa. Actúan por tanto, como centrales energéticas de la célula. Miden alrededor de 1µm de longitud y aproximadamente 0.5µm de diámetro (Geoffrey, 2000). La energía en forma de ATP se sintetiza mediante el acoplamiento del transporte de electrones y el bombeo de protones por la cadena transportadora de electrones (CTE) para generar la fuerza protomotriz, la cual impulsa la síntesis de ATP por la F₁F₀-ATPasa. Las mitocondrias se componen de una membrana externa, una membrana interna, el espacio intermembranal (espacio entre la membrana interna y externa) y la matriz. La membrana externa es una bicapa de fosfolípidos, con diferentes tipos de proteínas incrustadas en la misma (Rapaport, 2003). La más

importante de ellas son las porinas, que permiten libremente el transporte (exportación e importación) a través de las membranas de moléculas menores de 10 kDa como proteínas, iones, nutrientes y ATP. La membrana externa rodea la membrana interna creando un espacio intermembrana. La membrana interna contiene 75% en peso de proteínas y es considerablemente más rica en proteínas que la membrana externa. Es permeable al O₂, el CO₂, el H₂O, y completamente impermeable a la mayoría de los iones y presenta una gran variedad de invaginaciones que forman las crestas mitocondriales, en donde se encuentran los complejos proteicos que participan en la fosforilación oxidativa y proteínas de transporte que controlan el paso de metabolitos como ATP, ADP, Ca²⁺, piruvato, fosfato (Voet y Voet., 2006). En la figura 2 se muestra la estructura de la mitocondria.

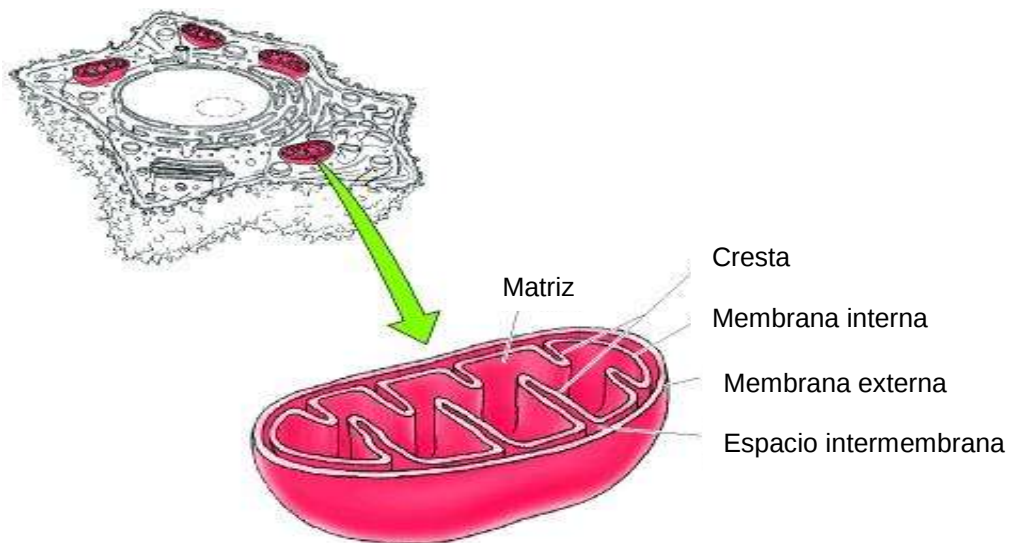


Figura 2. Estructura de la mitocondria. Tomada de: Geoffrey M. C. 2000.

1.9 La ATPasa mitocondrial y su relación con la CTE

La F₁F₀-ATP sintasa es un complejo enzimático encargado de proveer a la célula la energía necesaria para realizar todos sus procesos vitales mediante la síntesis de ATP, aunque también puede llevar a cabo la hidrólisis de esta molécula

energética, dando como productos: ADP y fosfato por lo que al complejo proteico también se le nombra F_1F_0 -ATPasa (Alfonzo *et al.*, 1981).

La ATPasa mitocondrial se localiza en la membrana mitocondrial interna y acopla la energía del gradiente electroquímico creado por la cadena de transporte de electrones a la síntesis de ATP (Geoffrey, 2000). A la ATPasa se le representa como un motor molecular debido a su mecanismo catalítico. Consta de un rotor y un estator. El rotor está compuesto por un eje central y un anillo de proteolípidos. Estas subunidades están involucradas en el movimiento de la enzima durante la catálisis. Al estator lo forman las subunidades del eje periférico, las cuales se mantienen estáticas durante las síntesis de ATP y están ancladas a las subunidades catalíticas (Weber y Senior, 2003). La ATPasa mitocondrial consta de 2 regiones: la región F_1 (actividad catalítica, hidrofílica) y la F_0 (anclada a la membrana, hidrófoba), como se ilustra en la figura 3. Ambas regiones están unidas por un eje central y uno periférico. Están formadas por subunidades (3α , 3β , γ , δ , ϵ) de las cuales las subunidades β son las responsables de la síntesis de ATP. La región F_0 se encuentra en la bicapa lipídica y tiene 3 tipos de subunidades (a, 2b, c), que atraviesan físicamente la membrana en forma de tubo donde se mueven los H^+ del espacio intermembranal a la mitocondria (Cano-Estrada y González-Halphen, 2011).

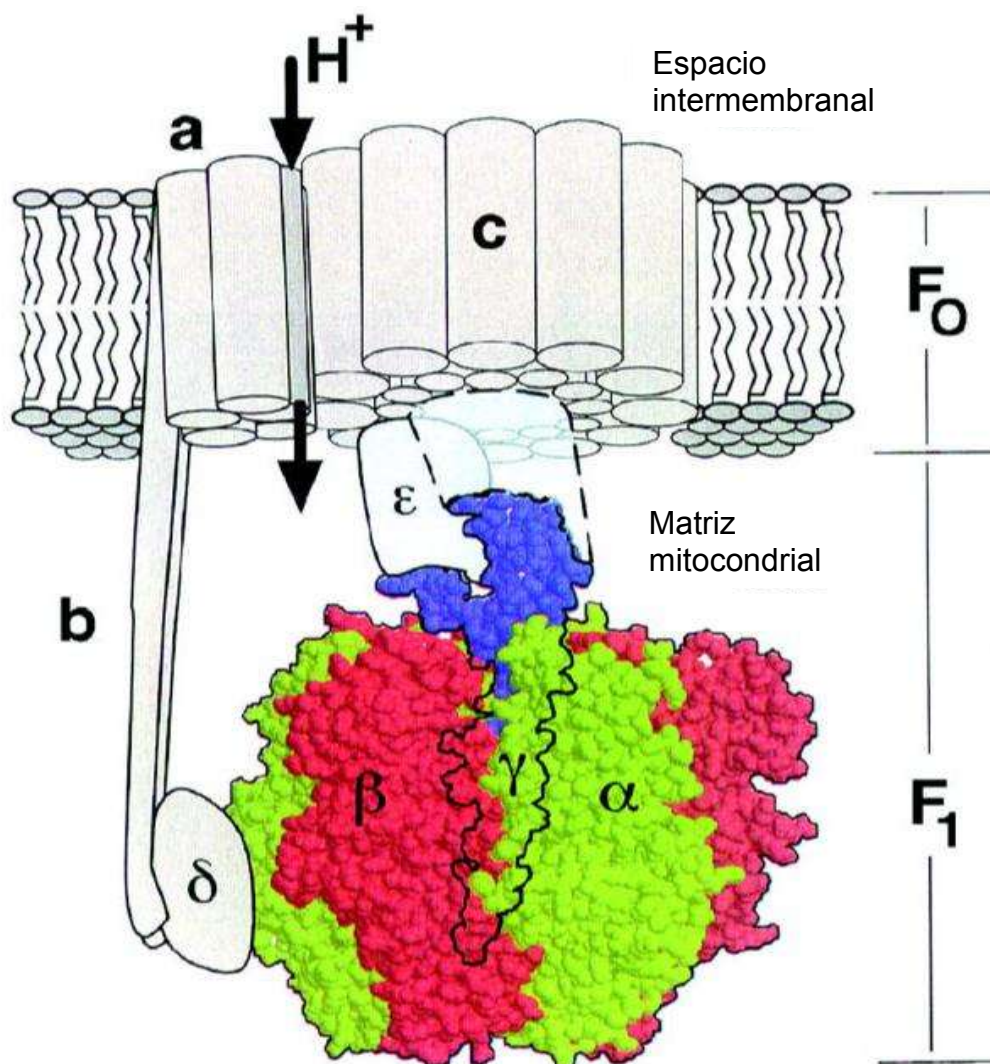


Figura 3. Estructura de la F_1F_0 -ATPasa, convierte la energía eléctrica, en el canal de protones, en energía mecánica en $\gamma\epsilon$ que actúa como un resorte de torsión que con el segmento b unidas por la δ y el canal de la a, constituyen un resorte en forma de paralelogramo en la porción β catalizando la energía en ATP. Imagen tomada de Oster y Hongyun, 1999.

La síntesis de ATP por parte de la ATPsintasa es impulsada por la fuerza protomotriz, como se muestra en la figura 4. Los protones atraviesan la membrana por un conducto formado en la región F_0 (entre las subunidades a y c). Esta rotación hace girar al eje central (subunidades γ , ϵ) en movimientos de 120° ; cuando la subunidad pasa del estado cerrado al abierto, se libera una molécula de

ATP, y a su vez se captan las moléculas de ADP y fosfato. Con estos sustratos, la subunidad β cambia a una conformación semiabierta, donde se lleva a cabo la formación del ATP, y posteriormente uno de los sitios catalíticos se abre para liberar el producto. Este ciclo se repite en forma alterna en las tres subunidades β de la ATPsintasa. La forma T está unida al ATP. El flujo de protones cambia la conformación de las 3 unidades β , así que la forma L se transforma en T y la T cambia a O y a su vez, la forma O cambia a conformación L, como se muestra en la figura 4. (Cano-Estrada y González-Halphen, 2011).

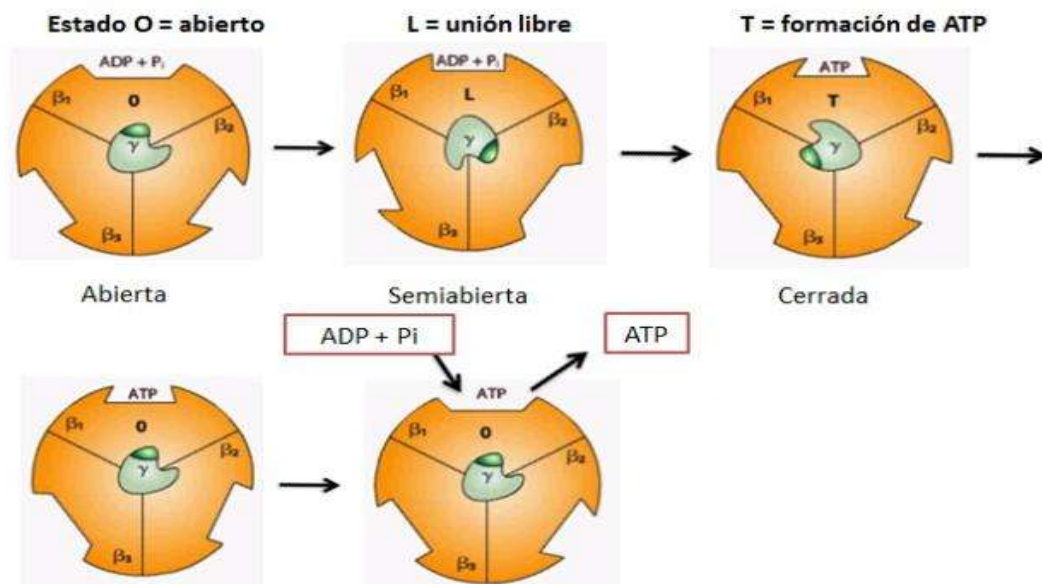


Figura 4. Mecanismo catalítico de la ATPasa mitocondrial. Imagen modificada y tomada de Voet y Voet, 2006.

La síntesis e hidrólisis del ATP siguen la misma reacción. El ATP es hidrolizado si el rotor se mueve 120° en contra de las manecillas del reloj; por el contrario, se sintetiza una molécula de ATP si se mueve 120° en el sentido de las manecillas del reloj. La hidrólisis catalizada por la F_1F_0 -ATPasa es fisiológicamente importante, ya que es esencial para varios procesos celulares vitales en función del mantenimiento del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) a través de la membrana interna mitocondrial (Lefebvre *et al.*, 2003).

La CTE está compuesta de cuatro complejos proteicos, tres en *S. cerevisiae* (Bruinenberg *et al.*, 1985; van Dijken y Scheffers, 1986), que se encuentran en la membrana interna mitocondrial, como se muestra en la figura 5. La ubiquinona (Q), localizada en la membrana interna y el citocromo *c*, que se encuentra en el espacio intermembranal, son moléculas acarreadoras de electrones. Los complejos I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa) y los complejos II (succinato: ubiquinona oxidorreductasa), catalizan la transferencia de electrones a la ubiquinona (Q) a partir de donadores electrónicos diferentes, el NADH y el succinato, respectivamente. El complejo III (ubiquinol: citocromo *c* oxidorreductasa) transporta los electrones del ubiquinol al citocromo *c*. El complejo IV (citocromo *c* oxidasa), oxida al citocromo *c* y transfiere los electrones al oxígeno, el cual funciona como aceptor final de electrones en la cadena (Witting y Schägger, 2009). El transporte de electrones está acoplado a la translocación de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal por los complejos I, III y IV, lo que da lugar a una fuerza protomotriz (Δp), que consta del potencial de membrana eléctrico ($\Delta \Psi$) y del gradiente del pH (ΔpH), a través de la membrana interna mitocondrial. La Δp se utiliza para la síntesis de ATP por la F_1F_0 -ATPasa (Saraste, 1999). El $\Delta \Psi$ es necesario para el transporte iónico y el transporte de proteínas (Legros *et al.*, 2002). *S. cerevisiae* carece del complejo I, pero cuenta con dos deshidrogenasas de NADH externas (Nde1p y Ned2p) y una NADH deshidrogenasa interna (Bunoust *et al.*, 2005). La NADH deshidrogenasa interna oxida el NADH producido en la matriz mitocondrial en el ciclo de Krebs o por la alcohol deshidrogenasa mitocondrial; por esta razón, se le considera la contraparte fisiológica del complejo I (de Vries y Marres, 1987).

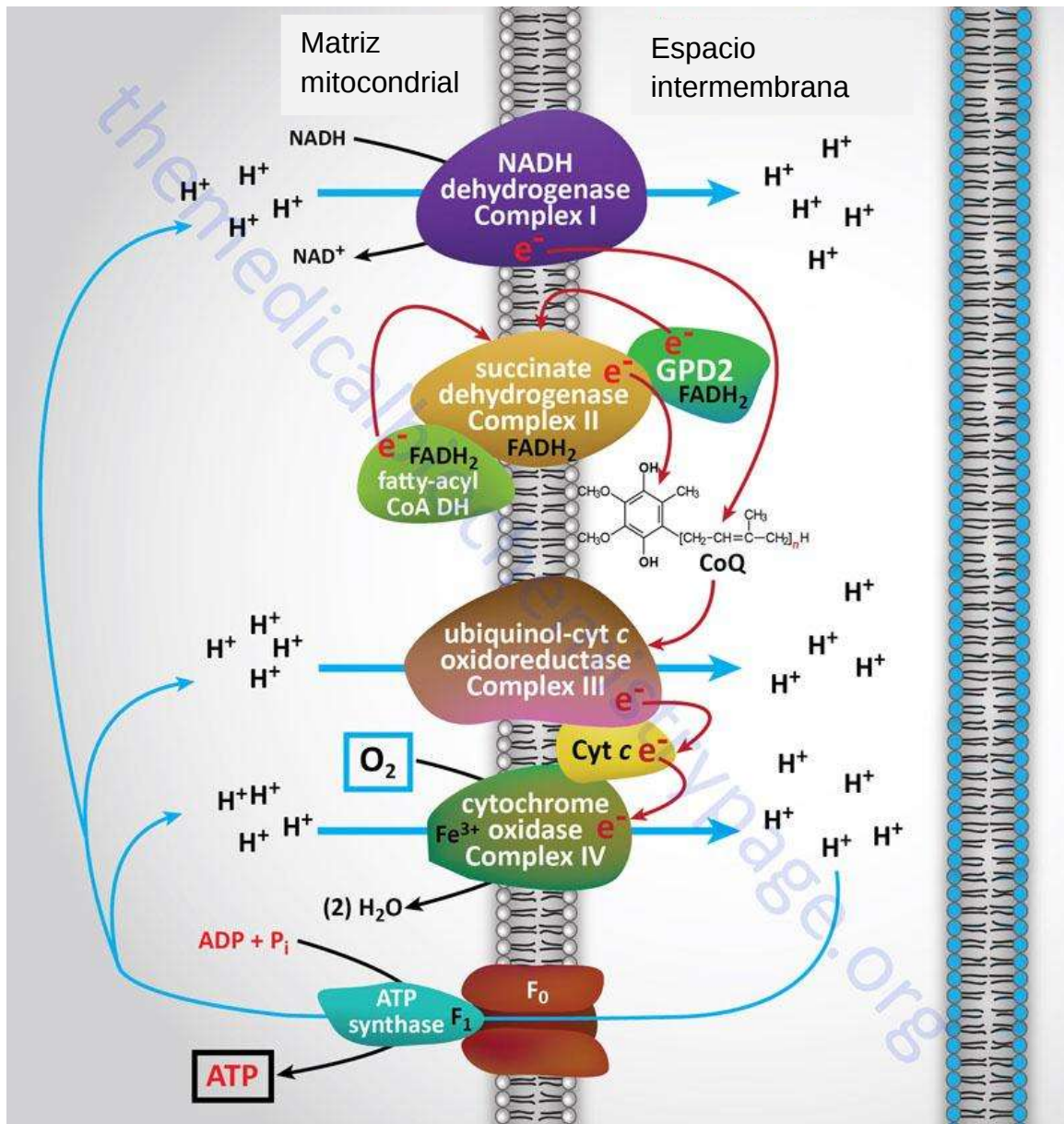


Figura 5. Relación de la CTE con la ATPasa. Flujo de electrones y bombeo de protones por los complejos de la CTE. Imagen tomada de themedicalbiochemistrypage.org, 2014.

1.10 Tipos de ATPasa e inhibidores

Las levaduras tienen 3 tipos de ATPasa: la de membrana plasmática, la mitocondrial (Schatz *et al.*, 1967) y la de la membrana vacuolar (Van Der Wilden y Matile, 1978). Las propiedades de la ATPasa de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* han sido bien documentadas (Goffeau y Slayman, 1981). La oligomicina, un inhibidor de la ATPasa mitocondrial (Serrano, 1978), presenta poco efecto sobre la ATPasa de la membrana plasmática, mientras que el ortovanadato (Willsky, 1979) y el dietilestilbestrol (Serrano, 1980), que no inhiben la ATPasa mitocondrial, son inhibidores potentes de la ATPasa de la membrana plasmática. La diciclohexilcarbodiimida (DCCD) inhibe las tres ATPasas en *S. cerevisiae*, aunque las enzimas mitocondriales y vacuolares son aproximadamente diez veces más sensibles a este inhibidor que la ATPasa de la membrana plasmática (Serrano, 1978; Okorokov *et al.*, 1982; Charles *et al.*, 1987). Las azidas afectan a la cadena respiratoria inhibiendo al grupo hemo a + a₃ de la citocromo oxidasa (complejo IV) con lo que se detienen las reacciones redox de la cadena respiratoria, se abate el potencial de membrana y cesa la producción de ATP. Rikhvanov *et al.* (2003) reportaron que azida de sodio disminuye la termotolerancia de *R. rubra* y *D. vanriji* pero no de *S. cerevisiae*. También, proporcionaron evidencia de que hay una correlación entre la actividad funcional de la mitocondria y la termotolerancia de las levaduras.

1.11 Funciones de la ATPasa de la membrana plasmática

La ATPasa de la membrana plasmática bombea protones al medio extracelular, y éstos se acoplan a la hidrólisis del ATP, consumiendo hasta un 50% del ATP total para la expulsión de protones, generando un gradiente de protones (Serrano, 1984). El gradiente electroquímico transmembranal resultante es usado para la toma activa de nutrientes (Eddy, 1982) y regula la actividad de enzimas intracelulares sensibles al pH (Serrano, 1984). Además, la ATPasa membranal mantiene el pH intracelular de *S. cerevisiae* entre 6.0 y 7.0, incluso en grandes variaciones extracelulares de pH (Malpartida y Serrano, 1981). El crecimiento de la levadura en medio ácido, resulta en un incremento en la actividad de la ATPasa

(Eraso y Gancedo, 1987), lo cual se ha visto que es debido al incremento de la actividad catalítica más que al incremento de la cantidad de la enzima (Eraso *et al.*, 1987). La enzima se ha visto que tiene una función significativa en mantener la integridad estructural de la célula, como se ha evidenciado por la morfología alterada presente en mutantes del gen que codifica para la ATPasa (McCusker *et al.*, 1987). La ATPasa es esencial para el crecimiento celular y el bombeo de protones *in vivo* (Serrano *et al.*, 1986). Se ha observado en estudios acerca de la tolerancia a la temperatura en levaduras, que una función de la ATPasa de membrana es mantener la homeostasis del pH en la resistencia al calor (Coote *et al.*, 1991; Panaretou y Piper, 1990). También se ha observado que la actividad de la ATPasa es esencial en la resistencia a la temperatura, ya que la viabilidad de levaduras expuestas a 50°C disminuye en presencia de dietilestilbestrol (DES). Además, la medición de la actividad de la ATPasa reveló que el bombeo de protones de la célula aumentó aproximadamente un 50% a temperaturas sub-letales, induciendo termotolerancia (Coote *et al.*, 1991).

2. JUSTIFICACIÓN

Las levaduras son los microorganismos más utilizados con fines industriales; durante estos procesos industriales, sufren estrés por altas temperaturas. En esta condición, se ha observado que la actividad de la ATPasa es esencial para mantener a las células viables, sin embargo, esto solo se ha estudiado en levaduras de laboratorio, las cuales se encuentran en condiciones óptimas de crecimiento, sin considerar levaduras con cambios frecuentes en su entorno, por lo que es importante analizar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la ATPasa en las levaduras OFF1, SLP1 y MC4 aisladas de hábitats extremos.

3. HIPÓTESIS

Las ATPasas de las cepas de las levaduras OFF1, SLP1 y MC4, se mantienen por más tiempo funcionales en alta temperatura que las ATPasas de la cepa de referencia W303.

4.0 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la temperatura sobre la actividad de las ATPasas en las cepas de levaduras OFF1, SLP1 y MC4 aisladas de hábitats extremos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analizar el efecto de la temperatura en la viabilidad de las levaduras OFF1, SLP1 y MC4.
- b) Analizar el efecto de la temperatura en la actividad de la ATPasa de membrana y mitocondrial de las cepas de levaduras OFF1, SLP1 y MC4.
- c) Analizar el efecto de la temperatura en la lipoperoxidación de las membranas celular y mitocondrial de las cepas de levaduras OFF1, SLP1 y MC4.

5.0 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico, adquiridos de Sigma Chemical.

5.2 Cultivo de las cepas de levadura

Las cepas utilizadas (SLP1 aislada de San Luis Potosí, OFF1 aislada de Guerrero, MC4 aislada de Oaxaca, y W303 cepa de laboratorio) fueron donadas por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Se sembró el pre-inóculo de todas las cepas en 10 ml de medio YPD 2% (extracto de levadura 10%, peptona 20% y 1ml de glucosa al 20%) con una asada de cada cepa; se dejaron crecer en agitación orbital a 150 rpm por 24 h a temperatura ambiente, posteriormente, se sembró el inóculo en medio YPD 2% (extracto de levadura 10%, peptona 20% y 3 ml de glucosa al 20%).

5.3 Cinética de crecimiento de las levaduras

Se prepararon 10 ml de un pre-cultivo de medio YPD al 2% de cada cepa y se mantuvo en agitación a 150 rpm durante 24 h. A partir del pre-inóculo se generó un cultivo en medio YPD al 2%, el cual se incubó a 30°C y 150 rpm. Posteriormente, se tomaron muestras cada 2 h (de 0 a 16 h) para su lectura en espectrofotómetro a 600 nm.

5.4 Viabilidad de las levaduras a diferentes temperaturas

Se realizaron diluciones de concentraciones conocidas de las levaduras y se inocularon en agar YPD al 2% con glucosa al 20%. Posteriormente, se mantuvieron 24 h en incubadoras con temperaturas de 30°C a 45°C, finalmente, se determinó la viabilidad por el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

5.5 Determinación del pH

Se prepararon 10 ml de un pre-inóculo de medio YPD 2% de cada cepa con 1 ml de glucosa al 20% y se mantuvo en agitación de 150 rpm durante 24 h. Posteriormente se realizó un cultivo de 30 ml de medio YPD 2% con 3 ml de

glucosa al 20%. Se dejaron en agitación 12 h las cepas MC4, OFF1 y SLP1, y la cepa W303 se dejó por 14 h. Una batería de tubos de las 4 cepas se sometieron 2 h más a 40°C y otra batería de tubos se mantuvieron a temperatura de 30°C durante esas 2 h. Se diluyeron 5 ml de la solución de levaduras con 40 ml de agua destilada, se midió el pH cada 3 min durante 9 min y se le adicionó 5 ml glucosa al 10%, se agitó, finalmente, se midió el pH cada 5 min durante 45 min. Al experimento con NaN₃, se le adicionó a la solución de levaduras 5mM de NaN₃ y se procedió con la misma metodología antes mencionada (Peña, 1975).

5.6 Efecto de la azida de sodio en la viabilidad y termotolerancia de las levaduras

Se prepararon 10 ml de un pre-inóculo de medio YPD 2% de cada cepa y se mantuvo en agitación a 150 rpm durante 24 h. Posteriormente, se realizó un cultivo en el mismo medio con un volumen de 30 ml. Se mantuvieron en agitación 12 h las cepas OFF1, SLP1, MC4 y la cepa W303 durante 14 h. Se tomó 1 ml del inóculo en un tubo y se le adicionó 1 ml de una solución de NaN₃ para llevar a una concentración final de 0.15mM, posteriormente, se le determinó la viabilidad mediante el método de MTT (3(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio), añadiendo 150 µl de MTT (5 mg/ml) a los tiempos: 0, 30, 60, 90 y 120 min durante exposición a 40°C. Transcurrido el tiempo se les adicionó 1.5 ml de HCl (0.04M en propanol). Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 3 min, finalmente, se midió su densidad óptica en un espectrofotómetro a 570 nm.

5.7 Aislamiento de las mitocondrias de las levaduras

Para el aislamiento de las mitocondrias, primeramente se obtuvieron los esferoplastos, creciendo las células hasta la fase exponencial tardía. Una serie de cepas se dejaron crecer 2 h más a 30°C y otra serie se expuso a 40°C durante 2 h. Mediante centrifugación se lavaron las células con 5 ml de agua destilada a 3000 rpm. Posteriormente, se obtuvo el peso seco de las levaduras. Se

resuspendieron en medio SH (tris básico 0.1M, β -mercaptoetanol 0.5M, pH de 9.3 con NaOH). Se incubaron durante 15 min a 30°C y se lavaron las células 2 veces a 5000 rpm por 5 min con medio de lavado (KCl 0.5M, tris ácido 10mM, pH de 7 con HCl). Posteriormente, se resuspendieron las células en medio de digestión (sorbitol 1.35M, EGTA 1mM, fosfato disódico 30mM, fosfato monosódico 30mM), el volumen del medio de digestión fue de 10 ml por g de levaduras. Para el rompimiento de la pared celular se agregó la enzima zimoliasa 20T a razón de 10 mg por cada g de peso seco. Después de incubadas durante 1 h, se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min. Se lavaron los esferoplastos 3 veces (12000 rpm por 5 min) con buffer de lavado de protoplastos (sorbitol 0.75M, manitol 0.4M, tris maléico 10mM, albúmina sérica de bovino, 0.2%, pH de 6.8) y se resuspendieron en 5 ml de buffer para esferoplastos (sorbitol 1M, NaCl 1.7mM, MgSO₄ 2mM, KH₂PO₄ 10mM, EGTA 0.5mM, albúmina sérica bovina 0.1%, pH 6.8). Se centrifugaron los esferoplastos a 12000 rpm por 10 min. Posteriormente, se lavó 3 veces con medio de protoplastos, centrifugando a 12000 rpm por 10 min en cada lavado. Cada resuspensión se realizó con varilla de teflón. Los esferoplastos se rompieron mecánicamente. Se desechó el sobrenadante del último lavado y se resuspendió el precipitado en un vaso de Potter con 30 ml del medio de homogenización (manitol 0.6M, tris maléico 10mM, EGTA 2mM, albúmina sérica de bovino 0.2%, pH 6.8), por cada 2.5 g de peso seco de levaduras. Se homogenizó manualmente 20 veces con un vástago de teflón apretado, evitando hacer espuma. El homogenizado se centrifugó a 2500 rpm por 10 min. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. El precipitado se resuspendió en medio de recuperación de mitocondrias (manitol 0.6M, tris maléico 10mM, EGTA 2mM, pH 6.8), se homogenizó en un homogenizador de vidrio con vástago flojo, se centrifugó a 2500 rpm, se descartó la pastilla y el sobrenadante fue centrifugado a 12000 rpm (Guérin *et al.*, 1979).

El precipitado obtenido fueron las mitocondrias aisladas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron inmediatamente a -80°C . La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método de Biuret utilizando como estándar albumina de bovina sérica (Gornall *et al.*, 1949).

5.8 Determinación de la concentración de fosforo inorgánico (Pi)

Se utilizó una concentración de proteína mitocondrial de 0.3mg/ml en medio de reacción (tris ácido 20mM, MgCl 5mM, pH 8.5), se añadió 2mM de ATP y se incubó durante 30 min para estimular la actividad de la ATPasa. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 30% y dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% para tener un volumen final de 2 ml. Posteriormente, se determinó la concentración de fosfato inorgánico (Pi) por el método de Fiske y Subbarow (1925). El fundamento para su determinación se basó en la adición de ATP, lo que estimuló su actividad al hidrolizar el ATP en ADP + Pi (actividad inversa de la función principal de la ATPasa). El Pi producido reaccionó con el molibdato de amonio y generó un complejo llamado ácido heteropolifosfomolibdico de color amarillo, que es reducido por la solución de ELON, al formarse un complejo llamado azul de heteropolimolibdeno, el cuál es detectado a 660 nm. Se usó un blanco que contenía todos los reactivos excepto la proteína mitocondrial. Como control negativo se incubaron las mitocondrias con 0.05 mg/ml de oligomicina (inhibidor de la ATPasa), para restar el valor obtenido a los tratamientos para descartar el Pi proveniente de otras fuentes.

5.9 Lipoperoxidación celular y mitocondrial

Para la lipoperoxidación celular se utilizaron 50 mg de peso seco de levaduras y para la lipoperoxidación mitocondrial se requirió de una concentración de 0.3 mg/ml, determinada mediante el método de Biuret. Los niveles de lipoperoxidación fueron determinados mediante una modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) reportada por Buege y Aust (1978). Al término de la exposición

a la temperatura, se agregó a cada muestra 2 ml de una solución ácida compuesta por ácido tricloroacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25N. Posteriormente, las muestras se calentaron en un baño María hirviendo y a los 15 min fueron enfriadas en hielo y centrifugadas a 2744 rpm durante 5 min. Por último, se extrajo el sobrenadante y se leyó su absorbancia a 535 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18. Los resultados fueron expresados como nmoles de sustancias reactivas al TBA (TBARS) producidas por mg de proteína y fueron calculados en base al coeficiente de extinción molar (ϵ) de malondialdehído de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

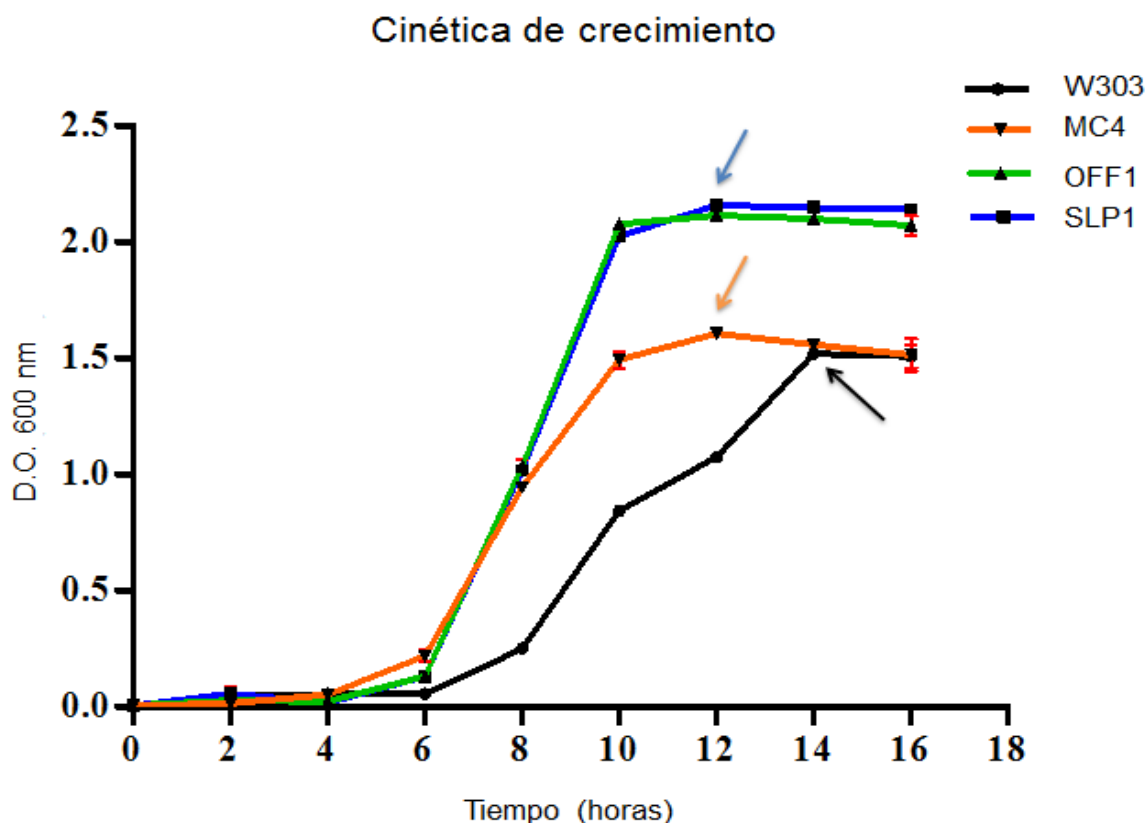
5.10 Procesamiento estadístico

Los resultados se expresaron como el error estándar y la desviación estándar de al menos 3 experimentos. Los niveles de significancia ($p < 0.001$, $p < 0.01$ y $p < 0.05$), se determinaron mediante la prueba *t*-Student con el programa Graph Pad Prism versión 5.00.

6.0 RESULTADOS

6.1 Cinética de crecimiento

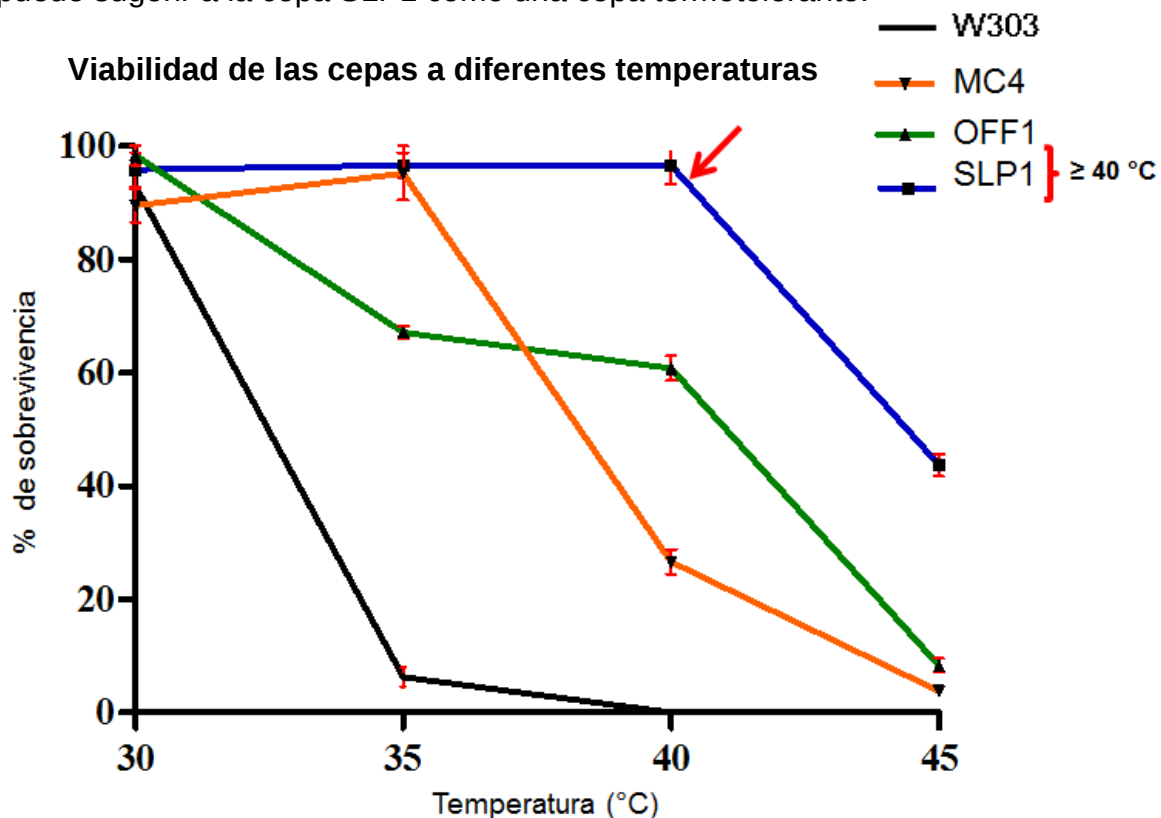
Con el objetivo de saber a qué tiempo las levaduras alcanzan el punto final de la fase logarítmica tardía (punto de inicio de la fase estacionaria), se realizó una cinética de crecimiento en la que se observó que las cepas OFF1, SLP1 y MC4, alcanzan a las 12 h el inicio de la fase estacionaria, mientras que la cepa W303 alcanza dicha fase en 14 h como se muestra en la gráfica 6.



Gráfica 6. Cinética de crecimiento de las diferentes cepas de levaduras. Las muestras se tomaron cada 2 h hasta 16 h. Resultados con desviación estándar (D.E.) de 3 experimentos independientes.

6.2 Viabilidad de las levaduras a diferentes temperaturas

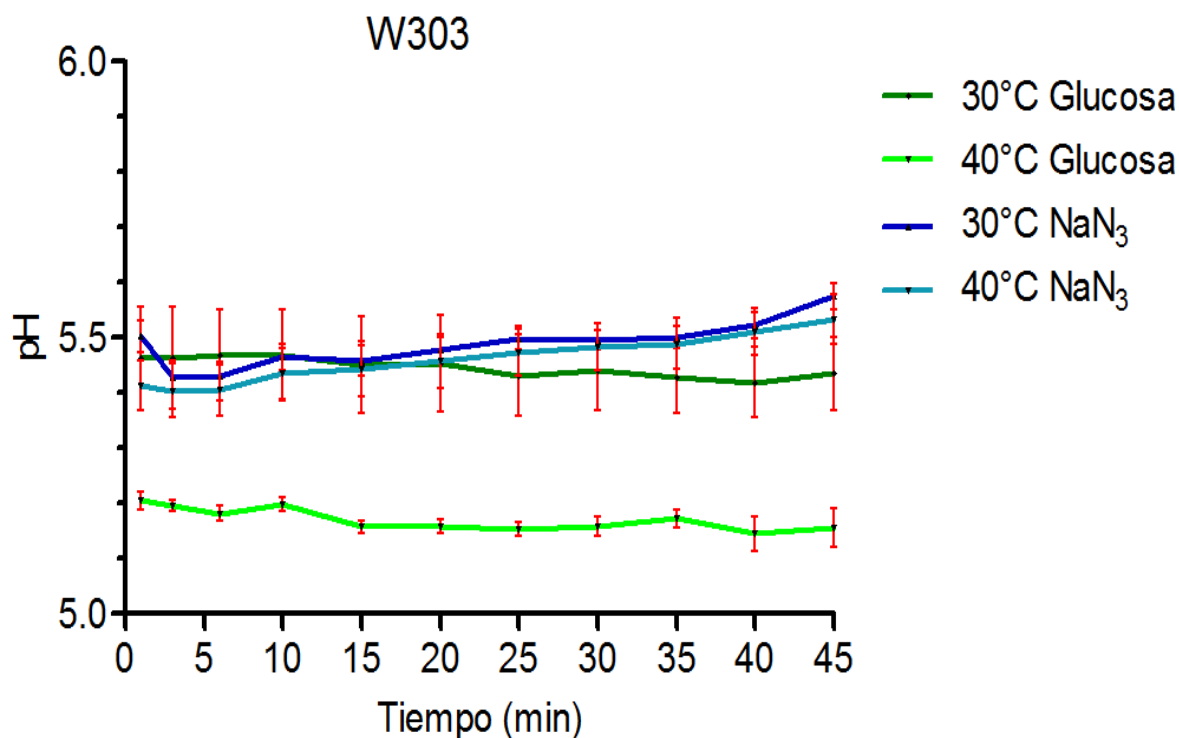
Con el propósito de conocer la tolerancia a la temperatura de las cepas aisladas se realizaron experimentos de viabilidad, determinando el porcentaje de sobrevivencia de cada una de las cepas a temperaturas de 30°C a 45°C. En la gráfica 7 se observa una relación inversa entre el aumento de la temperatura y la sobrevivencia para las cepas W303, MC4 y OFF1, mientras que la cepa SLP1 mantiene su sobrevivencia del 100% hasta una temperatura de 40°C, y disminuye un 50% su sobrevivencia al ser expuesta a 45°C. De acuerdo a este resultado, se puede sugerir a la cepa SLP1 como una cepa termotolerante.



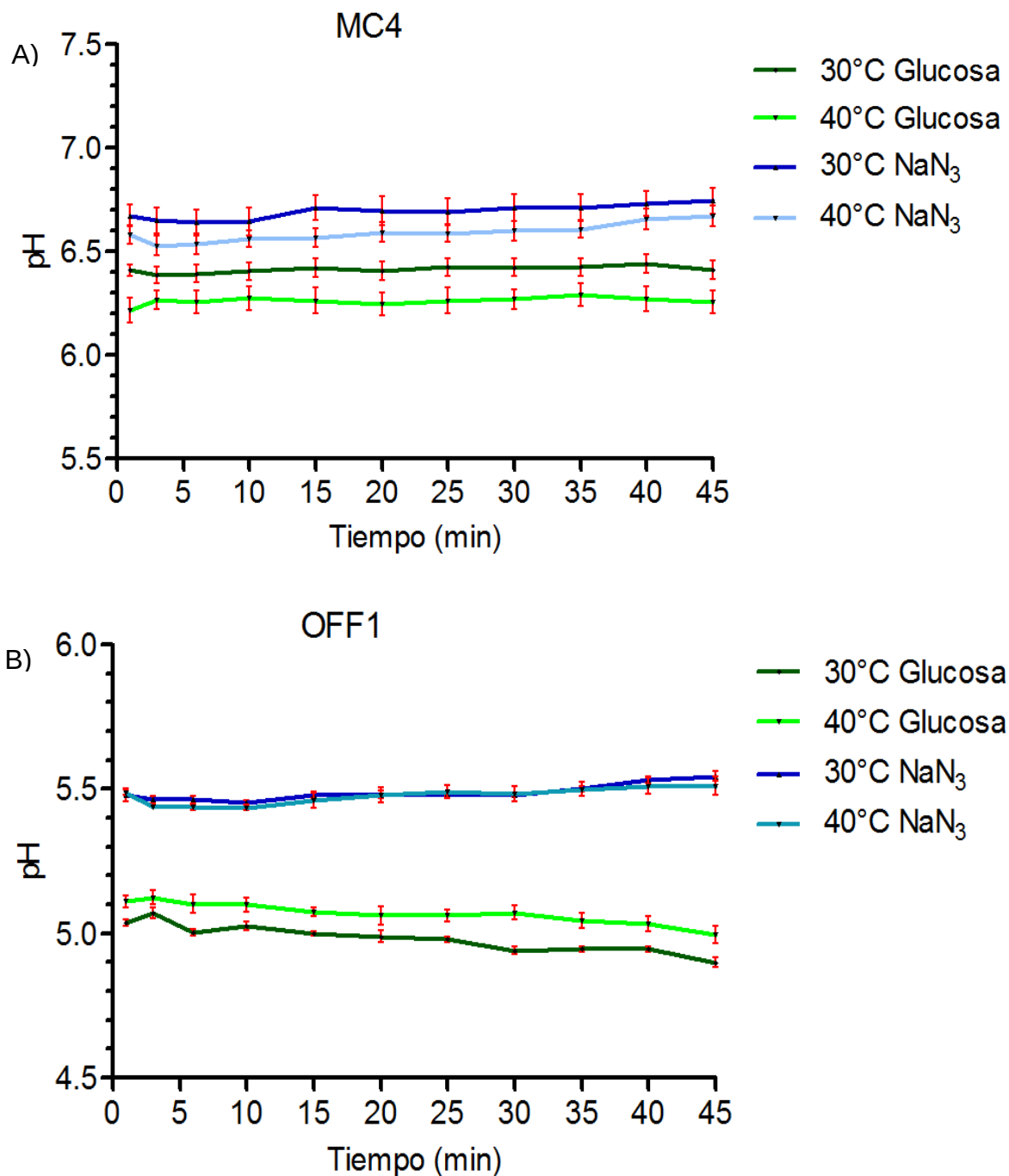
Gráfica 7. Sembrado de 10 μL de la dilución 1×10^{-6} en medio sólido (YPD 2%), e incubadas 24 h a temperaturas de 30°C a 45°C. Resultados con D.E. de 3 experimentos independientes.

6.3 Determinación del pH con y sin NaN_3

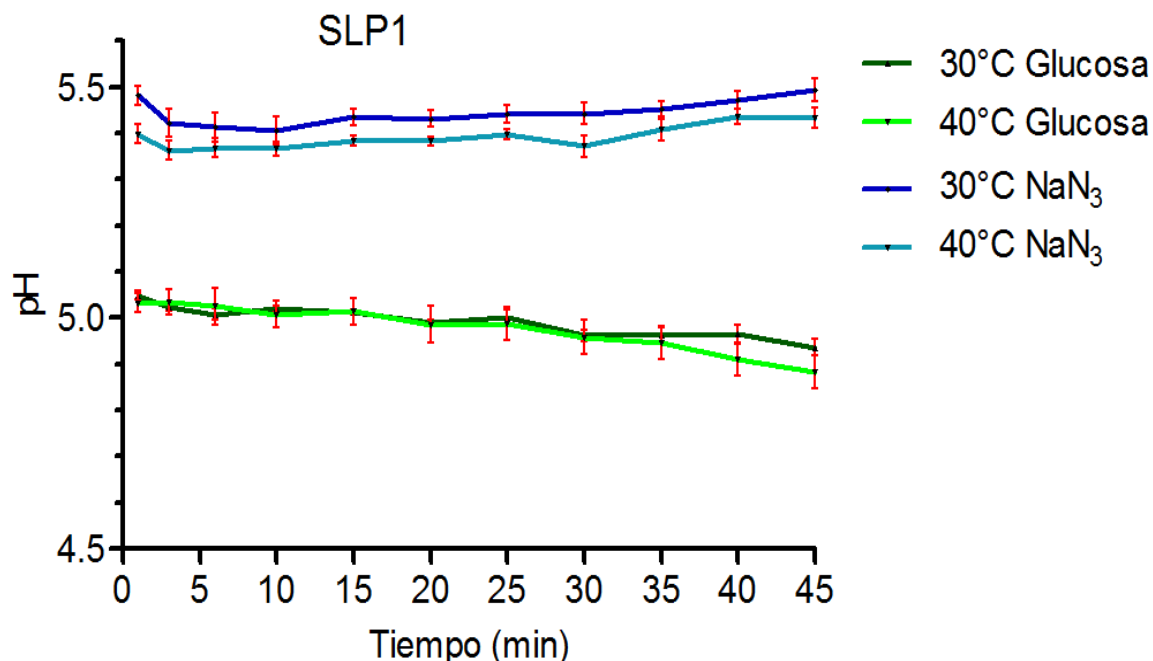
Las levaduras tienen en su membrana plasmática una ATPasa de H^+ que se acopla a la hidrólisis de ATP con el bombeo de protones al espacio extracelular, por lo que la evaluación del pH se considera una determinación indirecta de la actividad de la ATPasa de la membrana celular. La azida de sodio (NaN_3) es un inhibidor del complejo IV de la CTE y también de la ATPasa de membrana plasmática.



Gráfica 8. Comparación del pH entre las soluciones de levadura W303 sometida a 30 y 40°C con y sin NaN_3 .



Gráfica 9. Comparación del pH entre las soluciones de levaduras MC4 (A) y OFF1 (B) sometidas a 30 y 40°C con y sin NaN₃.

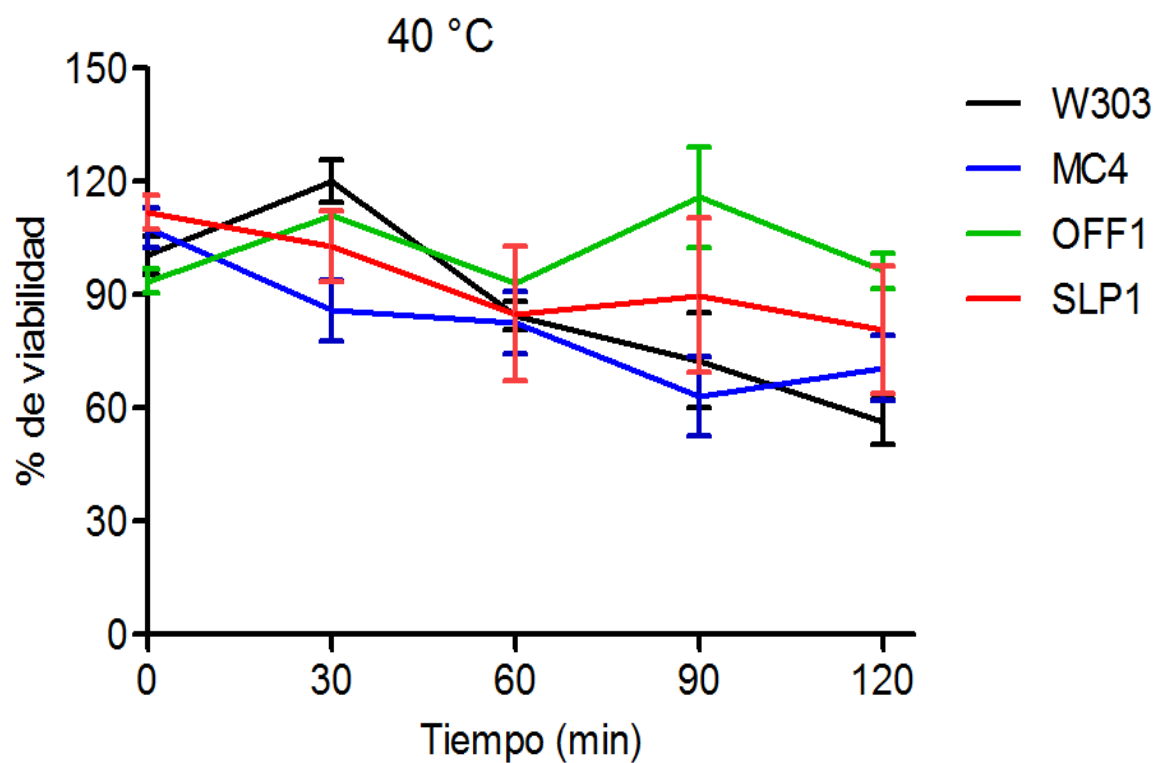


Gráfica 10. Comparación del pH entre las soluciones de levadura SLP1 sometida a 30 y 40°C con y sin NaN₃.

Como se observa en las figuras 8-10, la temperatura aumenta la actividad de la ATPasa de membrana, al bombear más protones al medio extracelular y acidificar el medio. En las cepas con glucosa se observa una clara diferencia de pH puesto que están más ácidas las soluciones, debido al bombeo sostenido de protones por parte de la ATPasa, en comparación con las que tienen el inhibidor. En las cepas con el inhibidor NaN₃, se observa que el medio está menos ácido, debido a que el inhibidor impide el transporte de electrones y no hay bombeo de protones por parte de la ATPasa de membrana plasmática. Con la NaN₃, el pH se mantiene al transcurrir el tiempo. La ATPasa de la cepa SLP1 sigue trabajando normal y no hay diferencias significativas entre las cepas incubadas a 30 y 40°C, en las 2 condiciones (con inhibidor y con glucosa), por su característica de termotolerante.

6.4 Efecto de la azida de sodio en la viabilidad y termotolerancia de las levaduras

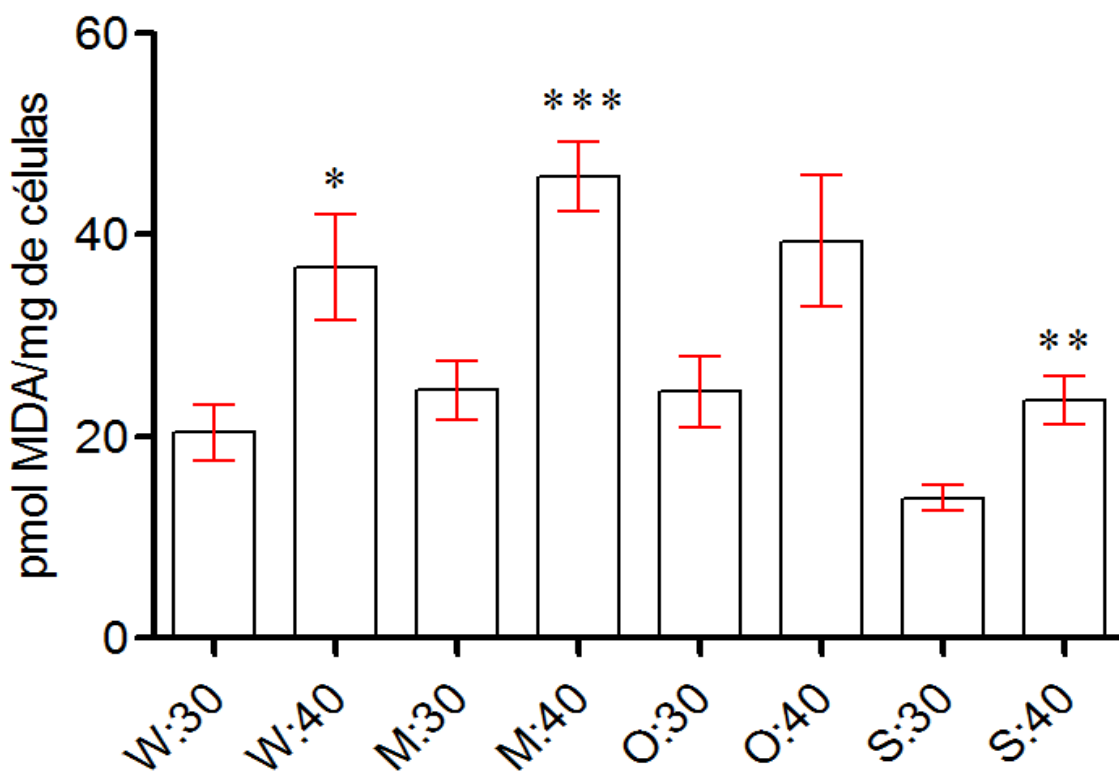
La azida de sodio (NaN_3) es un inhibidor de la ATPasa que es una enzima necesaria para el mantenimiento de la viabilidad de las levaduras en altas temperaturas, por lo que se espera que en presencia de este inhibidor se reduzca la viabilidad de las levaduras cuando son expuestas a 40°C . Por lo anterior, se evaluó la viabilidad de las levaduras mediante el método MTT que se fundamenta en la reducción del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) a cristales de formazan, esto mediante la enzima succinato deshidrogenasa que se encuentra en las células viables. Como 100% de viabilidad, se tomaron las levaduras en presencia del inhibidor (NaN_3) a 30°C . Las determinaciones se realizaron hasta por 2 h y se evaluó la viabilidad cada 30 min. En la gráfica 11 se observa una tendencia en la reducción de la viabilidad de las cepas de las levaduras cuando son expuestas a 40°C , conforme transcurre el tiempo de incubación, lo que sugiere que, efectivamente, la actividad de la ATPasa es necesaria para la resistencia a la temperatura. La cepa MC4 fue la que presentó menor porcentaje de viabilidad en presencia de la temperatura y NaN_3 , ya que se observó que a los 30 min las células perdieron viabilidad y que al cabo de 120 min, se nota un descenso de hasta el 50% de su viabilidad.



Gráfica 11. Efecto de la NaN_3 en la viabilidad de las cepas de levaduras.

6.5 Lipoperoxidación celular

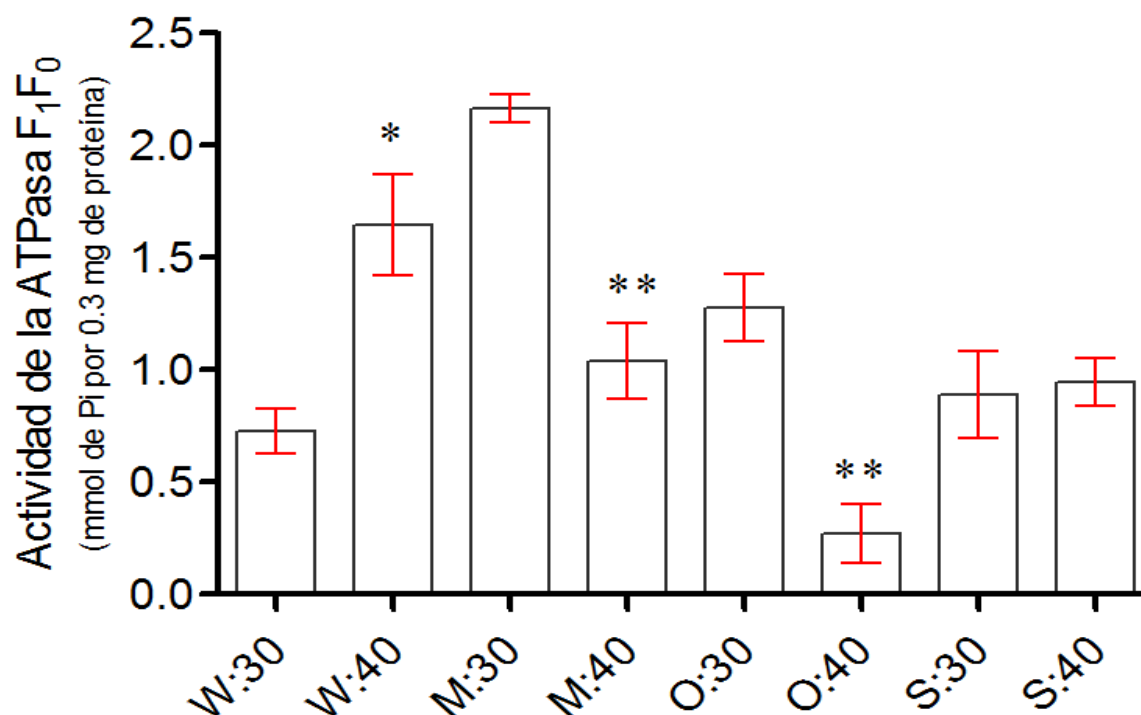
Con el objetivo de observar si existe una relación entre el estado de la actividad de la ATPasa y el estado de la membrana celular, que es donde se localiza esta enzima, se evaluó el grado de lipoperoxidación de los ácidos grasos presentes. La temperatura de 40°C aumentó el grado de lipoperoxidación celular en las cepas W303, MC4, y SLP1, con respecto a las que se mantuvieron a 30°C, ya que se observó una diferencia significativa entre las temperaturas. Lo que no ocurre en la cepa OFF1, que no presentó diferencias significativas al someterla a 40°C.



Gráfica 12. Comparación de lipoperoxidación celular entre cada cepa ((W303 (W), MC4 (M), OFF1 (O) y SLP1 (S)) crecidas a 30°C (30) y 40°C (40) durante 2 h. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística t-Student (*p<0.02, **p<0.003, *p<0.001). Resultados con D.E. de 3 experimentos independientes.**

6.6 Determinación de la concentración de fosfato inorgánico

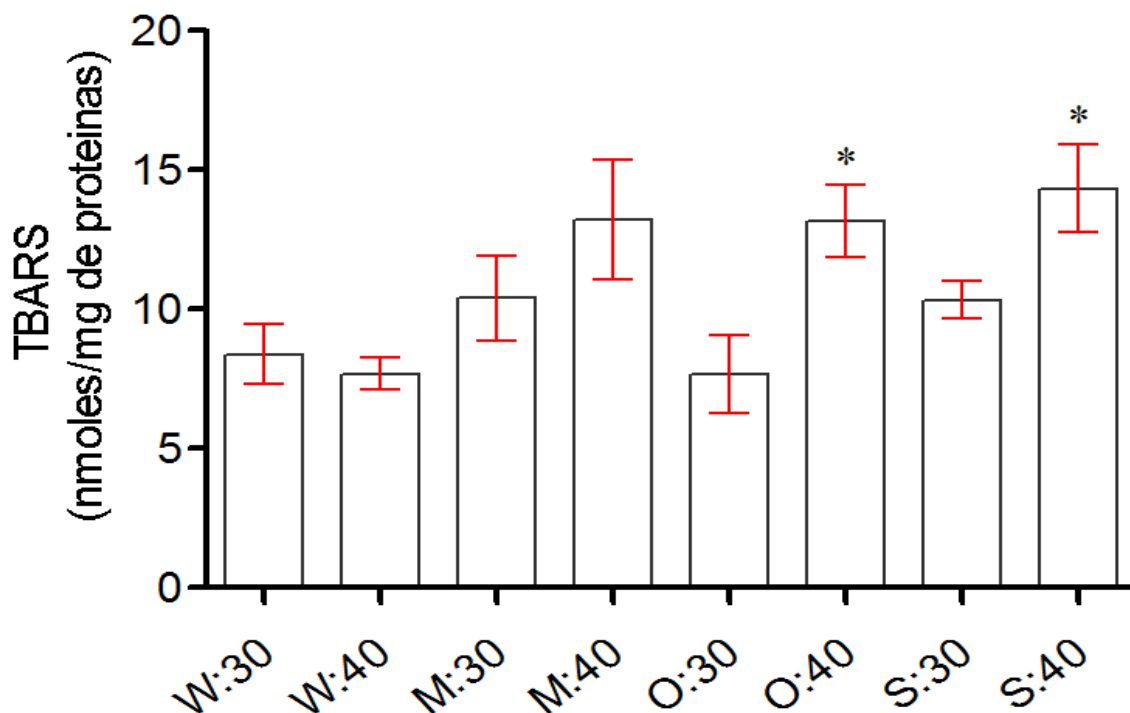
La concentración de Pi se determinó mediante la adición de ATP para estimular la hidrólisis del ATP por la ATPasa, lo que da como productos al ADP y Pi, este último es el que se cuantifica por el método de Fiske y Subbarrow (1925). En la gráfica 13 se observa que no existe un patrón general en la actividad de la ATPasa mitocondrial, ya que la cepa W303 presenta una mayor actividad cuando es expuesta a 40°C, mientras que las cepas MC4 y OFF1 disminuyen la actividad de esta enzima cuando se someten a 40°C. La concentración de Pi en la cepa SLP1 se mantuvo sin cambios significativos, cuando la cepa se expuso a 30 y 40°C.



Gráfica 13. Comparación de la actividad de la ATPasa en la producción de Pi entre cada cepa ((W303 (W), MC4 (M), OFF1 (O) y SLP1 (S)) crecidas a 30°C (30) y 40°C (40) durante 2 h. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística t-Student (* $p < 0.0205$ y ** $p < 0.0032$). Resultados de la media $\pm$ error estandar (S.E.M.) de 3 experimentos independientes. Método: Fiske y Subbarrow, 1925.

6.7 Lipoperoxidación mitocondrial

Los cambios en la actividad de la ATPasa mitocondrial podrían ser resultado del grado de lipoperoxidación de las membranas mitocondriales, debido a que allí se encuentra esta enzima. Por lo anterior, se determinó el grado de lipoperoxidación de las membranas mitocondriales. En la gráfica 14 se observa el grado de lipoperoxidación en las membranas de mitocondrias aisladas de levaduras mantenidas a 30°C y las levaduras expuestas durante 2 h a 40°C. Se observa que el grado de lipoperoxidación mitocondrial en las cepas W303 y MC4 se mantuvo sin cambios cuando fueron expuestas a 40°C, con respecto al grado de lipoperoxidación en 30°C, no así para las cepas OFF1 y SLP1, que al ser expuestas a 40°C hay un aumento en el grado de lipoperoxidación mitocondrial.



Gráfica 14. Comparación de lipoperoxidación mitocondrial entre cada cepa ((W303 (W), MC4 (M), OFF1 (O) y SLP1 (S)) crecidas a 30°C (30) y 40°C (40) durante 2 h. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística t-Student (* $p < 0.02$). Resultados con D.E. de 3 experimentos independientes. Método del ácido tiobarbitúrico por Buege y Aust, 1978.

7. Discusión

Las condiciones ambientales a las que se encuentran expuestas las levaduras en estado libre, como las cepas MC4, OFF1 y SLP1, experimentan cambios constantemente, como una disminución en la disponibilidad de nutrientes, incremento en la temperatura o presencia de contaminantes. Independientemente de su naturaleza, los cambios repentinos son un agente de estrés para las levaduras, estrés al que deben adaptarse para sobrevivir. Este tipo de estrés es frecuentemente asociado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Avery, 2011), fenómeno que ocurre de igual manera cuando las levaduras son expuestas a estrés térmico. Este hecho puede generar diferencias fisiológicas que se ven reflejadas en el mantenimiento de la actividad de la ATPasa en condiciones de estrés térmico en las levaduras analizadas. Bravim *et al.* (2010), reportaron diferencias fundamentales entre la resistencia a agentes estresantes en levaduras en función de su sitio de origen, ya sea industrial o de laboratorio. Garay-Arroyo *et al.* (2004), reportaron que cepas de levaduras industriales mostraron una mayor sobrevivencia cuando fueron comparadas con levaduras de laboratorio al ser expuestas a agentes oxidantes y a choque térmico. Ellos propusieron que los constantes cambios en las condiciones ambientales a los cuales se encuentran expuestas las levaduras industriales, podrían ser los generadores del incremento en la resistencia a los agentes estresantes.

Con el objetivo de utilizar las levaduras en una misma fase del ciclo celular, mediante una cinética de crecimiento, que se analizó por densidad óptica, como se muestra en la gráfica 6; se determinó el tiempo necesario para que las levaduras alcanzaran la fase estacionaria, fase en la que las levaduras sufren el cambio diaúxico, al cambiar su metabolismo de fermentativo a oxidativo. En la gráfica 6 se observó que las cepas OFF1, SLP1 y MC4 alcanzan esta fase a las 12 h de haber sido inoculadas, mientras que la cepa W303 alcanza dicha fase a las 14 h. Para los experimentos posteriores, se utilizaron las levaduras con los tiempos de crecimiento anteriormente mencionados.

Mediante la técnica de medición de unidades formadoras de colonias (UFC), se determinó la sobrevivencia de las levaduras a temperaturas de 30 a 45°C, lo anterior para conocer el grado de tolerancia a la temperatura de las levaduras analizadas. En la gráfica 7, se observó una disminución de la viabilidad conforme aumenta la temperatura de 30 a 40°C para las cepas W303, MC4 y OFF1, no así para la cepa SLP1. La cepa más sensible a la temperatura fue la de referencia W303, ya que a 40°C no presentó viabilidad, mientras que las cepas MC4 y OFF1 presentaron una sobrevivencia de alrededor del 30 y 60%, respectivamente. La cepa SLP1 mantuvo una viabilidad del 100%, aún a 40°C y se observó de esta manera, que es la levadura con mayor tolerancia a la temperatura. Slapack *et al.* (1987), definen a las levaduras termotolerantes como aquellas capaces de crecer a temperaturas $\geq 40^{\circ}\text{C}$, mientras que McCracken y Gong (1982), las definen como levaduras con una temperatura de crecimiento máxima de 37 a 45°C. Con estos antecedentes, es que se puede considerar a la levadura SLP1 como una levadura termotolerante. Como se observa en la gráfica 7, la sensibilidad de las cepas a la temperatura varía de acuerdo a cada cepa, lo que podría influir en la actividad de la ATPasa membranal, la mitocondrial, o ambas. Durante la exposición a choque térmico, las levaduras generan una respuesta adaptativa, dentro de las cuales se ha observado un incremento en la actividad de la ATPasa para mantener el pH celular (Morano *et al.*, 1999).

La ATPasa presenta una función vital al mantener el pH a través de la membrana plasmática, siendo ácido en el exterior. Este gradiente de protones es utilizado para el transporte de iones y nutrientes. La ATPasa membranal se regula por una variedad de factores como el pH (Riemersma y Alsbach, 1974), contenido de glucosa y ATP (Serrano, 1980). La ATPasa es el componente mayoritario de proteínas en la membrana plasmática y constituye alrededor del 20% del total de las proteínas de membrana. También, se ha observado que la actividad de esta enzima es esencial para el crecimiento y flujo de protones en células *in vivo*, debido a que la generación de mutaciones nulas para la ATPasa en células haploides es letal (Serrano *et al.*, 1986). Esta enzima tiene un pH óptimo relativamente bajo de 5.5 a 6.5 (Willsky, 1979; Borst-Pauwels y Peters, 1981),

requerimientos de Mg^{2+} (Willsky, 1979) y una alta especificidad por su sustrato (Serrano, 1978; Peters y Borst-Pauwels, 1979). La actividad de la ATPasa membranal se determinó mediante la valoración del pH del medio, al adicionar como sustrato glucosa. La determinación del pH es un método indirecto para valorar su actividad, debido a que cuando la enzima está activa, exporta protones al medio extracelular y lo acidifica (figura 15). La ATPasa de membrana plasmática es activada cuando las células de *S. cerevisiae* son incubadas con glucosa, y se incrementa su actividad hasta 4 veces (Passos *et al.*, 1992). Se ha observado que las levaduras mantienen su pH intracelular cercano a la neutralidad (Holyoak *et al.*, 1996), para la actividad óptima de procesos metabólicos críticos (Busa y Nuccitelli, 1984). Las cepas W303 y MC4 presentan un pH más ácido cuando fueron expuestas a los 40°C, lo que indica que la ATPasa está más activa, ya que acidificó el medio. Ya se ha reportado que en condiciones de estrés, las levaduras pueden acelerar su metabolismo hasta cierto grado, esto, con el objetivo de generar una respuesta ante dicho efecto. Después de acelerar su metabolismo, si no es suficiente la respuesta para mantener la homeostasis celular, las células mueren, lo que en los experimentos se observaría como una disminución en la viabilidad. Este efecto podría explicar lo que se observó para las cepas W303 y MC4 (Gráfica 7). Cuando la temperatura aumenta, se genera una fuga de protones a través de la membrana plasmática y se incrementa la actividad de la ATPasa con la finalidad de mantener el pH (Coote *et al.*, 1994). Se ha sugerido que ligeras variaciones en el pH son suficientes para regular importantes procesos celulares como el ciclo celular (Anand y Prasad, 1989) y la tasa de síntesis de ADN y ARN (Madshus, 1988). El pH del medio de la cepa OFF1 es ligeramente menos ácido cuando fue expuesta a 40°C, lo que contrastó con el fenómeno observado para las cepas W303 y MC4. Sin embargo, como se observó en la gráfica 7, la cepa OFF1 a 40°C, presentó una sobrevivencia mayor al 60%, por lo que es posible que el grado de estrés que experimentó esta cepa a 40°C no fue como el que experimentaron las cepas W303 y MC4 que causó su muerte. Para la cepa OFF1, se puede sugerir que los 40°C si representan un grado de estrés para alterar la homeostasis celular y por ende, el intercambio de iones, de esta manera, se alteró

el pH, sin embargo, la alteración fisiológica no afectó a las cepas W303 y MC4. Se ha sugerido que la inactivación mediante temperatura de la ATPasa puede ser debido a una pérdida de su estructura tridimensional (Waters *et al.*, 1998). Para la cepa SLP1, la cual presentó una viabilidad del 100% a los 40°C, no se observó diferencia en la actividad de su ATPasa membranal, lo que refleja que sí existe una relación en la actividad de la ATPasa membranal y la tolerancia a la temperatura. Se ha sugerido que el mantenimiento del pH es un mecanismo para incrementar tolerancia a la temperatura, sin embargo, el mantenimiento de la homeostasis del pH puede ser energéticamente de alto costo (Eraso y Gancedo, 1987; Serrano, 1984; Serrano, 1988), lo que resulta en un consumo de entre el 40 y 60% del total del ATP celular (Serrano, 1991).

La ATPasa mitocondrial que se encuentra en la membrana interna mitocondrial es la principal generadora de ATP, lo cual se ha observado que es importante en condiciones de estrés de las levaduras, ya que en función de su concentración se puede inducir una respuesta de adaptación al estrés o se puede inducir el paro del ciclo celular. La pérdida de sensibilidad a la oligomicina ha sido utilizada como un criterio de diferenciación entre la ATPasa membranal y la mitocondrial (Nurminen *et al.*, 1976). Otra diferencia entre la ATPasa membranal y la mitocondrial es el pH óptimo, ya que para la primera es de 8.5, mientras que para la mitocondrial es 5.6.

La liberación de protones por daños estructurales en las membranas, genera una acidificación del citoplasma, lo que inhibe funciones metabólicas esenciales (Krebs *et al.*, 1983), como la inhibición de la glucólisis (Pearce *et al.*, 2001) y la reducción de la capacidad de generación de ATP. Adicionalmente, la activación celular para contrarrestar la acidificación requiere de ATP (Piper *et al.*, 1998; Holyoak *et al.*, 1999) (figura 15).

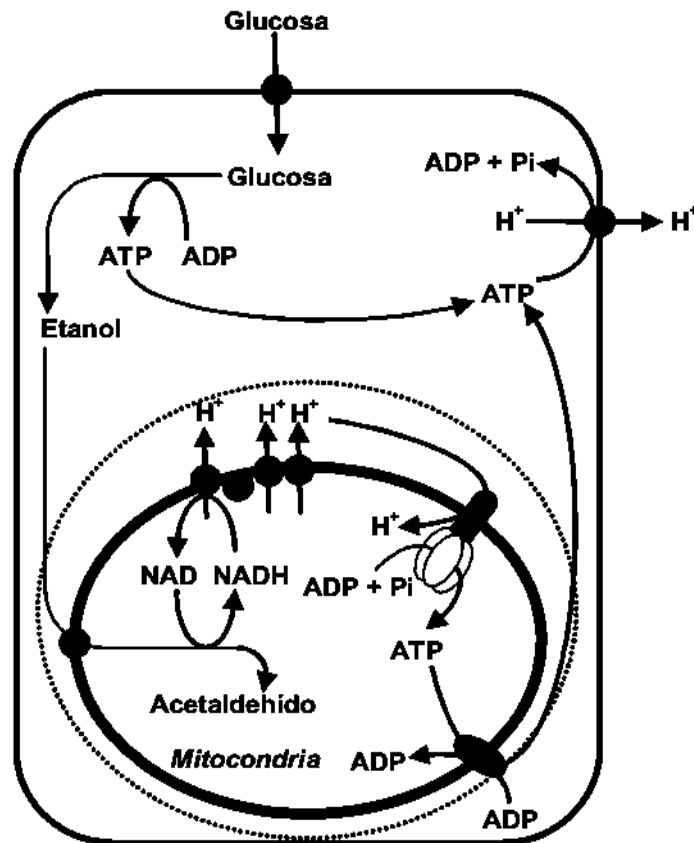


Figura 15. Metabolismo de la glucosa, síntesis e hidrólisis de ATP por las ATPasas, bombeo de protones al medio extracelular. Imagen tomada del manual de prácticas de bioquímica de la UNAM, página 59.

Por lo anterior, se decidió evaluar la actividad de la ATPasa mitocondrial. La actividad de dicha enzima se evaluó en mitocondrias previamente aisladas de las cepas W303, MC4, OFF1 y SLP1. Su aislamiento se realizó de acuerdo al protocolo mencionado en materiales y métodos. En la gráfica 13 se observó la actividad de la ATPasa mitocondrial, la cual varió de acuerdo a las cepas cuando fueron expuestas a 40°C, también se observó que la cepa W303 aumentó la actividad de la enzima a 40°C. Esta cepa fue la que presentó mayor sensibilidad a la temperatura (gráfica 7). De tal manera, que se puede correlacionar el aumento en la actividad de la ATPasa con el grado de lipoperoxidación de las membranas mitocondriales, ya que se mantuvo sin cambios significativos cuando se creció a 30 y 40°C (gráfica 14). La cepa MC4 a 30°C, presentó una mayor actividad de la

ATPasa mitocondrial, con respecto a las otras cepas de levaduras evaluadas, sin embargo, al igual que la cepa OFF1, al exponerla a 40°C, la actividad de esta enzima se redujo significativamente. La severa disminución en la actividad de la ATPasa de la cepa OFF1, se puede correlacionar con el aumento en el grado de lipoperoxidación (gráfica14), lo cual podría haber alterado el entorno membranar de la enzima y disminuir de esta manera su actividad. La actividad de la ATPasa mitocondrial en la cepa SLP1, al igual que la actividad de la ATPasa membranar, se mantuvo sin cambios cuando se creció la cepa a 30 y 40°C. La actividad de esta enzima en la cepa SLP1 parece ser independiente del grado de lipoperoxidación mitocondrial, ya que como se observó en la gráfica 14, al aumentar la temperatura de 30 a 40°C, se generó una mayor lipoperoxidación.

Para conocer si el efecto de la temperatura estaba relacionado directamente con la actividad de las ATPasas, se evaluó la viabilidad de las levaduras expuestas a un inhibidor en condiciones normales de temperatura (30°C) y expuestas a 40°C. En la gráfica 11, se observaron diferencias en la viabilidad de las cepas W303, MC4 y SLP1, con respecto al tiempo cero, lo que indica que conforme aumentó el tiempo de exposición a la temperatura, existe un daño en las células y se reduce su viabilidad, siendo generado este daño por la temperatura y no por la azida de sodio (NaN_3), ya que como 100% de viabilidad, se tomaron las células con NaN_3 a 30°C. El efecto del inhibidor de la ATPasa en la tolerancia a la temperatura se observó más en la cepa SLP1, ya que esta cepa como se observó en la gráfica 7 de viabilidad, no presentó una disminución en su viabilidad cuando se expuso a 40°C, sin embargo, en presencia del inhibidor, si se observó una disminución en la sobrevivencia. En la cepa OFF1 no se observó un efecto en la viabilidad, por lo que es posible que se requiera un mayor tiempo de exposición a la temperatura. Ya se han reportado diferencias fisiológicas entre cepas, aún del mismo género y especie, efecto que podría explicar lo observado en la cepa OFF1, con respecto a la SLP1, cepas del mismo género y especie, sin embargo, de diferente sitio de obtención, porque la cepa OFF1 fue de Guerrero y la cepa SLP1 de San Luis Potosí. Se asume que son condiciones que podrían haber generado estos resultados entre estas dos cepas del mismo género y especie. Al utilizar el

inhibidor específico de la ATPasa de membrana, dietilestilbestrol (DES) (Eilam *et al.*, 1984), se demostró que la actividad de la ATPasa membranar es esencial para la viabilidad de las levaduras en estrés térmico. El efecto inhibitorio del estrés por temperatura se cree que es resultado del daño a proteínas y permeabilización de las membranas (Watson, 1987), particularmente de la membrana plasmática, lo que permite la disipación del gradiente de H^+ transmembranar y reducir de esta manera, el pH intracelular (Weitzel *et al.*, 1987). El efecto del estrés por alta temperatura en la organización de la membrana y la fluidez, también afectan negativamente la actividad de enzimas como la ATPasa (Weitzel *et al.*, 1987). Se ha sugerido que la modificación en la fluidez de la membrana plasmática, es el resultado de la alteración de la composición lipídica por estar expuesta a estrés térmico (Sinigaglia *et al.*, 1993), lo que puede influir en la actividad de la ATPasa; dicha alteración presenta cambios en la permeabilidad y cambios entre la enzima y su sustrato, aunque a niveles mayores de estrés térmico, la enzima se puede inactivar (Viegas *et al.*, 1995). Johanson *et al.* (1995), observaron que ácidos grasos de cadena larga aumentan la actividad de la ATPasa. De acuerdo a Serrano *et al.* (1988), la ATPasa requiere lípidos en las membranas para ser funcional. Wach *et al.* (1990) observaron que la actividad de la ATPasa purificada y reconstituida en vesículas de liposomas depende de un ambiente particular de lípidos, siendo afectada dicha actividad por el índice de esteroides/fosfolípidos. Teniendo como antecedente lo anterior, es que se evaluó el grado de lipoperoxidación de las membranas celulares y mitocondriales. La determinación se realizó mediante el método del ácido tiobarbitúrico (Buege y Aust, 1978), que consiste en la detección de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente el malondialdehído, producto de la reacción de los ácidos grasos insaturados con ERO. En la gráfica 12, se observó que las cepas W303 y MC4, presentaron un aumento en el grado de lipoperoxidación de membranas celulares cuando se expusieron a 40 °C, siendo mayor en la cepa MC4. Este hecho correlaciona directamente con el aumento de la actividad de su ATPasa. Un daño en las membranas podría causar una fuga de protones y causar la pérdida de la homeostasis celular y finalizar con la muerte celular. La cepa OFF1 no

presentó un aumento significativo en la lipoperoxidación cuando se expuso a 40°C y mantuvo de manera íntegra las membranas celulares, lo que le permitió conservar el intercambio iónico de acuerdo a sus necesidades fisiológicas, ya que se observó una menor reducción en su viabilidad (gráfica 7). La cepa SLP1, al igual que las cepas W303 y MC4, presentó un aumento en su lipoperoxidación membranal al estar expuestas a 40°C, sin embargo, hay que resaltar que el grado de lipoperoxidación de la cepa SLP1 fue menor que el que se observó en las cepas W303, MC4 y OFF1 a 30°C. Este fenómeno puede ser causado por una menor producción de ERO generadas en esta cepa por la temperatura, o que presente sistemas antioxidantes más activos y que se reduzca el daño a los lípidos, o también que esta cepa (SLP1), presente una menor composición de ácidos grasos insaturados.

8. Conclusion

En levaduras la actividad de sus ATPasas es indispensable para su viabilidad en alta temperatura, esta actividad es influenciada por el grado de lipoperoxidación de sus membranas. Las levaduras aisladas de hábitats extremos modifican la actividad de su ATPasa membranal en menor grado en alta temperatura que la cepa de referencia W303.

9. Referencias

Alfonzo, M., Kandrach, M.A. y Racker, E. 1981. Isolation, characterization, and reconstitution of a solubilized fraction containing the hydrophobic sector of the mitochondrial proton pump. *J Bioenerg.* **13**:375-391.

Ambesi, A., Miranda, M., Petrov, V. y Slayman, C. 2000. Biogenesis and function of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *J Exper Biol.* **203**:155-160.

Anand, S., y R. Prasad. 1989. Rise in intracellular pH is concurrent with “start” progression of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* **135**:2173-2179.

Arthur, H. y Watson, K. 1976. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, y thermophilic yeasts. *J Bacteriol.* **128**(1):58-68.

Avery, S. 2011. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J.* **434**:201-210.

Bellinger, Y. y Larher, F. 1988. Comparative nuclear magnetic resonance study of organic solute production and excretion by the yeasts *Hansenula anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* in saline media. *Can J Microbiol.* **34**:605–612.

Borst-Pauwels, G. W. y Peters, P. H. J. 1981. Factors affecting the inhibition of yeast plasma membrane ATPase by vanadate. *Biochim Biophys Acta.* **642**:173-181.

Bravim, F., Palhano, F., Alberto, A., Patricia, M.B. Fernandes. 2010. Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **37**:1071-1079.

Bruinenberg, P. M., Jonker, J., van Dijken, J. P. y Scherffers, W. A. 1985. *Arch Microbiol.* **142**:302-306.

Buege, J.A. y Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**:302-10.

Bunoust, O., Devin, A., Avéret, N., Camougrand, N. y Rigoulet, M. 2005. Competition of electron to enter the respiratory chain: a new regulatory mechanism of oxidative metabolism in *Sacchchromyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **280**:3407-3413.

Busa, W. B., y R. Nuccitelli. 1984. Metabolic regulation via intracelular pH. *Am J Physiol.* **246**:409-438.

Cano-Estrada, A. y González-Halphen, D. 2011. F₁F₀-ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *REB*. **30**(3):98-108.

Charles, P. Cartwright., Felicity, J. y Anthony, H. Rose. 1987. Effect of Ethanol on Activity of the Plasma-membrane ATPase in, and Accumulation of Glycine by, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*. **133**:857-865.

Coote, P.J., Cole, M.B. y Jones, M.V. 1991. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. *J Gen Microbiol*. **137**(7):1701-1708.

Coote, P.J., Jones, M.V., Seymour, I.J., Rowe, D.L., Ferdinando, D.P. y McArthur, A.J. 1994. Activity of the plasma membrane H⁺ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **140**: 1881-1890.

De Vries, S. y Marres, C.A. 1987. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta*. **845**(3):205-239.

Dimova, E.,G., Bryant, P.,E. y Chankova, S.,G. Adaptive response: some underlying mechanisms and open questions. *Genet Mol Biol*. 2008. **31**(2):396–408.

Domínguez-Ramírez, L. y Tuena de Gómez-Puyou, M. 2003. Virtudes y pecados de una enzima: la F₀F₁ ATP sintasa. *Mensaje Bioquímico*. **27**:25-40.

Eddy, A., A. 1982. Mechanisms of solute transport in selected eukaryotic microorganisms. *Adv Microbiol Physiol*. **23**:1-78.

Eilam, Y., Lavi, H., y Grossowicz, N. 1984. Effects of inhibitors of plasma-membrane ATPases on potassium and calcium fluxes, membrane potential and proton motive force in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbios*. **41**:177-189.

Eraso, P. y Gancedo, C. 1987. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS lett*. **137**:1701-1708.

Eraso, P., Cid, A. y Serrano, R. 1987. Tight control of the amount of yeast plasma membrane ATPase during changes in growth conditions and gene dosage. *FEBS lett*. **224**:193-197.

Fiske, C.H. y Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem*. **66**:375-400.

Fredlund, E. 2004. Central carbon metabolism of the biocontrol yeast *Pichia anomala* influence of oxygen limitation. PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

Garay-Arroyo, Covarrubias, A.A., Clark, I., Gosset, G. y Martinez, A. 2004. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. **63**(6):734-741.

Geoffrey, M. C. 2000. The Cell, A Molecular Approach. 2nd edition.

Geoffrey M. C. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Micrografía por K. R. Porter/Photo Researchers, Inc. Imagen tomada de: Mitochondria The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition.

Goffeau, A. y Slayman, C. 1981. The proton translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*. **639**:197-223.

Gornall, A.,G., Bardawill, C.,J. y David, M.,M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* **177**(2):751-766.

Guérin, B., Labbe, P. y Somlo, M. 1979. Preparation of yeast mitochondria *Saccharomyces cerevisiae* whit good P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol.* **55**:149-159.

Holyoak, C.M., Stratford, C., Mullin, M. B., Cole, K., Crimmins, A. P. y Coote, P.J. 1996. Activity of the Plasma Membrane H⁺ATPase and Optimal Glycolytic Flux Are Required for Rapid Adaptation and Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the Presence of the Weak-Acid Preservative Sorbic Acid. *Appl Environ Microbiol.* **9**: 3158-3164.

Holyoak, C., Bracey D., Piper, W., Kuchler, K. y Coote, P. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. *J Bacteriol.* **181**:4644-4652.

Intriago, P. 2012. Marine Microorganisms: perspectives forgetting involved in cellulosic ethanol. *J List.* **10**:1186-2191.

Johansson, F., Olbe, M., Sommarin, M. y Larsson, C. 1995. Polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sideness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles. *The Plant J.* **7**:165-173.

Johnson, E., A. 2013. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts the basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol.* **97**(17):503-517.

Koedrith, P., Dubois, E., Scherens, B., Jacobs, E., Boonchird, C., Messenguy F. 2008. Identification and characterization of a thermotolerant yeast strain isolated from banana leaves. *Science Asia.* **34**:147-52.

Komatsu, Y., Fujita, K., Kaul, S. C., Iwahashi, H. y Obuchi, K. 1992. Heat shock induces cross protection against various stresses in yeast. *Yeast*. **8**:588.

Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A., y Bedoya, F. 1983. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem J*. **214**:657-663.

Kurtzman, C., P. y Fell, J., W. 1997. The Yeasts, a Taxonomic Study. 4th Edition. Amsterdam: *Elsevier Science Publishing Company*. 1055.

Lefebvre, L. L., Balguerie, A., Duvenzin, C.S., Giraud M.F., Sionimski, P.P. y Di Rago, J.P. 2003. F1-catalysed ATP hydrolysis is required for mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under conditions where it cannot respire. *Mol Microbiol*. **47**(5):1329-1339.

Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. y Rojo, M. 2002. Mitochondrial fusion in human cell is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell*. **13**:4343-4354.

Madshus, I. H. 1988. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J*. **250**:1-8.

Malpartida, F. y Serrano, R. 1981. Proton translocation catalysed by the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted in liposomes. *FEBS lett*. **131**:351-354.

McCracken, L. D. y Gong, C. S. 1982. Fermentation of cellulose and hemicellulose carbohydrates by thermotolerant yeasts. *Biotechnol Bioengin*. **12**:91.

McCusker, J. H., Perlin, D. S. y Haber, J. E. 1987. Pleiotrophic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **7**:4082-4088.

Morano, K. A., Santoro, N., Koch, K. A. y Thiele, D. J. 1999. A trans-Activation domain in yeast heat shock transcription factor is essential for cell cycle progression during stress. *Mol Cell Biol.* **19**(1):402-411.

Nevoigt, E. 2008. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **72**(3):379-412.

Nurminen T, Taskinen L, Suomalainen H. 1976. Distribution of membranes, especially of plasma-membrane fragments, during zonal centrifugations of homogenates from glucose-repressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* **154**(3):751-763.

Okorokov, L., Kulakovskaya. T. y Kulaev, I. 1982. Solubilization and partial purification of vacuolar ATPase of yeast *Saccharomyces carls-bergensis*. *FEBS lett.* **145**:160-162.

Oster, G., y Hongyun, W. 1999. Reverse engineering a protein: the mechanochemistry of ATP synthase. *Biochimica et Biophysica. Elsevier.* 482-510.

Panaretou, B. y Piper, P. W. 1990. Plasma-membrane ATPase action affects several stress tolerances of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* as well as the extent and duration of the heat shock response. *J Gen Microbiol.* **36**:1763-1770.

Pardo, J. P.1990. La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de los hongos. *Mensaje Bioquímico.***13**:119-172.

Passos, J.B., Vanhalewyn, M., Brandão, R.L., Castro, I.M., Nicoli, J.R. y Thevelein, J. 1992. Glucose-induced activation of plasma membrane H⁺-ATPase in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affected in cAMP metabolism, cAMP-

dependent protein phosphorylation and the initiation of glycolysis. *Biochim Biophys Acta*. **1136**(1):57-67.

Pearce, A. K., Booth, I. R., Brown, A. J. 2001. Genetic manipulation of 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 2, 6-bisphosphate levels affects the extent to which benzoic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **147**:403–410.

Peña, A. 1975. Studies on the mechanism of K⁺ transport in yeast. *Arch Biochem Biophys*. **167**:397-409.

Piper, P., Mahe, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., 1998. The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J*. **17**:4257–4265.

Plesset, J., Ludwig, J.R., Cox, B.S. y McLaughlin, C.S. 1987. Effect of cell cycle position on thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. **169**:779-784.

Rapaport, D. 2003. Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *J List*. **4**(10):948-952.

Riemersma, J. y Alsbach, E. J. 1974. Proton translocation during anaerobic energy production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. **339**:274-284.

Rikhvanov, E. G., Varakina, N.N., Rusaleva, T. M. y Rachenko, E. I. 2003. The effect of cytochrome oxidase inhibitors on the thermotolerance of yeasts. *Microbiology*. **72**(2):144-148.

Roehr, M. 2001. The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications. *Chichester: Wiley-VCH*. **232**.

Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*. **283**:1488-1493.

Schatz, G., Penefsky, H., S. y Racker, E. 1967. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J Biol Chem*. **242**:2552-2560.

Serrano, R. 1978. Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem*. **22**:51-63.

Serrano, R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur J Biochem*. **105**:419-424.

Serrano, R. 1984. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr Top Cell Regzll*. **23**:87-126.

Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. y Fink, G. R. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺) and Ca²⁺-ATPases. *Nature*. **319**:689-693.

Serrano, R., Montesinos, C. y Sanchez, J. 1988. Lipid requirements of the plasma membrane ATPase from oat roots and yeast. *Plant Sci*. **56**:117-122.

Serrano, R. 1991. Transport across yeast vacuolar and plasma membranes, p. 523–585. In J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Genome dynamics, protein synthesis, and energetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sinigaglia, M., F. Gardini, y M.E. Guerzoni. 1993. Relationship between thermal behaviour, fermentation performance and fatty acid composition in two strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **39**:593-598.

Slapack, G.E., Russell, I. y Stewart, G.G. 1987. Thermophilic Microbes in Ethanol Production. *CRC Press.* 186.

Van Der Wilden, W., y Matile, P. 1978. Isolation characterization on yeast tonoplast fragments. *Biochim Physiol Pflanzen.* **173**:285-294.

Van Dijken, J.P. y Scheffers, W.A. 1986. *FEMS Microbiol Rev.* **32**:199-225.

Viegas, C.A., Sebastião, P.B., Nunes, A.G. y Sá-Correia, I. 1995. Activation of Plasma Membrane H⁺-ATPase and Expression of PMA1 and PMA2 Genes in *Saccharomyces cerevisiae* Cells Grown at Supraoptimal Temperatures. *Appl Environ Microbiol.* **61**(5):1904.

Voet, D. y Voet, J. 2006. Bioquímica 3ra edición. Ed. Medical Panamericana.

Wach, A., Ahlers, J. y Graber, P. 1990. *J Biochem.* **189**:675-682.

Walker, G.M. 2009. Yeasts. In: M. Schaechter, ed. Desk Encyclopedia of Microbiology. 2nd ed. London: *Elsevier/Academic Press.* 1174-1187.

Walker, G.M. 2011. *Pichiaanomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek.* **99**:25-34.

Walker, G.M. y Van, Dijk, P. 2006. Physiological and molecular responses of yeasts to the environment. In: Querol A, Fleet GH (eds) The yeast handbook. yeasts in food, beverages. *Springer-Verlag, Berlin.* 111–152.

Watson, K. 1987. Temperature relations, 41–47. In A. H. Rose and J. S. Harrison (ed.) *The yeasts*, vol. 2. Academic Press, London.

Waters, P., J., Parniak, M., A., Hewson, A., S. y Scriver C., R. 1998. Página 49
Alterations in protein aggregation and degradation due to mild and severe missense mutations (A104D, R157N) in the human phenylalanine hydroxylase gene (PAH). *PMC*. **12**:344-354.

Weber, J. y Senior, A.E. 2003. ATP synthesis driven by proton transport in F₁F₀-ATP synthase. *FEBS lett*. **545**:61-70.

Weitzel, G., U. Pilatus, y L. Rensing. 1987. The cytoplasmic pH, ATP content and total protein synthesis rate during heat-shock protein inducing treatments in yeast. *Exp Cell Res*. **170**:64-79.

Wiemken, A., Hottiger, T., Virgilio, C., Michael, N., Boller, T. 1994. The role of trehalosa synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. *Eur J Biochem*. **219**:187-193.

Willsky, G., 1979. Characterization of the plasma membrane Mg⁺² -ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. **254**:3326-3332.

Witting, I., y Schägger, H., 2009. Native electrophoretic techniques to identify protrin-protein interactions. *Proteomic*. **9**(23):5214-5223.

10. Abreviaturas

ATP = Adenosin trifosfato

ADP= Adenosin difosfato

°C = Grados celcius

ADN = Ácidodesoxiribonucleico

ml= Mililitros

μl = Microlitro

μm = Micrometro

nm = Nanometro

M = Molar

mM = Millimolar

M = Molar

nM = Nanomolar

S.c. = Saccharomyces cerevisiae

D.O. = Densidad óptica

ERO= Especies reactivas de oxígeno

rpm = Revoluciones por minuto

S.E.M. =Media del error estandar

D. E. = Desviación estandar

YPD = Extracto de levadura peptona dextrosa

KDa= Kilo daltones

Pi= Fosfato inorgánico

HSPs = Proteínas de choque térmico

CTE = Cadena transportadora de electrones

MTT = 3(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio

KCl= Cloruro de potasio

c.b.p.= Cuanto baste para

ELON = Ácido p-metilaminofenolsulfonato

NaN₃ = Azida de sodio

NaOH = Hidróxido de sodio

SDS = Dodecilsulfato sódico

EGTA =Ácido tetraacético etilenglicol

TBA = Ácido tiobarbitúrico

TBARS = Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico