



Universidad Michoacana  
de San Nicolás de  
Hidalgo



Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias  
Biológicas, Opción Biología experimental

Estudio de la respuesta al estrés oxidativo en  
levaduras no-*Saccharomyces*

Tesis que presenta el:  
M. C. Melchor Arellano Plaza

Para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

Director de tesis: Dr. Alfredo Saavedra Molina

Co-Director de tesis: Dr. Juan Carlos Hernández González

Morelia Mich. Marzo 2013



*Dedico este proyecto a mi esposa e hijos, Luz, Dany y Yanneli, por su amor y cariño incondicional.*

*A mis padres Melchor y Elvira y a mis hermanos Laurita, Fayito y Lupirri, que me han apoyado en todo momento.*

*A mi director de tesis Dr. Alfredo Saavedra y mi co-director Dr. Juan Carlos González, por su valiosa contribución a mi formación.*

*Agradezco todo el esfuerzo y comprensión que me han ofrecido los amigos y colaboradores en cada etapa de este camino*

*Un agradecimiento especial para el*

*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)*

*por el soporte económico para la realización de este trabajo con*

*el proyecto CONACyT 169063*

CONTENIDO	
Resumen general	1
1. Introducción general	3
1.1. Las levaduras	3
1.1.1. Distribución de las levaduras	3
1.1.2. Funciones metabólicas básicas de las levaduras	4
1.2. Levaduras con importancia industrial	6
1.3. Estrés en levaduras	8
1.3.1. Estrés oxidativo en levaduras	10
1.3.2. Efecto de la fase de crecimiento en la respuesta a estrés oxidativo en las levaduras	12
1.3.3. Efecto del peróxido de hidrógeno en levaduras	13
1.3.4. Estrés oxidativo en levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	14
2. Hipótesis	17
3. Justificación	18
4. Objetivo general	20
4.1. Objetivos específicos	20
5. Resultados Capítulo 1 “Capacidad respiratoria durante estrés oxidativo por <i>Kluyveromyces marxianus</i> aislada del proceso de producción del mezcal	21
5.1. Resumen	22
5.2. Título del manuscrito, autores y sitios de adscripción	23
5.2.1. Abstract	23
5.2.2. Introducción	23
5.2.3. Materiales y métodos	24
5.2.3.1. Levaduras y medios de cultivos	25
5.2.3.2. Efecto del estrés oxidativo sobre la viabilidad durante diferentes fases del crecimiento	25
5.2.3.3. Efecto del estrés oxidativo sobre la velocidad de crecimiento	25
5.2.3.4. Capacidad respiratoria durante el estrés oxidativo con menadiona o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25
5.2.4. Resultados	25
5.2.4.1. Efecto del estrés oxidativo sobre la viabilidad de levaduras durante diferentes fases de crecimiento	25
5.2.4.2. Efecto del estrés oxidativo sobre la velocidad de crecimiento	26
5.2.4.3. Capacidad respiratoria durante el estrés oxidativo	27
5.2.5. Discusión	28
5.2.6. Agradecimientos	30
5.2.7. Referencias	30
6. Capítulo 2 “Capacidad fermentativa de levaduras aisladas del proceso de producción del mezcal después de un estrés oxidativo”	32
6.1. Título del manuscrito, autores y sitio de adscripción.	33
6.2. Abstract	33
6.3. Introducción	33
6.4. Materiales y métodos	35
6.4.1. Cepas de levaduras y mantenimiento	35

6.4.2. Condiciones del estrés oxidativo	35
6.4.3. Preparación de los extractos celulares	35
6.4.4. Actividad catalasa	36
6.4.5. Actividad superóxido dismutasa	36
6.4.6. Actividad glutatión reductasa	36
6.4.7. Lipoperoxidación	36
6.5. Resultados y discusiones	37
6.6. Referencias	41
7. Capítulo 3 Capacidad fermentativa de levaduras aisladas del proceso de producción del mezcal después de un estrés oxidativo	44
7.1. Título, autores y lugar de adscripción	45
7.2. Resumen	46
7.3. Abstract	47
7.4. Introducción	48
7.5. Materiales y métodos	50
7.5.1. Cepas de levadura	50
7.5.2. Estrés oxidativo	51
7.5.3. Condiciones de fermentación	51
7.5.4. Métodos analíticos	51
7.5.5. Análisis de datos	52
7.6. Resultados y discusiones	53
7.6.1. Viabilidad después de un estrés oxidativo	53
7.6.2. Comportamiento durante la fermentación después de un estrés oxidativo	53
7.6.3. Producción de compuestos volátiles después de un estrés oxidativo	56
7.7. Conclusión	62
7.8. Agradecimientos	63
7.9. Referencias	63
8. Discusión general	68
9. Perspectivas y recomendaciones.	77
Referencias	78

## 1. Resumen General

Los organismos en su ambiente natural se encuentran en condiciones de constante cambio, como son: la temperatura, la osmolaridad, el pH, la disponibilidad de nutrientes, sustancias tóxicas o la presencia de intermediarios reactivos del oxígeno, las variaciones en las condiciones ambientales provocan estrés en los microorganismos.

Durante el crecimiento celular es frecuente que en la respiración se produzcan compuestos de oxígeno parcialmente reducidos, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO) que, debido a su alta reactividad y poder oxidante, son nocivas para las células y son capaces de reaccionar con los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, inactivando su función. En condiciones normales, la concentración intracelular de ERO se encuentra por debajo de los niveles tóxicos, debido a que la célula posee enzimas que mantienen en niveles no letales las ERO, como: la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx), la tioredoxina peroxidasa (TPx), entre otras. El estrés oxidativo se puede incrementar durante el crecimiento celular de las levaduras al adicionar aire a altas presiones u oxígeno puro, además, se ha demostrado que al ser sometidas a procesos de congelación o secado se incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha utilizado como una célula modelo de investigación, por su facilidad de manipulación genética y por la homología de los sistemas de señalización por estrés respecto a las células eucariotas superiores. Sin embargo, en los últimos años, se han utilizado especies de levadura diferentes a *S. cerevisiae* para la producción de bebidas alcohólicas, para la industria de la panadería, para la industria láctea etc.

En este trabajo se utilizaron levaduras de las siguientes especies: *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora delbruecki*, *Candida ethanolica*, *Zygosaccharomyces bisporus* y *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de fermentaciones espontáneas en procesos de producción del mezcal. Las levaduras fueron seleccionadas debido a que en los sitios de aislamiento se detectaron variaciones en las condiciones ambientales (concentración elevada de azúcares iniciales, elevadas o bajas temperaturas, presencia de inhibidores de crecimiento etc.) ocasionando estrés, por lo que pueden ser un modelo alternativo para analizar variantes en la respuesta a estrés.

Las levaduras fueron cultivadas en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o menadiona (generador de anión superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a diferentes concentraciones, con la finalidad de evaluar la capacidad de remoción de los oxidantes y/o la reparación del daño causado por el estrés, manteniendo la viabilidad celular de las levaduras y su capacidad fermentativa. Se demostró que las levaduras más resistentes a un estrés oxidativo fueron las *K. marxianus*, seguidas de las *S. cerevisiae*. Cuando se adicionó menadiona al cultivo y se mantuvo durante todo el crecimiento, se observó una disminución en la capacidad de reproducción, mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> impidió el crecimiento al inicio, sin embargo posteriormente, todas las levaduras fueron capaces de crecer, por lo que el daño causado fue reversible. Se observó menor lipoperoxidación en levaduras *K. marxianus*, pero mayor carbonilación de proteínas que en *S. cerevisiae*, por lo que su membrana y por ende el transporte de nutrientes fue poco afectado, manteniendo su viabilidad y las proteínas oxidadas fueron reparadas o expresadas nuevamente. La GPx mostró una mayor actividad en las *K. marxianus*, por lo que el sistema del glutatión es el principal sistema activo contra el estrés oxidativo.

Finalmente, se obtuvo la evidencia de que las levaduras después de un estrés oxidativo modificaron la producción de compuestos volátiles, principalmente los ésteres y los alcoholes superiores durante la fermentación alcohólica. Este fenómeno se debe, a que durante el estrés oxidativo las levaduras modifican o desvían las vías metabólicas para mantener la homeostasis celular. Debido a que los alcoholes superiores provienen del metabolismo de aminoácidos, es probable que algunos puntos de control fueron modificados, incrementando el catabolismo de valina y de isoleucina. Además, debido a que el estrés oxidativo activa el metabolismo de azúcares por la vía de las pentosas fosfato y disminuye la glucólisis, los niveles del NADH disminuyó provocando una menor producción de etanol e incrementando la generación de acetato y activando la producción de lactato.



## **1. Introducción general**

### **1.1. Las levaduras**

Las levaduras se clasifican dentro del reino Fungi, en el que predomina la forma unicelular. Más de 700 especies de levaduras clasificadas en 100 géneros se describen en la edición de *The Yeasts: a taxonomic study* (Kurtzman y Fell, 1998). El aislamiento de levaduras principalmente se ha realizado en procesos fermentativos para la producción de etanol, durante la elaboración de vinos, de bebidas alcohólicas espirituosas (tequila, vodka, coñac, etc.), entre otros procesos (Arellano, 2008).

Según Pretorius y col., (1999), en la etapa de fermentación del proceso de elaboración del vino se ha demostrado la intervención de únicamente 15 géneros de levaduras: *Brettanomyces* (y su equivalente sexual *Dekkera*), *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* y su contraparte asexual *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces*. Las 700 especies de levaduras identificadas hasta hoy, representan únicamente una pequeña fracción de la biodiversidad presentes en el planeta. Estimaron que existen 62 000 géneros y 669 000 especies de levaduras sin describir. Al nivel de especie, la más estudiada y conocida es *Saccharomyces cerevisiae*, presenta 6 000 genes y sólo se conoce la función de poco más de la mitad (Wei y col., 2007).

A pesar de los estudios realizados y el gran número de especies de levaduras descrito estos últimos 50 años, el vasto mundo de las levaduras tiene mucho potencial sin descubrir y seguramente algunos importantes para la evolución de la tecnología y conocimiento que ofrece su estudio.

#### **1.1.1. Distribución de las levaduras**

Las levaduras han colonizado una gran parte del planeta: se pueden aislar del aire, del agua y de la tierra. Dependen de la presencia de una forma orgánica de fuente de carbono, por ejemplo: azúcares simples, ácidos orgánicos y grasos, alcoholes alifáticos, etcétera. Las levaduras no poseen capacidad de desplazamiento por sus propios medios, por lo que dependen de vectores como el viento, los animales (principalmente los insectos) o la misma actividad humana (Gschaedler y col., 2004).

En el caso de la elaboración de bebidas alcohólicas, las levaduras provienen de dos hábitat diferentes: las materias primas (principalmente vegetales) y las fábricas donde éstas se procesan. En el caso de los vinos es difícil aislar especies de *Saccharomyces* de la uva en buen estado o del suelo de los viñedos (Martini, 1993). Por el contrario, es fácil aislar *Kloeckera* y *Hanseniaspora*, las cuales representan entre el 50 y el 75% de las levaduras presentes en la superficie de las uvas. Después, en número más reducido, se encuentran las otras especies, como *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* y *Pichia* (Fleet, 2007), lo cual indica la importancia que pueden tener estas levaduras en la fabricación de vinos aunque no se le ha dado la importancia debida.

En el caso del proceso de producción del tequila, Lachance (1995), describió que las 15 especies de levaduras aisladas del agave son distintas de las especies presentes en la fábrica, y en particular, en el proceso fermentativo, excepto una de ellas, *Pichia membranaefaciens*. El autor concluye que el origen exacto de las levaduras involucradas en el proceso de elaboración del tequila no está totalmente aclarado y que la levadura más importante del proceso, *Saccharomyces cerevisiae*, no proviene de los campos de agave ni de la vegetación de los alrededores de la fábrica.

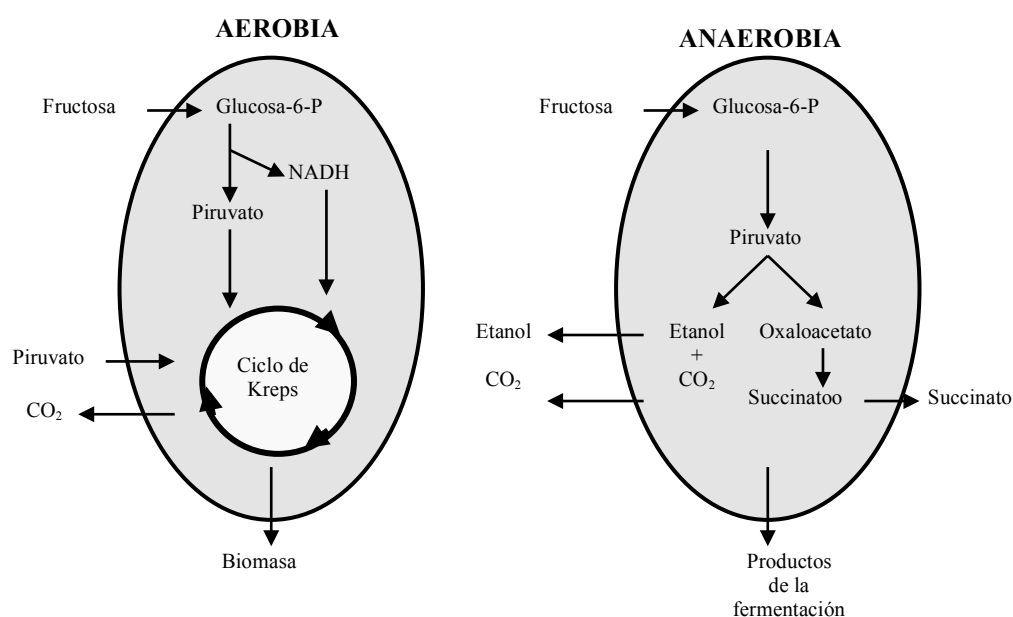
Las levaduras que habitan en las fermentaciones espontaneas, como es el caso de los procesos de producción del mezcal, han evolucionado y generado múltiples mecanismos de adaptación, debido a que las condiciones del cultivo se encuentran en condiciones extremas como estrés osmótico (concentración de azúcares mayor a 20% p/v), la temperatura puede oscilar entre 5 y 40°C, los niveles de oxígeno son variables, los mostos contienen compuestos tóxicos como las saponinas, etc. Los niveles de azúcares, así como, la presencia de inhibidores como las saponinas, dependen de la especie de agave utilizada, existen más de 8 especies que se utilizan en la denominación de origen en diferentes estados de la Republica Mexicana, Oaxaca, San Luis Potosí, Guerrero, Zacatecas, Tamaulipas, Michoacán y un municipio de Guanajuato, ocasionando un estrés en las levaduras particular en cada empresa mezcalera.

### **1.1.2. Funciones metabólicas básicas de las levaduras**

El término metabolismo se utiliza para aludir a todos los procesos químicos que tienen lugar en una célula. Para realizar todas las actividades metabólicas, las levaduras tienen una

serie de necesidades nutricionales. Como fue mencionado por Walker (1998), entender las necesidades nutricionales de las levaduras, los fenómenos de transporte de los nutrientes y la asimilación de estos elementos es indispensable y están correlacionados con el objetivo de su cultivo; ya sea a nivel laboratorio para la elucidación de las reacciones metabólicas específicas, para conocer la activación de su sistema genético o para optimizar los procesos fermentativos a nivel industrial. En general los medio de cultivo deben garantizar que todos los elementos estén presentes en cantidades suficientes para el crecimiento y/o fermentación por las levaduras.

La mayoría de las levaduras y en particular *Saccharomyces cerevisiae* presentan de forma general dos tipos de catabolismo: anaeróbico y aeróbico (Murray y col., 2011). Eso significa que las levaduras son capaces de vivir con o sin oxígeno en su medio de desarrollo. Los productos obtenidos en los dos casos son diferentes y se esquematizan de una forma general en la figura 1. En el caso del metabolismo aeróbico, las levaduras utilizan la fuente de carbono para la producción componentes celulares e incrementar la biomasa, mientras que el metabolismo anaeróbico los principales productos es el etanol y compuestos volátiles.



**Figura 1.** Catabolismo aeróbico y anaeróbico de la fructosa en *Saccharomyces cerevisiae*. (Modificado de Russell, 2003)

En condiciones aeróbicas, con niveles normales de azúcar, las levaduras entran en fase de crecimiento y no de fermentación. A la capacidad de la levadura de metabolizar azúcares en presencia de oxígeno y utilizarlo para el crecimiento se le conoce como efecto Pasteur (Walker, 1998). Cuando las levaduras crecen en un cultivo en lote con altos niveles de azúcar rápidamente metabolizables, reprimen la habilidad de la célula para realizar el metabolismo aeróbico, este fenómeno se conoce como represión catabólica o efecto Crabtree y es importante para comprender el metabolismo celular.

La fermentación de la glucosa a etanol se inicia cuando la concentración de glucosa supera la habilidad de la célula para metabolizarlo aeróbicamente. Sin embargo, estas características se refieren sólo a *Saccharomyces cerevisiae*. Algunas levaduras como *Candida utilis* son insensibles a la glucosa y son capaces de respirar aeróbicamente en presencia de altas concentraciones de glucosa, mientras que otras levaduras, como *Schizosaccharomyces pombe*, son sensibles a la glucosa y fermentan azúcares en condiciones aeróbicas, pero son incapaces de metabolizar etanol a dióxido de carbono y agua (Madrid y col., 2004).

El ergosterol es el principal esteroide de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, la eficiencia fermentativa y la resistencia a etanol están relacionados con un aumento en la relación ergosterol/fosfolípidos y con una disminución del índice de saturación de los ácidos grasos en células de levadura (Beckhouse y col., 2008). En el caso de que la proporción de ergosterol sea baja, se potencian los efectos tóxicos del etanol dificultándose, entre otros, la captación de glucosa. Sin embargo, la síntesis de esteroides y de ácidos grasos de cadena larga se encuentra inhibida en ausencia de oxígeno (Beckhouse y col., 2008).

Estos procesos regulatorios ponen en evidencia que la capacidad de las levaduras sobre el metabolismo y capacidad de resistencia a efectos nocivos durante el crecimiento celular y fermentación dependen de la especie de levadura, sin embargo, pocos estudios se han realizado para conocer sus diferencias.

## **1.2. Levaduras con importancia industrial**

Las levaduras tienen una gran importancia a nivel industrial debido a que muchos productos actuales se generan utilizando levaduras como: en la panificación, en la producción de vinos, en la producción de bebidas alcohólicas en general, en la producción

de pigmentos, en la producción de biocombustibles, en la producción de vitaminas, etc. Por lo que es importante conocer sus capacidades biológicas que permitan su aplicación a nivel industrial con los mayores rendimientos.

La caracterización de levaduras y la selección es necesaria con la finalidad de garantizar los resultados obtenidos, sin embargo, es preciso considerar todos los factores que pueden afectar a la levadura e impactar en los productos deseados. Por tanto, es de vital importancia determinar los criterios que permitan una mejor selección de las levaduras. Degré en 1993 (citado por Nikolaou y col., 2006) propuso como características deseables: el conducir fermentaciones vigorosas con fases de latencia cortas con la menor cantidad de azúcares residuales; que las fermentaciones sean reproducibles, ser tolerante a presiones elevadas, a concentraciones altas de etanol y temperaturas no óptimas; producir compuestos deseados en cantidades adecuadas y cuando sea necesario flocular para ser fácilmente separables del medio. También se han descrito otros criterios entre los que podemos destacar la capacidad de conducir fermentaciones a bajas o altas temperaturas, etc. (Pretorius, 2000).

Los criterios de selección tienen relación con la capacidad de resistencia a estrés. El proceso industrial más estudiado respecto a los efectos del estrés es en la producción de bebidas alcohólicas. Ivorra y colaboradores (1999) demostraron una correlación entre el comportamiento fermentativo de 3 cepas de la industria vinícola y su resistencia a diferentes tipos de estrés; la cepa incapaz de completar la fermentación fue más sensible a todas las condiciones de estrés estudiadas. Otros trabajos han demostrado que existe una correlación entre la composición en ácidos grasos y la tolerancia al estrés de las diferentes cepas y subespecies de *S. cerevisiae* y su origen de aislamiento (fábricas de bebidas no alcohólicas, fábricas de zumos de frutas, destilerías, etc.) (Guerzoni y col., 1997).

Después de seleccionar la levadura, es necesario obtener la biomasa requerida en condiciones óptimas, es necesario agregar altos niveles de O<sub>2</sub>, posteriormente son expuestas a procesos de secado para ser comercializadas en forma de levadura seca activa. Sin embargo, se ha reportado que durante el crecimiento, el oxígeno puede incrementar la formación de especies reactivas de oxígeno al igual que el congelamiento y el secado (Perez-Torrado y col., 2009), por lo que es preciso determinar y conocer cuál es el efecto

sobre los rendimientos de producción y compuestos deseados, que puede tener la levadura seleccionada después de los procesos de producción de biomasa y de recuperación.

Entre las levaduras de interés industrial se encuentra por supuesto en primer lugar *Saccharomyces cerevisiae*, al ser la más utilizada en todo el mundo en una gran variedad de procesos. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el uso de levaduras como *Pichia pastoris* la cual es ampliamente utilizada para la obtención de proteínas recombinantes (Silva y col., 2009); *Yarrowia lipolytica* para la producción de lipasas y para la producción de biodisel (Fickers y col., 2005); *Schizosaccharomyces pombe* es utilizada para estudios metabólicos y genéticos por su diferencia con *Saccharomyces cerevisiae* (Vivancos y col., 2006); *Candida albicans* no tiene un uso industrial determinado pero al ser un microorganismo patógeno al ser humano, es utilizada para conocer sus capacidades de resistencia a estrés para la industria médica y farmacéutica (Jamieson y col., 1996); *Kluyveromyces marxianus* ha desarrollado estudios para la producción de enzimas como  $\beta$ -galactosidasas,  $\beta$ -glucosidasas, inulinasas, poligalacturonasas, entre otros, además, para la producción de proteína unicelular, producción de etanol, producción de compuestos aromáticos para la reducción de lactosa, para la producción de etanol realizando hidrólisis y fermentación simultánea, etc. (Fonseca y col., 2008; Limtong y col., 2007).

El conocimiento que se tiene hasta el momento de levaduras no-*Saccharomyces* es menor, sin embargo, han demostrado que son y pueden incrementar aún más sus usos biotecnológicos debido a sus características y cualidades particulares, debido a que pueden utilizar una amplia variedad de sustratos y condiciones de operación, termotolerancia y altas velocidades de crecimiento, además, que utilizan de forma más eficiente, los sustratos. Para incrementar por tanto el conocimiento sobre la biología de las especies y su posible uso a nivel biotecnológico, es necesario realizar estudios sistemáticos que permitan discernir entre sus capacidades y sus funciones biológicas y más aún sus sistemas de respuesta en ambientes estresantes.

### **1.3. Estrés en levaduras**

Todas la células censan y reaccionan a los cambios en su medio ambiente. Organismos unicelulares como las levaduras deben estar preparados para los cambios en su entorno como fluctuaciones en nutrientes, pH, temperatura, osmolaridad externa, exposición a

radiaciones UV y a una amplia variedad de compuestos tóxicos (Chen y col., 2003). Comprender y caracterizar los mecanismos de la respuesta a estrés de las levaduras desde el reconocimiento de las condiciones estresantes hasta las vías de traducción de señales es indispensable, para relacionar los resultados con los cambios fisiológicos y expresión génica con la finalidad de establecer metodologías de cultivo que permitan garantizar los rendimientos de producción deseados a pesar de las condiciones no ideales (Bravim y col., 2010; Igual y Estruch 2000).

La respuesta adaptativa al estrés requiere de la síntesis de nuevas proteínas, indicando que los cambios en la expresión génica son críticos. El fenómeno de protección cruzada sugiere que diferentes tipos de estrés pueden activar mecanismos de defensa similares probablemente por que se requiere un mínimo de respuesta a estrés general basal para cualquier estrés (Moradas-Ferreira y Costa, 2000). Análisis de la expresión génica global por microarreglos han revelado una respuesta general a estrés en *S. cerevisiae*, aproximadamente de 10 a 14% del total de genes son inducidos o reprimidos en diversos tipos de estrés (Gasch y col., 2000; Causton y col., 2001). Los genes inducidos están involucrados en el metabolismo de carbohidratos, en la detoxificación de ERO, en el plegamiento de proteínas y en su degradación, en funciones vacuolares y mitocondriales, en autofagocitosis y en transporte de nutrientes. Los genes reprimidos involucran procesos de consumo de energía y los relacionados con el crecimiento celular, incluidos transcripción y traducción de ARN y en la biosíntesis de ribosomas y nucleótidos.

La levadura *S. cerevisiae* y la *Schizosaccharomyces pombe* fueron comparadas para determinar su expresión génica. Se observó una similitud en los genes expresados y reprimidos en ambas levaduras, con la diferencia en la velocidad de regulación (Chen y col., 2003).

Dada la relevancia de la utilización de levaduras como modelo de estudio en la actualidad, es necesario conocer, el metabolismo de las diferentes especies durante las condiciones de cultivo específicas, de tal forma que, llevarlos al límite de alguna condición ambiental o nutricional puede provocar en las levaduras un estrés (Igual y Estruch, 2000). Durante la fermentación en mostos las levaduras se ven sometidas a diferentes condiciones de estrés

entre los que se destacan: el osmótico, el causado por el etanol, causado por limitación de nutrientes y el estrés oxidativo.

En el estrés osmótico existen períodos en los que las cepas deben tolerar aumentos en la osmolaridad del medio (Attfield y col., 2000), por ejemplo, el crecimiento de las levaduras para su producción industrial se realiza en melazas que pueden tener concentraciones de sacarosa de aproximadamente un 50% (p/v), sin embargo, se puede causar el estrés osmótico en medios de cultivo a concentraciones de azúcares entre 15 y el 25% (p/v) (Hohnmann, 2002; Carrasco y col., 2001).

El estrés por etanol se produce en condiciones naturales por el propio avance de la fermentación. Es importante en la elaboración de algunos vinos como el Jerez en la fase de envejecimiento biológico (Carrasco y col., 2001), debido a que se parte de concentraciones de etanol de un 15% v/v (Perez-Torrado y col., 2009). Es necesario considerar que el etanol es altamente tóxico para el metabolismo y crecimiento de las levaduras, ya que afecta a las membranas celulares (Voorst y col., 2006). El estrés por agotamiento de nutrientes se produce en las fases finales de producción de levaduras y fermentación y es constante durante el envejecimiento biológico (Bravim y col., 2010).

Finalmente, el estrés oxidativo tiene una gran relevancia durante la producción industrial de levadura seca activa (Bravim y col., 2010), ya que las levaduras son producidas sobre melazas con alimentación progresiva o en “fed-batch” y con aporte de oxígeno para optimizar la producción de biomasa, ocasionando un ambiente oxidante causado por la cadena transportadora de electrones en el metabolismo respiratorio.

### **1.3.1. Estrés oxidativo en levaduras**

La respuesta al estrés oxidativo es un proceso conservado evolutivamente en todos los organismos, ligado a los procesos de defensa por choque térmico y a moléculas que los protegen de diferentes tipos de estrés. En *S. cerevisiae*, las vías implicadas en esta respuesta involucran la expresión de moléculas antioxidantes como el ascorbato, tocoferol y glutatión y de enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa (SOD), peroxidasas, etc. Como respuesta al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), *S. cerevisiae* disminuye su ciclo celular en G2, por la vía de control de daño al ADN dependiente del gen Rad9 (Flattery-O'Brien y Dawes, 1998) y aumenta la síntesis de glutatión y catalasas (Moradas-Ferreira y



col., 2000; Chen y col., 2003), lo que permite neutralizar las ERO y activar los sistemas de reparación del ADN.

Las levaduras utilizan sus propios mecanismos para mantener una velocidad elevada de consumo de oxígeno en su cadena respiratoria y evitar un incremento de ERO, por lo cual, son un sistema ideal para estudiar el control de la producción de radicales libres. A través de la evolución, las mitocondrias han desarrollado diversas estrategias para controlar la producción de ERO (Folch-Mallol y col., 2004). Cuando la velocidad de consumo de oxígeno es inhibida, como en el estado de reposo (estado IV), se estimula la producción de ERO. Para evitar el producir un exceso de ERO, las mitocondrias han desarrollado mecanismos para mantener elevada la velocidad a la que funciona la cadena respiratoria, aún en ausencia de síntesis de ATP (Estado III).

La adaptación a la presencia de ERO es un proceso que forma parte de la respuesta al estrés oxidativo y depende de cada especie de levadura (Herrero y col., 2008). La adaptación inicia cuando el organismo detecta y responde a los niveles bajos, no letales, del oxidante y aumenta la expresión de genes que incrementan la capacidad de resistencia al estrés. Esto protege al organismo de niveles mayores de oxidante. La mayor resistencia ganada por la adaptación se acompaña del mantenimiento de la capacidad de proliferación de las células (Chen y col., 2003).

El estrés oxidativo en las levaduras ocurre en diferentes condiciones fisiológicas de *S. cerevisiae*, incluyendo el crecimiento celular a nivel industrial para la producción de levaduras activas utilizadas para la elaboración de vino (Pérez-Torrado y col., 2009). La adición de oxígeno puro a altas presiones (0.32 MPa) incrementan el estrés oxidativo causando una inhibición de la actividad metabólica y en la viabilidad celular (Belo y col., 2005), incluso se observó un incremento en la senescencia de las levaduras las cuales incrementaron la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa y SOD, así como los niveles de glutatión, al parecer el estrés oxidativo juega un papel importante. Así mismo, durante la deshidratación de las levaduras para la obtención de levaduras secas activas, se detectó un incremento en la activación de los genes *TRR1* y *GRX5*, en la producción de glutatión, así como, en el grado de lipoperoxidación lo que repercutió en la viabilidad celular de las levaduras secas recuperadas (Garre y col., 2010).

El crecimiento de las levaduras previo a la fermentación durante 8 h y la respuesta al estrés oxidativo fue monitoreado por Verbelen y col., (2009). Se observó que incrementó la expresión de genes de factores de transcripción como el *HAPI* y el *ROXI* involucrados en la captación de oxígeno durante las primeras 3 h de adición de O<sub>2</sub>, mientras que la expresión de *YAPI* se incrementó en los primeros 45 minutos (*YAPI* es un gen regulador de la respuesta a estrés oxidativo). Además, se incrementó la expresión de los genes *HSP1*, *SSA3*, *PAU5*, *SOD1*, *SOD2*, *CTA1* y *CTT1* involucrados en la respuesta a estrés (*HSP1*, *SSA3* y *PAU5* son familias de genes activadas después de un shock térmico). Se determinó una acumulación de ergosterol, trehalosa y de ácidos grasos insaturados. Los resultados indican que durante el crecimiento celular aerobio las levaduras activan su sistema de respuesta a estrés durante todo el periodo de crecimiento y es posible que se hagan más resistentes al estrés (Verbelen y col., 2009).

### **1.3.2. Efecto de la fase de crecimiento en la respuesta al estrés oxidativo en las levaduras**

El proceso de producción de biomasa de levadura para la generación de iniciadores en la industria alimentaria y farmacéutica está bien caracterizado y optimizado para generar altos niveles de biomasa con un consumo total de los nutrientes de medio de cultivo. Durante el crecimiento es suministrado aire u oxígeno al medio de cultivo, por lo que se ha demostrado que las levaduras producen altos niveles de ERO y activan su sistema antioxidante, sin embargo, es posible que se provoque un daño considerable ocasionando cambios en las capacidades fisiológicas de las levaduras (Perez-Torrado y col., 2009).

Las levaduras en la fase exponencial de crecimiento están en división activa y pasan a un estado de reposo no proliferante al entrar a la fase estacionaria. La entrada a esta fase al parecer está controlada por factores específicos de crecimiento y por la detección de falta de nutrientes, la cual causa la desactivación de la vía de señalización *TOR*, que regula de forma negativa los eventos de duplicación celular. Los factores de transcripción en *S. cerevisiae* para el estrés en general, *Msn2p* y *Msn4p*, están regulados negativamente por la vía *TOR*, ésto coincide con el incremento en la resistencia a una diversidad de estrés durante la fase estacionaria (Martinez-Pastor y col., 1996). Se ha demostrado que durante la

fase estacionaria la resistencia a ERO es superior comparada con la resistencia durante la fase exponencial (Higgins y col., 2003; Favre y col., 2008; Biryukova y col., 2006).

### 1.3.3. Efecto del peróxido de hidrógeno en las levaduras

Se han realizado estudios relacionados con el efecto ocasionado por el peróxido de hidrógeno en las levaduras. Jamieson y col., (1996) adicionaron 0.4 mM de peróxido de hidrógeno en la fase exponencial de crecimiento o 1 mM de menadiona (precursor de ERO) y determinaron que la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó la producción de 12 proteínas, mientras que la menadiona incrementó la expresión de 18 proteínas. Entre ellas destaca la proteína HSP26 en ambos tratamientos y que es expresada también durante un estrés térmico y osmótico (Varela y col., 1995).

Con el desarrollo de los microarreglos, investigaciones de los genes que son activados durante la exposición de oxidantes, Thorpe y col., (2004), realizaron un estudio en levaduras *S. cerevisiae* respecto a los genes que se sobreexpresan durante la adición de oxidantes como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Determinaron que una gran cantidad de genes están involucrados en la función mitocondrial. Cuando se agregó 1.5 mM de peróxido de hidrógeno a cultivos de *S. cerevisiae*, disminuyó los niveles de ATP, así como, de GTP, CTP, UTP y ADP-ribosa, también se tuvo un incremento en la producción de inosina (Osorio y col., 2003).

Conocer los genes que se activan cuando las levaduras son expuestas a un oxidante como el peróxido de hidrógeno, también ha sido un punto de investigación. Ng y col., (2007), determinaron que los genes para la adaptación al peróxido de hidrógeno por levaduras *S. cerevisiae* sensibles son *YAP1*, *SKN7* y *GAL11*, que codifican para factores de transcripción; *RPE1*, *TKL1* e *IDP1*, implicados en la producción de NADPH; *SLA1* que codifica para una proteína estructural del citoesqueleto; y *PET8*, que codifican para un proteína transportadora de aminoácidos en la mitocondria, su eliminación no permitió una adaptación completa a la levadura, por tanto, fueron los genes más importantes descritos para soportar los niveles de peróxido utilizados.

Existen dudas de cómo se activa el proceso de adaptación de las levaduras al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Levaduras a las que se les eliminó alguno de los genes que codifican para antioxidantes como la superóxido dismutasa 1 (SOD1), disminuyeron la capacidad de adaptación de las *S. cerevisiae*, pero no fueron esenciales. Para la adaptación al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se requiere tioredoxinas

y glutatión, que deben mantenerse en su forma reducida por la tioredoxina reductasa y la glutatión reductasa, respectivamente, utilizando al NADPH como agente reductor. El NADPH se genera en diferentes reacciones metabólicas; en el citosol es producido en la vía de las pentosas fosfato; en la mitocondria por la isocitrato deshidrogenasa y por la NADH quinasa, entre otros sitios por lo que eliminar o bloquear algún gen del metabolismo no eliminará su presencia de las células y continuarán con su crecimiento normal.

#### 1.3.4. Estrés oxidativo en levaduras *no-Saccharomyces*

El modelo de investigación utilizado ampliamente es la levadura *S. cerevisiae*, principalmente por que su genoma está completamente secuenciado, por que es fácil de transformar genéticamente. Sin embargo, conocer el funcionamiento de levaduras diferentes a la *S. cerevisiae*, ha permitido la obtención de nuevos productos y conocimiento en áreas diferentes de la medicina, bioquímica, biología, etc.

En *Schizosaccharomyces pombe* se ha detectado que existen 2 vías principales que se activan por un exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: *Pap1* y *MAP* quinasa *Sty1*. El primero responde a incrementos moderados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mientras que el segundo responde a altas concentraciones (aproximadamente la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debe ser 5 veces más que en *Pap1* para ser activa) (Vivancos y col., 2006). Las dos vías son esenciales para garantizar la sobrevivencia de las células bajo estrés oxidativo, pero al parecer no son esenciales durante el crecimiento aeróbico normal, sin embargo, la Tioredoxina peroxidasa (TPx1) al parecer es la enzima utilizada para la defensa del estrés oxidativo durante la respiración normal. La vía de la *MAP* cinasa además, está diseñada para responder a diversos estímulos de estrés como el osmótico y la deficiencia de nutrientes. Se ha determinado también la importancia de *TPx1* debido a que funciona como sensor de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y es un activador de la vía *Pap1* rio abajo.

Pocas levaduras son patógenas para el ser humano, *Candida albicans* es una levadura patógena oportunista. En el momento de la propagación, los macrófagos utilizan la producción de ERO para su eliminación, por lo que la levadura debe mantener su sistema de defensa antioxidante activado. Además, coordina cambios en su sistema de transcripción incluyendo un cambio de la glucólisis a la gluconeogénesis, activación de la degradación de ácidos grasos, inducción de respuesta al estrés oxidativo, reparación del ADN, incremento

de la producción de trehalosa y aumento en la activación de enzimas antioxidantes como SOD y catalasa (Westwater y col., 2005). Sin embargo, también se ha determinado que genera sustancias no activas y excretadas al medio de cultivo, que están implicadas en la activación del sistema de defensa de las levaduras de la misma especie que no han sido expuestas a un estrés oxidativo, este efecto es conocido como quórum sensing. *Candida utilis* ha sido incluso utilizada para la producción de glutatión (GSH) para el uso en cosméticos. Liang y col., (2009) encontraron que el estrés provocado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 0.1 mM y de forma intermitente, incrementó la producción de GSH minimizando la inhibición del crecimiento.

La respuesta adaptativa de la levadura *Yarrowia lipolitica* en un estrés oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y menadiona permitió conocer que es necesario la adición de más de 120 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inhibir el crecimiento celular y solo 0.5 mM de menadiona para tener el mismo efecto, ocasionando por tanto, un efecto distinto entre ambas moléculas (Biryukova y col., 2006). Además, se ha demostrado que en la *Y. lipolitica* tiene mayor resistencia al estrés oxidativo en la fase estacionaria que en la exponencial y concentraciones no letales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activan el sistema de respuesta a estrés oxidativo generando aún mayor resistencia (Biryukova y col., 2006).

Varios autores consideran que la levadura *Kluyveromyces lactis* es una excelente modelo para analizar variantes en la respuesta a estrés oxidativo, debido a que esta levadura el metabolismo aeróbico es predominante, además, que se han encontrado diferencias entre los grupos de genes relacionados al metabolismo de carbohidratos, funciones respiratorias y en la respuesta al estrés oxidativo (González-Siso y col., 2009). También, la levadura *Kluyveromyces marxianus* ha sido estudiada para determinar el efecto del estrés oxidativo utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, paraquat, presión de aire y de oxígeno (Pinheiro y col., 2002). Se incrementó la actividad de la SOD y de la Grx cuando se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o paraquat (3 veces más con paraquat) pero no se detectó mayor actividad a las diferentes presiones probadas.

Los trabajos realizados con levaduras *no-Saccharomyces* aún son pocos, pero indican que es posible su uso como modelo para determinar sus capacidades metabólicas en diferentes tipos de estrés incluyendo el oxidativo. Debido a que las levaduras *no-Saccharomyces* actualmente están siendo incorporadas en diversos procesos para la generación de

productos industriales, es necesario establecer sus capacidades de respuesta a estrés oxidativo. En este trabajo, se realizó la evaluación de diferentes levaduras silvestres aisladas del proceso de producción de mezcal, debido a que las condiciones que proliferan varían a lo largo de la fermentación y a niveles estresantes. De tal forma que levaduras de las especies *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Candida ethanolica* y la *Saccharomyces cerevisiae*, fueron evaluadas para medir sus capacidades antioxidantes.

## **2. Hipótesis**

Las levaduras silvestres aisladas del proceso de producción del mezcal y mas aún las no-*Saccharomyces*, tienen mayor capacidad de respuesta y son más resistentes al estrés oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o menadiona, además, presentan cambios metabólicos respecto a *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3. Justificación

Durante la fermentación espontánea de bebidas alcohólicas, las levaduras están sujetas a diferentes tipos de estrés, entre los que destacan el estrés osmótico, estrés térmico, estrés por etanol, estrés oxidativo, estrés por falta de nutrientes, etc. Las levaduras poseen sistemas para sentir y responder a las condiciones de estrés, como son: síntesis rápida de moléculas protectoras y la activación de señales que inducen efectos secundarios como la activación de enzimas y la transcripción de genes que codifican para factores que tienen funciones protectoras.

En la producción de biomasa de levadura para la generación de iniciadores en los procesos de bebidas alcohólicas, panadería, lácteos, cárnicos entre otros, es necesario la adición de aire u oxígeno para incrementar la población de levaduras, posteriormente, la levadura se somete a proceso de secado y envasado. Durante el crecimiento como en el secado, las levaduras activan su sistema de defensa al estrés oxidativo para la reparación de moléculas dañadas como los ácidos grasos que sufrieron lipoperoxidación, sin embargo, gran parte de las levaduras se dañan irreversiblemente disminuyendo su viabilidad.

Numerosos estudios se han realizado utilizando *S. cerevisiae* como modelo para determinar la respuesta a estrés oxidativo y los sistemas de defensa utilizados. Sin embargo, existen levaduras que tienen funciones metabólicas diferentes como es *K. marxianus*, la cual mantiene un sistema respiratorio por encima del fermentativo, además, que en momentos de estrés puede suspender la glucólisis y desviar el metabolismo por la vía de las pentosas fosfato, además, que al parecer tiene la capacidad de soportar mayores niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En procesos fermentativos espontáneos como la producción de mezcal, se han aislado diferentes tipos de levaduras, las cuales, dadas las condiciones de estos procesos artesanales, las levaduras están en frecuente estrés por la presencia de inhibidores de crecimiento como son las saponinas y algunos furanos, además, de estrés osmótico por los altos niveles de azúcares iniciales y estrés por etanol por los altos niveles de etanol generado, lo que provoca que algunas especies de levaduras desaparezcan durante el proceso. Sin embargo, existen levaduras que permanecen y soportan altos niveles de estrés, pero se desconoce cómo se logra dicha adaptación, por lo que la elucidación de las capacidades bioquímicas de dichas levaduras resulta interesante para establecer los sistemas



metabólicos que están implicadas en estas levaduras. Además, de conocer cuál sería el efecto de utilizar las levaduras en procesos de producción de bebidas alcohólicas después de un estrés oxidativo.

#### **4. Objetivo General**

Comparar la respuesta a estrés oxidativo de levaduras silvestres no-*Saccharomyces* comparada con levaduras *S. cerevisiae*

##### **4.1. Objetivos específicos**

- 4.1.1. Conocer la sensibilidad de levaduras silvestres no-*Saccharomyces* a diferentes compuestos oxidantes.
- 4.1.2. Determinar el impacto de la edad del cultivo sobre la capacidad antioxidante de las levaduras no-*Saccharomyces*.
- 4.1.3. Evaluar la respuesta al estrés oxidativo en levaduras no-*Saccharomyces* provocado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o menadiona.
- 4.1.4. Determinar las capacidades fermentativas de levaduras no-*Saccharomyces* después de ejercer estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o menadiona.

## 5. Capítulo 1:

Capacidad respiratoria durante el estrés oxidativo por *Kluyveromyces marxianus* aisladas del proceso de producción del mezcal.

En este primer capítulo se presenta la metodología y los resultados obtenidos que serán publicados en el artículo “**Respiratory capacity of the *Kluyveromyces marxianus* yeast isolated from the mezcal process during oxidative stress**” Melchor Arellano-Plaza, Anne Gschaedler-Mathis, Ruth Noriega-Cisneros, Mónica Clemente-Guerrero, Salvador Manzo-Ávalos, Juan Carlos González-Hernández and Alfredo Saavedra-Molina. El artículo fue aceptado para su publicación en World Journal of Microbiology and Biotechnology, el pasado 10 de febrero del 2013. El DOI de la publicación en línea es: DOI 10.1007/s11274-013-1291-7.

## 5.1 Resumen

Durante la etapa fermentativa del proceso de producción del mezcal, las levaduras son afectadas por diferentes tipos de estrés que pueden afectar su capacidad fermentativa. Diferentes tipos de estrés como: choque térmico, etanol, osmótico e inhibidores de crecimiento son comunes durante la fermentación. Las células han desarrollado sistemas metabólicos que activan la expresión de genes para disminuir el daño causado durante el estrés, sin embargo aun se han publicado trabajos que describan el efecto de oxidantes como el  $H_2O_2$  y la menadiona durante el crecimiento celular. En este trabajo se muestra el comportamiento de levaduras *Kluyveromyces marxianus* aisladas del proceso de producción de mezcal y comparada con *Saccharomyces cerevisiae* tanto silvestres del proceso de producción de mezcal como una cepa de laboratorio la W303-1A como referencia. Las cepas de *S. cerevisiae* mostraron mayor viabilidad después de un estrés oxidativo comparado con las *K. marxianus*. Sin embargo cuando se crecieron las levaduras en presencia continua de los oxidantes, las *K. marxianus* mostraron una mayor capacidad de crecer, siendo mayor en menadiona que en  $H_2O_2$ . La levadura SLP1 de *Kluyveromyces marxianus* presentó un comportamiento singular al ser capaz de mantener la respiración en presencia de menadiona y 4 h después se inhibió por completo la respiración. Cuando se adicionó  $H_2O_2$ , la levadura detuvo su respiración por 8 h y posteriormente comenzó a respirar. Finalmente, las levaduras *K. marxianus* tuvieron una mayor capacidad de resistir un exposición continua de oxidantes que las *S. cerevisiae*.

## Respiratory capacity of the *Kluyveromyces marxianus* yeast isolated from the mezcal process during oxidative stress

Melchor Arellano-Plaza · Anne Gschaedler-Mathis · Ruth Noriega-Cisneros ·  
Mónica Clemente-Guerrero · Salvador Manzo-Ávalos · Juan Carlos González-Hernández ·  
Alfredo Saavedra-Molina

Received: 30 November 2012 / Accepted: 10 February 2013  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

**Abstract** During the mezcal fermentation process, yeasts are affected by several stresses that can affect their fermentation capability. These stresses, such as thermal shock, ethanol, osmotic and growth inhibitors are common during fermentation. Cells have improved metabolic systems and they express stress response genes in order to decrease the damage caused during the stress, but to the best of our knowledge, there are no published works exploring the effect of oxidants and prooxidants, such as  $H_2O_2$  and menadione, during growth. In this article, we describe the behavior of *Kluyveromyces marxianus* isolated from spontaneous mezcal fermentation during oxidative stress, and compared it with that of *Saccharomyces cerevisiae* strains that were also obtained from mezcal, using the W303-1A strain as a reference. *S. cerevisiae* strains showed greater viability after oxidative stress compared with *K. marxianus* strains. However, when the yeast strains were grown in the presence of oxidants in the media, *K. marxianus* exhibited a greater ability to grow in menadione than it did in  $H_2O_2$ . Moreover, when *K. marxianus* SLP1 was grown in a minibioreactor, its behavior when exposed to menadione was different from its behavior with

$H_2O_2$ . The yeast maintained the ability to consume dissolved oxygen during the 4 h subsequent to the addition of menadione, and then stopped respiration. When exposed to  $H_2O_2$ , the yeast stopped consuming oxygen for the following 8 h, but began to consume oxygen when stressors were no longer applied. In conclusion, yeast isolated from spontaneous mezcal fermentation was able to resist oxidative stress for a long period of time.

**Keywords** Yeast · Oxidative stress · Mezcal · Spontaneous fermentation · Respiration · México

### Introduction

Mezcal is a distilled alcoholic beverage derived from the fermented and cooked core of different agave species (*Agave salmiana*, *Agave angustifolia*, *Agave cupreata*, *Agave duranguensis*, and *Agave tequilana*) that is produced within a limited region of México (NOM-070-SCFI 1997). Mezcal is produced by means of an unaltered handcrafted process that is several centuries old. The mezcal process can be divided into six principal stages: agave harvesting; cooking; milling; fermentation; distilling, and bottling (Gschaedler et al. 2004). Agave species have oligofructans that are hydrolyzed during the cooking stage using stone ovens (a hole in the ground, filled with stones, heated with wood, and covered with soil) (Lappe-Oliveras et al. 2008). The temperature is not well controlled and the other variables of this stage are dependent on the particular methods of each production house. Higher levels of mallard and caramel compounds are frequently found in cooked agave. In the next stage, the cooked agaves are manually shredded to obtain the fiber, which is placed in fermentation tanks with no water. For 2–10 days, the fiber is maintained in the

M. Arellano-Plaza · R. Noriega-Cisneros ·  
M. Clemente-Guerrero · S. Manzo-Ávalos ·  
A. Saavedra-Molina (✉)  
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad  
Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3, C.U.,  
58030 Morelia, Michoacán, Mexico  
e-mail: saavedra@umich.mx

M. Arellano-Plaza · A. Gschaedler-Mathis  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del  
Estado de Jalisco, A.C., 44270 Guadalajara, Jalisco, Mexico

J. C. González-Hernández  
Instituto Tecnológico de Morelia, Morelia, Michoacán, Mexico

Published online: 17 February 2013

 Springer

tank as a spontaneous, semisolid fermentation and when the temperature increases or the fiber emits the smell of ethanol, water is added to the tank (Arellano et al. 2012). The fermentation stage takes 1–3 weeks, after which the fermented juice is distilled twice in a copper alembic still. Finally, the alcoholic proof is adjusted to 35°–50° Gay-Lussac, and finally the mezcal is bottled (Gschaedler et al. 2004).

During the fermentation stage, no commercial yeasts are used and the yeast present in the agave wort carries out natural fermentation. These yeasts are exposed to extreme conditions because the agave must possess between 200 and 350 g of reducing sugars/kg of agave fiber (Arellano et al. 2012), which causes osmotic stress, and the yeast must produce ethanol in order to decrease the osmotic stress. The agave must also contain growth inhibitors such as furfurals (Palmqvist et al. 1999), vanillin (Fitzgerald et al. 2004), and saponins (De León-Rodríguez et al. 2006; Eskander et al. 2010; Pereira da Silva et al. 2006), all of which cause stress in the yeast during fermentation. The majority of the resistant yeasts survives and grows in the fermentation tank (Pérez-Torrado et al. 2009).

Different types of environmental and physiological stress conditions constantly challenge yeasts during fermentation, such as heat shock, ethanol stress, osmotic stress, oxidative stress, and others (Cardona et al. 2007; Carrasco et al. 2001; Gille and Sigler 1995). To cope with the deleterious effects of stress, the yeast is required to develop rapid molecular responses to repair the damage and protect against further exposure to the same and other forms of stress (Carrasco et al. 2001). It is frequently assumed that synthesis of stress proteins is intended for yeast survival and its adaptation to adverse conditions; for example, the Hsp104p protein has been found to be activated during heat shock (Sánchez et al. 1992); but this protein has also been detected during ethanol stress and oxidative stress, meaning that stress proteins are not specific for just one particular stress (Kim et al. 2006). Transcription factors, such as Msn2p and Msn4p, are also involved in the recognition of activated genes during different stresses (Martínez-Pastor et al. 1996; Cohen et al. 2003; Cardona et al. 2007).

Moreover, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been utilized as a model to study how eukaryotic cells respond to stress, to understand the function of stress-induced proteins, and to explain why, in view of the high degree of evolutionary conservation of stress pathways between yeast and eukaryotic cells, this yeast can be used as a suitable model system for characterizing the stress response in more complex organisms (Estruch 2000). During stress, the yeast induces not only the proteins used to repair damaged components or to afford protection, but also metabolic enzymes, indicating that a reorganization of metabolic

fluxes is required or that it is appropriate for ensuring survival and adaptation to the stress condition (Blomberg 2000).

Yeast requires oxygen during growth, similar to other aerobic cells, including higher organisms (Ojovan et al. 2011); thus, cells can produce toxic compounds derived from molecular oxygen, which are known as reactive oxygen species (ROS). High levels of these compounds result in oxidative stress. Among ROS compounds we find the superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and the hydroxyl radical ( $OH^\cdot$ ), which cause damage to different cell macromolecules (lipids, proteins, and DNA) that have been associated with a number of human diseases (Halliwell and Gutteridge 2007). The cells have developed a highly regulated complex of enzymes and compounds as antioxidant defenses; mainly superoxide dismutase (SOD), catalase (Cat), glutathione reductase (Grx), thioredoxins (Trx), glutathione, and carotenoids. These enzymes and compounds reduce the ROS produced by the cell to non-lethal levels. Antioxidant capacity, gene activation, and cascade signaling during oxidative stress have been developed in different cells, such as in yeast (Cyrene et al. 2010; Jamieson 1992; Westwater et al. 2005). Experiments have been developed to study antioxidant capacity in vitro, employing compounds such as  $H_2O_2$ , menadione, paraquat, cumen hydroperoxide, *t*-butylhydroperoxide,  $Fe^{2+}$  ( $FeSO_4$ ), etc.

Indigenous mezcal yeasts are under constant stress during fermentation (Arellano et al. 2012) and they have developed an adaptation system to survive that condition. The aim of this work was to establish the mezcal yeast capacity for undergoing oxidative stress at different stages of aerobic growth (exponential, stationary, and late-stationary) in comparison with the *S. cerevisiae* W303-1A reference strain, to determine the yeast's growth capacity after an oxidative stress event and its physiological behavior during oxidative stress in the presence of the oxidants menadione and  $H_2O_2$ . Our results indicate that to apply oxidative stress, it is also necessary to know the amount of time required for the desired effect—not just the time needed for viability or cell growth—and these must be the parameters used for evaluating the oxidative stress that is produced.

## Materials and methods

### Yeast strains and media

Yeast strains were obtained from the culture collection of the CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, México) (Gschaedler et al. 2004) and from the ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). CIATEJ

**Table 1** Yeasts isolated in spontaneous mezcal fermentations

Yeast strain	Specie	Mexican state
MC4	<i>S. cerevisiae</i>	Oaxaca
OFF1	<i>K. marxianus</i>	Guerrero
SLP1	<i>K. marxianus</i>	San Luis Potosí
W303-1A	<i>S. cerevisiae</i>	Reference strain (ATCC 208352)

yeast strains were isolated from spontaneous mezcal fermentation in different Mexican states (Table 1).

All of the yeast strains were grown for 12 h at 30 °C and 250 rpm in a YPD medium (yeast extract 1 %, bacteriological peptone 2 %, and glucose 2 %; DIFCO); the yeasts were then collected, washed twice with salt solution (0.75 %), and finally added to a glycerol-water solution (50/50) and maintained at −70 °C until use.

#### Effect of oxidative stress on yeast viability during different growth phases

Oxidative stress was applied as described (Thorpe et al. 2004), with some modifications. Briefly, yeast strains were grown in Erlenmeyer flasks in a YPD medium for 24 h at 30 °C and 250 rpm; the yeasts were then collected and inoculated  $1 \times 10^7$  cell/mL in a fresh YPD medium. The culture was incubated for 72 h under the same conditions, and samples were taken at 12, 24, 48, and 72 h. The cells for each sample were quantified by the Neubauer chamber; then,  $1 \times 10^7$  cells/mL were inoculated into fresh media and either menadione sodium bisulphate (Sigma) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) was added, as previously noted for each experiment. After 3 h, the yeasts were counted and the colony forming units (CFU) were determined (Demasi et al. 2006).

#### Effect of oxidative stress on growth rate

The yeast strains were grown as previously mentioned, but in this case, the yeasts were inoculated into microplates with fresh YPD, to which we added 0, 10, 50, 100, and 200 mM of menadione sodium bisulphate (Menadione) or the same concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Work volume was 200 µL and optic density (OD) was evaluated at 600 nm every hour for 8 h in Lexmark microplate readings. From these results, the rate growth was calculated according to the logistic method. Each experiment was done in triplicate for the statistical analysis.

#### Respiratory capacity during oxidative stress with menadione or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

The yeasts were grown for 24 h in a YPD medium at 30 °C and 250 rpm. The yeast was then collected and inoculated  $1 \times 10^7$  cells/mL in a 150-mL minibioreactor with a

working volume of 100 mL of YPD medium at 30 °C; a stirrer speed of 500 rpm and an airflow rate of 0.10 l/min were added. The minibioreactors were equipped with pH and dissolved oxygen sensors (Applikon), which were connected to an Applikon AD1030 biocontroller on a computer with bioexpert software to obtain online data. The exhaust gases were monitored with bluesens O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> sensors, and the data were obtained with Bacvis software. After the yeast was inoculated, the process continued for 3 h to allow the yeast to adapt; then, either 50 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 100 mM of menadione sodium bisulphate was added. Samples were taken for 24 h and analyzed for OD at 600 nm using the cell count obtained with a Neubauer chamber and the reducing sugars obtained through a modified Miller method.

## Results

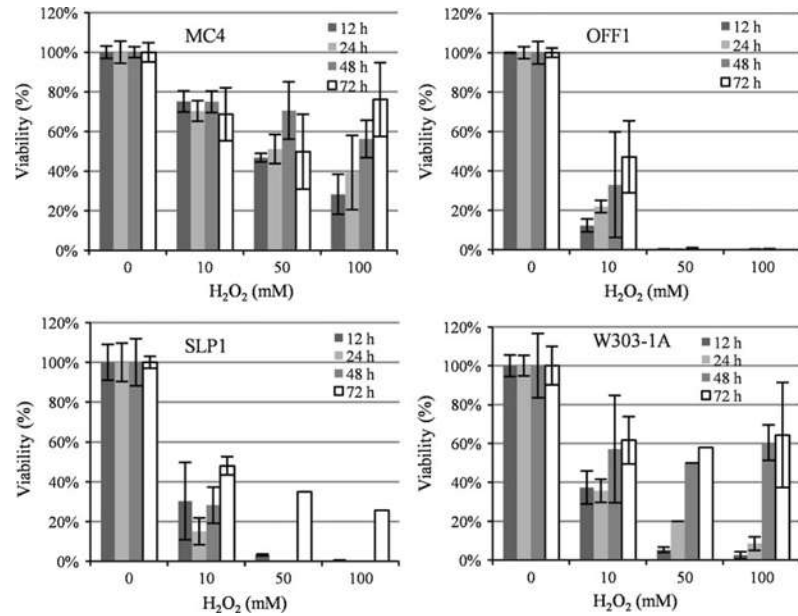
#### Effect of oxidative stress on yeast viability during different growth phases

In order to determine the effect of oxidative stress at different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and menadione in *Kluyveromyces marxianus* and *S. cerevisiae* yeast isolated from the mezcal process at different growth phases (12, 24, 48 and 72 h), viability was determined after the oxidants were added. All the yeast grew up with almost 100 % of viability when no oxidant was present, but when 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to the samples, the viability decreased more than 70 % at 24 and 48 h. Additionally, at 50 mM and 100 mM the viability decreased more than 99 %.

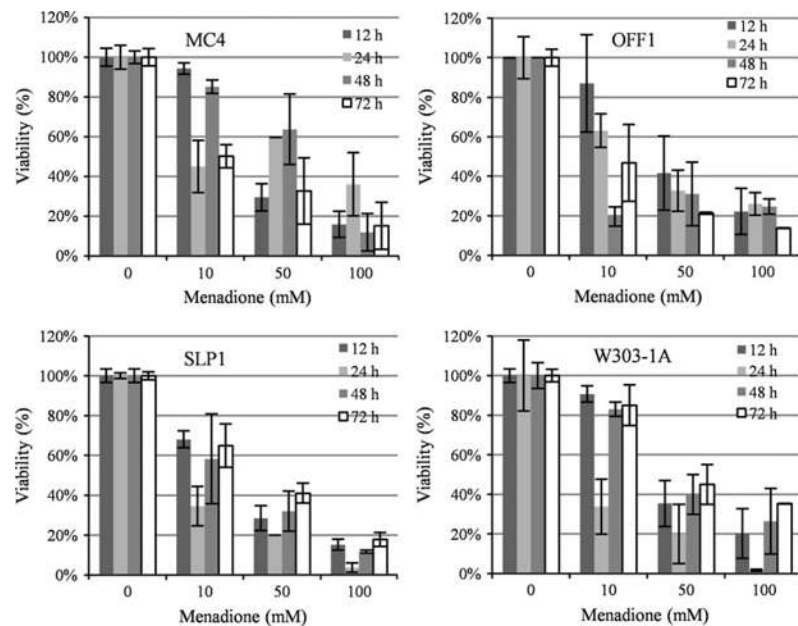
The effect of the oxidants was dose-dependent, because viability decreased as the concentration increased (Figs. 1, 2). All of the yeast species tested were more resistant to menadione than to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but *S. cerevisiae* was more resistant than *K. marxianus*; the MC4 strain isolated from the mezcal process was the most resistant. Its viability decreased only 70 % at 100 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during the exponential phase (12 h of growth), and the oxidant effect was reduced during the stationary phase (48 and 72 h of growth). *K. marxianus* showed little difference between strains because the OFF1 strain was more resistant at 10 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in all of the growth stages (Fig. 1), while the viability of the SLP1 strain increased during the stationary phase at 72 h.

As previously mentioned, the effect produced with menadione was dosage-dependent and it did not produce high oxidative stress, as did H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 2). Viability was >10 % at 100 mM of menadione in all of the stages of growth. The oxidative stress produced by menadione demonstrated that the late-stationary phase (72 h) was not any more resistant than the earlier stages.

**Fig. 1** Cell viability after an oxidative stress event using  $H_2O_2$  at different concentrations (0, 10, 50, and 100 mM) in autochthonous yeast *S. cerevisiae* (MC4), *K. marxianus* (SLP1 and OFF1), and the *S. cerevisiae* (W303-1A) reference strain in different stages of growth



**Fig. 2** Cell viability after an oxidative stress event using  $H_2O_2$  at different concentrations (0, 10, 50, and 100 mM) in autochthonous yeast *S. cerevisiae* (MC4) and *K. marxianus* (SLP1 and OFF1) in different stages of growth



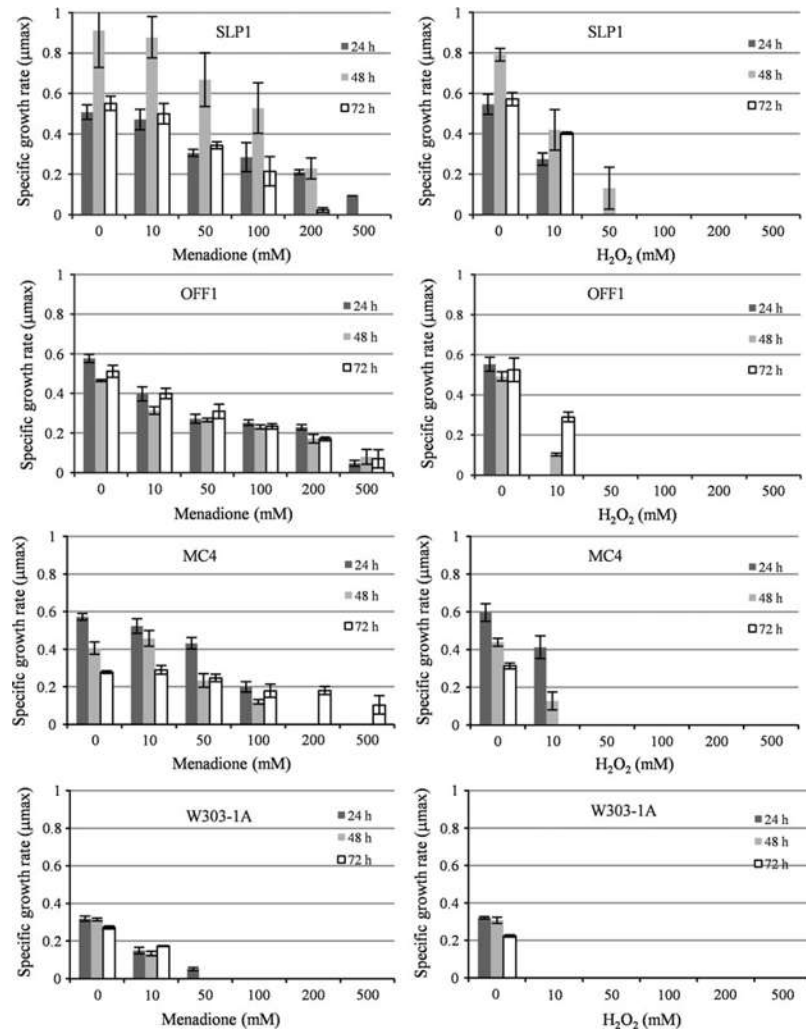
#### Effect of oxidative stress on the growth rate

Because the oxidative stress produced by  $H_2O_2$  and menadione did not decrease viability by >99 %, we needed to

determine whether the oxidants had an effect on the growth rate. The yeasts were inoculated into an YPD medium and different concentrations of menadione or  $H_2O_2$  were added (0, 10, 50, 100, and 200 mM). Then, OD was evaluated at



**Fig. 3** Specific growth rate of *K. marxianus* (SLP1 and OFF1) and *S. cerevisiae* (MC4 and W303-1A) during oxidative stress at different concentrations of menadione and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Oxidative stress was produced in yeast collected at different stages of growth

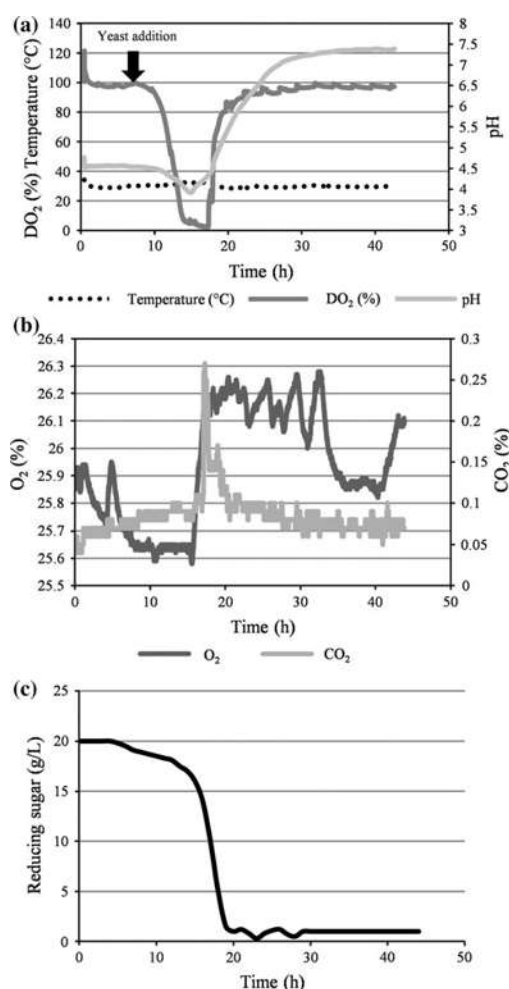


600 nm every hour for the next 8 h. The growth rate was calculated and the results are shown in Fig. 3. The oxidative stress was dosage-dependent and, surprisingly, the yeast had the capacity to grow with the oxidants. The most resistant yeast was *K. marxianus* SLP1, which was able to increase OD at 200 mM of menadione and 50 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Moreover, all of the autochthonous mezcals yeasts possessed the capacity to grow at higher concentrations of menadione.

#### Respiratory capacity during oxidative stress

The yeasts were able to grow at different oxidant concentrations, as previously mentioned, leading us to pose the

following question: If the yeast can grow, is it possible to change the respiration in a culture medium containing oxidants? To answer this question, microbioreactors were designed to evaluate oxygen consumption, pH, glucose, and OD during growth. Figure 4 depicts the results obtained without the addition of oxidants. When the process began, the sensors were maintained constant and the yeast was then inoculated. It is clear that the dissolved oxygen was consumed during the following 8 h and that the pH decreased to 3.9; subsequently the dissolved oxygen increased, probably because the yeast stopped the respiration process. However, the pH increased to nearly 7.0; this effect was not detected using *S. cerevisiae* (data not shown). The pH in this case only increased to 5.0. Other



**Fig. 4** Respiratory capacity and sugars consumed using a *K. marxianus* strain SLPI. **a** Temperature, dissolved oxygen, and pH behavior during growth in a minibioreactor (the arrow indicates the time at which the yeast was inoculated). **b** Behavior of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in exhaust gases during growth in a minibioreactor. **c** Reducing sugars during growth

variables were measured; such as O<sub>2</sub> percentage and CO<sub>2</sub> in exhaust gases. CO<sub>2</sub> increased and sugars were consumed at high rates only when the dissolved oxygen decreased 8 h after the experiment was started. At that point, CO<sub>2</sub> was not detected at high concentrations and there were no sugars.

Figure 5 illustrates the results obtained when the oxidants menadione and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added. Menadione was observed to exert a different effect than H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. When menadione was added, the yeast continued to consume oxygen, but after some time (5 h for the 24-h inocula, 10 h

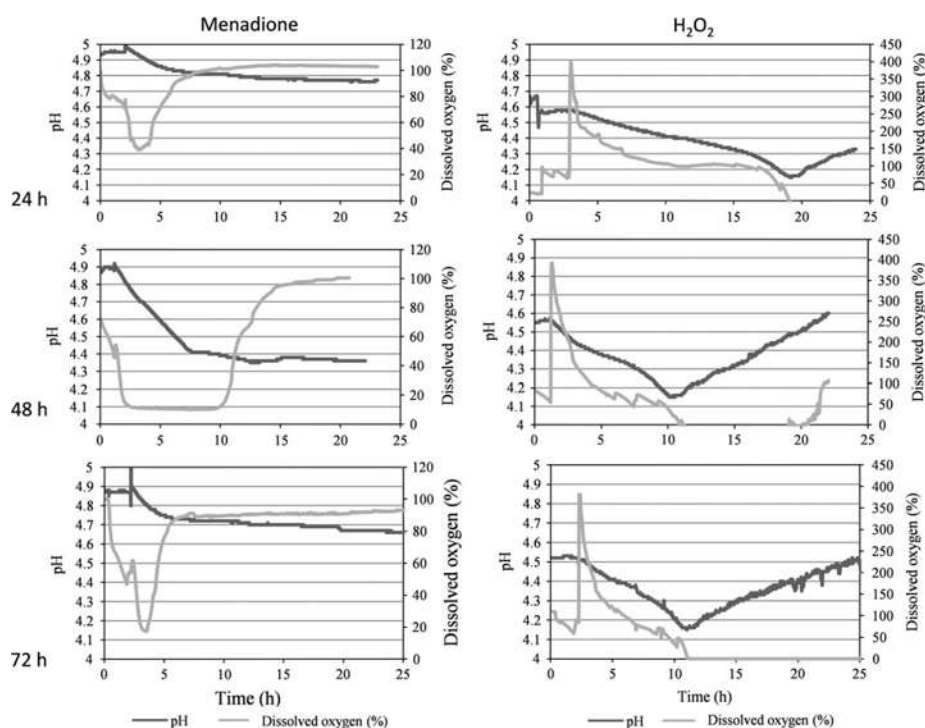
for the 48-h inocula, and 4 h for the 72-h inocula), respiration stopped. The pH decreased during the first hours after menadione was added, and when the dissolved oxygen increased to nearly 100 %, the pH was stable at an acidic pH.

When hydrogen peroxide was added to the culture, dissolved oxygen increased by nearly 400 %, a few minutes after the oxidant was added. The dissolved oxygen decreased slowly over the next 8 h, but then it was consumed, similarly to when oxidants were not added to the culture. In this case, the pH decreased during the first half of the experiment and then increased. pH behavior was similar to the conduct when no oxidants were added, but it did not increase to pH 7.

## Discussion

During spontaneous fermentation, yeast cells are affected by different stress conditions. Improvement under these conditions can be a useful way to obtain better fermentative behavior, and according to the literature, these conditions can affect growth capacity and consequently, fermentation. In order to determine the effect of oxidative stress on *K. marxianus* and *S. cerevisiae* strains isolated from mezcals production facilities and to compare it with that of *S. cerevisiae* W303-1A, we developed a strategy to ascertain the yeast's behavior during oxidative stress. Viability has been used to evaluate resistance to oxidative stress (Gershon and Gershon 2000). In some works, oxidants were added to the solid media and inoculated with the yeast (Thorpe et al. 2004). In others, minidisks with solutions containing the oxidants have been employed (Carrasco et al. 2001). In this study, we attempted to use these strategies to analyze an oxidative stress event (data not shown), but the effect with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not reproducible and sometimes we were unable to reduce the viability. To cause a desired effect, we used YPD liquid media and prior to the yeast inoculations, we added the oxidants before the yeast inocula. This methodology provided us with reproducible results, showing the need to establish the correct method for evaluating oxidative stress, principally with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, because it is volatile and has a short lifetime.

Viability decreases linearly when oxidant concentration is increased, but resistance to oxidative stress increases during the stationary phase (48 and 72 h). Under these conditions, it was necessary to add 100 mM of menadione and 50 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to decrease viability to 20 %. These results are contrary to those obtained by others who have performed similar studies (Rodríguez-Manzanique et al. 1999; Kim et al. 2006); those authors used a lower concentration of menadione and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to decrease viability. However, the results concur with those of Dellomonaco



**Fig. 5** Respiratory capacity for *K. marxianus* SLP1 yeast during oxidative stress with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50 mM) and menadione (100 mM). The yeasts were collected at different stages of growth

et al. (2007) and Pinheiro et al. (2002), who utilized 50 mM of hydrogen peroxide to produce a small amount of oxidative stress in *K. marxianus*, and viability was <70 %. However, cell viability only shows the cells that survive after treatment (in those studies, 3 h after the addition of menadione or  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). To determine whether the yeast has the ability to grow in the presence of the oxidant in the medium, we developed an experiment in which oxidants were added and growth was determined. The results showed that the yeast strain was able to grow in nearly all of the menadione treatments, but it could only grow at 10 mM in the  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatments. The *K. marxianus* strain was more resistant than the *S. cerevisiae* strains, and the weakest was the W303-1A reference strain, signifying that the yeast isolated from the mezcal possesses an antioxidant system that can be activated to decrease cell damage and to grow. The growth phase played a different role in the yeasts (Romano et al. 2006). For example, the OFF1 and W303-1A strains were not significant in this regard; but the growth phase was significant for the SLP1 and MC4 strains. Menadione and  $\text{H}_2\text{O}_2$  have been used to produce oxidative stress, and it is known that they induce different

cell responses (Flattery-O'Brien et al. 1993). At 72 h the yeast shown a different behavior, because has the ability to grow after an oxidative stress in the presence of 50 and 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , thus it is possible that the yeast induced the antioxidant system by decreasing the effect of the oxidant. As is mentioned by Zakrajsek et al. (2011) during the stationary phase the yeast show high stability in the oxidation levels and consequently in the cell energy metabolic activity. Moreover, the yeast capacity to obtain resistance is the capacity of maintains the oxidation in levels to let the yeast live for more time. Finally, a study by Joon et al. (1995) in *Schizosaccharomyces pombe*, found a correlation between the increase in resistance to oxidative stress at later growth phase with an increase in the antioxidant enzymes activities. The addition of non-lethal concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  or thermal shock prior to lethal levels of oxidants such as menadione or  $\text{H}_2\text{O}_2$  supplies the yeast with resistance (Stephen and Jamieson 1997). In its natural environment during the mezcal process, the yeast frequently undergoes high temperatures and has elevated sugar concentrations and antimicrobial compounds from the agave juice (such as furfural and saponins, etc.)

(Palmqvist et al. 1999; De León-Rodríguez et al. 2006). It is probable that the stress produced during fermentation provides the yeasts with resistance to the higher concentrations of menadione and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Moradas-Ferreira et al. 1996), such as those obtained in this study.

The results obtained show a different behavior of the yeast strain when the oxidative stress is produced in short period (Figs. 1, 2), compared to a long period (Fig. 3). The survival yeasts after 3 h of oxidative stress has the capacity to grow, but when the oxidant is maintained in the media the yeasts could not grow. The capacity of growth during the oxidative stress was different in each yeast strain, because the ability to activate cell protection mechanisms to adapt to environmental changes and to repair the cellular components damaged. Kim et al. (2006) and others has reported that trehalose is produced in high concentrations during the oxidative stress and this component could be guarding cell membranes by lipid peroxidation (Herdeiro et al. 2006). Simultaneously, the antioxidant enzymes and all the defense systems are activated to maintain not only the viability and inclusive to grow during the oxidative stress.

The respiration patterns in *K. marxianus* demonstrated that menadione produces a slow oxidative stress because the yeast retained the dissolved oxygen consumed during the first 4 h after the addition of the oxidants; the dissolved oxygen even increased slowly until 100 % recovery. During this time, the yeast grew and its population increased, but it finally stopped consuming oxygen and the pH remained constant, probably indicating that it was unable to survive after that. In contrast, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced an effect only during the first 12 h; afterward, the yeast was able to consume oxygen and to produce the same change in pH as when oxidants were not added to the media, indicating that the yeast could grow. It has been demonstrated that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased the ATP levels, but that menadione did not (Osorio et al. 2003). Hydrogen peroxide affects the oxygen consumed; the ATP levels then decreased because the electron transport chain had no oxygen to produce ATP. Moreover, the addition of non-lethal levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prior to an oxidative stress event increased the yeast's resistance, but this did not occur with menadione (Flattery-O'Brien et al. 1993). This treatment could not be effective because the exposure time to menadione was 1 h, and in our case, the test time was increased to 4 h in order for the yeast to gain resistance.

These results indicate that to apply oxidative stress, it is necessary to know the amount of time required for the desired effect, and not only that which is necessary for viability or cell growth; these must be the parameters for evaluating the oxidative stress produced. The behavior of the oxygen consumed and the pH could be used to describe the status of oxidative stress in the yeast. And finally, we demonstrated that the yeast isolated from spontaneous

mezcal fermentation was able to resist oxidative stress for a long period of time.

**Acknowledgments** The authors appreciate the partial economic support from the Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH to AS-M (2.16), to SM-A (2.37), and from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México to AS-M (169093). The authors would also like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México (CONACYT) for the grant that made this study possible.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Arellano M, Gschaedler A, Alcazar M (2012) Major volatile compounds analysis produced from mezcal fermentation using gas chromatography equipped headspace (GC-HS), gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications. In: Salih B, Çelikbiçak Ö (eds) InTech. pp 73–88. ISBN: 978-953-51-0127-7
- Blomberg A (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. FEMS Microbiol Lett 182:1–8
- Cardona F, Carrasco P, Pérez-Ortín J, del Olmo M, Aranda A (2007) A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. Int J Food Microbiol 114:83–91
- Carrasco P, Querol A, del Olmo M (2001) Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. Arch Microbiol 175:450–457
- Cohen T, Lee K, Rutkowski H, Strich R (2003) Ask10p mediates the oxidative stress-induced destruction of the *Saccharomyces cerevisiae* C-type cyclin Ume3p/Srb11p. Eukaryot Cell 2:962–970
- Cyrne L, Antunes F, Sousa-Lopes A, Diaz-Bérrio J, Marinho S (2010) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is largely unresponsive to low regulatory levels of hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Biochem 11:49
- De León-Rodríguez A, González-Hernández L, Barba de la Rosa P, Escalante-Minakata P, López M (2006) Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. J Agric Food Chem 54:1337–1341
- Dellomonaco C, Amaretti A, Zanon S, Pompei A, Matteuzzi D, Rossi M (2007) Fermentative production of superoxide dismutase with *Kluyveromyces marxianus*. J Ind Microbiol Biotechnol 34:27–34
- Demasi A, Pereira G, Netto L (2006) Yeast oxidative stress response. Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. FEBS J 273:805–816
- Eskander J, Lavaud C, Harakat D (2010) Steroidal saponins from leaves of *Agave macrocarantha*. Fitoterapia 81:371–374
- Estruch F (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. FEMS Microbiol Rev 24:469–486
- Fitzgerald DJ, Stratford M, Gasson MJ, Ueckert J, Bos A, Narbad A (2004) Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. J Appl Microbiol 97:104–113
- Flattery-O'Brien J, Collinson LP, Dawes IW (1993) *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. J Gen Microbiol 139:501–507

- Gershon H, Gershon D (2000) The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. *Mech Ageing Dev* 120:1–22
- Gille G, Sigler K (1995) Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol* 40:131–152
- Gschaedler A, Ramírez J, Díaz D, Herrera E, Arrizón J, Pinal L, Arellano M (2004) Fermentación. En: *Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas*. CIATEJ, Guadalajara, Jalisco, México, pp 61–120
- Halliwell B, Gutteridge C (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Oxford University Press, Oxford, pp 488–613
- Herdeiro RS, Pereira MD, Panek AD, Eleutherio EC (2006) Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1760:340–346
- Jamieson DJ (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol* 174:6678–6681
- Joon L, Ian WD, Jung-Hye R (1995) Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. *Microbiology* 141:3127–3132
- Kim IS, Moon HY, Yun HS, Jin I (2006) Heat shock causes stress and induces a variety of cell rescue proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *J Microbiol* 44:492–501
- Lappe-Oliveras P, Moreno-Terrazas R, Arrizón-Gaviño J, Herrera-Suárez T, García-Mendoza A, Gschaedler-Mathis A (2008) Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res* 8:1037–1052
- Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15:2227–2235
- Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W (1996) The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* 19:651–658
- NOM-070-SCFI-1997 (1997) *Bebidas alcohólicas, Mezcal-Especificaciones*. SCFI, México, DF, pp 2–31
- Ojovan SM, Knorre DA, Markova OV, Smirnova EA, Bakeeva LE, Severin FF (2011) Accumulation of dodecyltriphenylphosphonium in mitochondria induces their swelling and ROS-dependent growth inhibition in yeast. *J Bioenerg Biomembr* 43:175–180
- Osorio H, Carvalho E, del Valle M, Günther-Sillero A, Moradas-Ferreira P, Sillero A (2003) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not menadione, provokes a decreased in the ATP and increase in the inosine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. An experimental and theoretical approach. *Eur J Biochem* 270:1578–1589
- Palmqvist J, Almeida S, Hahn-Hägerdal B (1999) Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *S. cerevisiae* in bath culture. *Biotechnol Bioeng* 62:447–454
- Pereira da Silva B, Valente AP, Paz Parente P (2006) A new steroidal saponin from *Agave shrevei*. *Nat Prod Res* 20:385–390
- Pérez-Torrado R, Gómez-Pastor R, Larsson C, Matallana E (2009) Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:951–960
- Pinheiro R, Belo I, Mota M (2002) Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:842–847
- Rodríguez-Manzanique MT, Ros J, Cabisco E, Sorribas A, Herrero E (1999) Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19:8180–8190
- Romano P, Capece A, Jespersen L (2006) Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. In: Querol A, Fleet G (eds) *Yeasts in food and beverages*. Springer, Berlin, pp 13–53
- Sánchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J* 11:2357–2364
- Stephen S, Jamieson DJ (1997) Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene by hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* 23:203–210
- Thorpe GW, Fong CS, Alic N, Higgins VJ, Dawes IW (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6564–6569
- Westwater C, Balish E, Schofield DA (2005) *Candida albicans* conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing. *Eukaryot Cell* 10:1654–1661
- Zakrajsek T, Raspor P, Jamnik P (2011) *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism—characterization at cellular and proteome level. *J Proteomics* 74:2837–2845

## **6. Capítulo 2:**

### **Capacidad antioxidante de la levadura *Kluyveromyces marxianus* a un estrés oxidativo durante la fase estacionaria**

En el segundo capítulo se presenta la metodología y los resultados obtenidos que serán publicados en el artículo “**Antioxidant capacity of *Kluyveromyces marxianus* yeast to oxidative stress during different grown phases**” Melchor Arellano-Plaza, Anne Gschaedler-Mathis, Ruth Noriega-Cisneros, Mónica Clemente-Guerrero, Salvador Manzo-Ávalos, Rocío Montoya-Pérez, and \*Alfredo Saavedra-Molina . El artículo será enviado a la revista The journal of microbiology.

## 6.1 Title

Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* during stationary phase

## 6.2 Abstract

The aim of this work was study the oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* (SLP1) induced for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or menadione, compared with *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1A). The lipid oxidation was higher with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to menadione in both yeasts. The SOD, catalase and GRx activity were evaluated and showed the *K. marxianus* had more activity than *S. cerevisiae*. The growth phase increased the antioxidant enzymes activity principally the GRx and the glutathione total. The yeast adaptation to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and menadione was associated with GRx activity because increased the activity and also the glutathione total was higher. The comparison between *K. marxianus* and *S. cerevisiae*, demonstrate each one activate the antioxidant system in different ways, and the effect was minimal in *K. marxianus*. The results obtained shown the suitable of this yeast to be used in stress process.

## 6.3 Introduction.

*Kluyveromyces marxianus* is yeast specie frequently isolated from dairy processes and during spontaneous fermentation for alcoholic production. This yeast have shown potential for industrial applications because has be considered as generally regarded as safe (GRAS). Moreover, for the capacity to produce enzymes as: inulinases,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase among others (Fonseca *et al.* 2008). The *K. marxianus* has been used for ethanol production from different substrates as sugar cane juice (Limtong *et al.* 2007), lactose from the whey (Christensen *et al.* 2011), inclusive has the ability to produce inulinases enzymes, has be used for ethanol production using Jerusalem artichoke inuline making simultaneous saccharification-fermentation (Hu *et al.* 2012) and using cellulosic material (cellobiose and  $\beta$ -glucano) after a transformation to produce  $\beta$ -glucosidase and endoglucanases for ethanol production (Yanase *et al.* 2010). *The K. marxianus* has been

used for the aroma volatile compounds production as fruit esters, carboxylic acids ketones, furans higher alcohols etc. (Fabre et al 1995) in liquid fermentations, used for food and cosmetics products, but also is important for alcoholic beverages and has been used for tequila (Amaya-Delgado *et al.* 2013), mezcal (Arellano *et al.* 2012), wine and others, because the ability to produce fruity compounds.

However, there is relatively little known about the diversity in this species, at the genetic, metabolic or physiological levels. This yeast species is Crabtree negative, thermotolerant and short generation time, in contrast to *S. cerevisiae* (Wittmann *et al.* 2002; Fonseca *et al.* 2008). As aerobic yeast, the *Kluyveromyces marxianus* can produce reactive oxygen species (ROS), but under normal physiological conditions, antioxidant defense mechanism is activated to maintain the ROS at basal levels (Moradas-Ferreira *et al.* 1996). Moreover, Pinheiro *et al.* (2002) studied the oxidative stress response in *K. marxianus* using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, paraquat and air pressure of 120 kPa or 600 kPa during the exponential growth phase, the enzymatic activity in the superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GRx) increased in all conditions tested.

Increased knowledge about adaptation mechanisms in yeasts and to oxidative stress protection is fundamental, because the yeast has been used as a model of aging research (Paraella and Longo, 2008; Murakami and Kaeberlein, 2009) and in human pathologies (Petranovic and Nielsen, 2008). The *K. marxianus* is an excellent model because it has not caloric restriction decreasing longevity and also the *K. marxianus* are Crabtree negative, is relevant for improving the understanding of defense mechanisms in different yeast species with different respiratory capacity. In order to learn more about the response of *K. marxianus* to oxidative stress, in this work we evaluated the antioxidant enzymes activity using different ROS generating agents during different growth phases (exponential and stationary).



## **6.4 Materials and Methods**

### **6.4.1 Yeast strains and maintenance.**

The yeast *Kluyveromyces marxianus* SLP1 used in this study was obtained from the CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC) collection of microorganism bank. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A were used as control. The yeasts were kept frozen -80°C in cryovials and were activated by inoculation into plates YPD agar (peptone 2%, glucose 2%, yeast extract 1% and agar 3.5%, pH 4.5) and maintained at 4°C.

### **6.4.2 Oxidative stress conditions**

Preculture with YPD liquid medium was prepared and inoculated a single colony from YPD plate and incubated at 30°C, with shaking at 250 rpm for 24 h. Oxidative stress was applied as described (Arellano *et al.* 2013), briefly, yeast strains were grown in Erlenmeyer flasks in a YPD medium for 24 h at 30°C and 250 rpm; the yeasts were then collected and inoculated  $1 \times 10^7$  cell/mL in a fresh YPD medium. The culture was incubated for 72 h under the same conditions, and samples were taken at 12, 24, 48, and 72 h. The cells for each sample were quantified by the Neubauer chamber; then,  $1 \times 10^7$  cells/mL were inoculated into fresh media and either menadione sodium bisulphate (Sigma) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) was added, as previously noted for each experiment. After 8 h, the yeasts were counted and the colony forming units (CFU) were determined (Demasi *et al.* 2006). The experiments were development for triplicate for the statistical analysis.

### **6.4.3 Preparation of cell extracts**

The samples taken during the exponential (12 and 24 h) and stationary phases (48 and 72 h), were harvested from the cultures by centrifugation (10000 rpm, 10 min), washed twice with potassium phosphate 50 mM buffer with EDTA (1 mM) and the pH were adjusted to pH 7.2. Finally, were resuspended in cold potassium phosphate buffer contained 0.5 μM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, an inhibitor of proteases), and disrupted by abrasion with 0.6 g glass beads (0.45 cm diameter) in Eppendorf tubes. The cells were broken by vigorous vibration of the tubes in a vortex mixer for 6 cycles of 45 s each. The

crude extract was then centrifugated at 10000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatant fraction obtained. Protein concentration was determined using Bradford method (1976), with bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) as standard. The supernatant were used for the enzyme assay.

#### **6.4.4 Catalase activity**

The catalase activity was determined from the decreased in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, which was estimated by measuring the optical density of the reaction mixture at 240 nm using a catalase assay kit CAT100 (sigma).

#### **6.4.5 Superoxide dismutase activity**

The superoxide dismutase (SOD) activity was determined using a SOD activity assay kit (Fluka analytical 10160). One unit of SOD activity causes a 50% inhibition of the rate of reduction of WST-1 (a water-soluble formazan, 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt) under the assay conditions.

#### **6.4.6 Glutathione reductase activity**

The glutathione reductase (GRs) activity was determined using a HT glutathione reductase assay kit (Trevigen cat 7513-500-k). The glutathione reductase was assayed by measuring the oxidation of NADPH at 340 nm in the presence of glutathione oxidized.

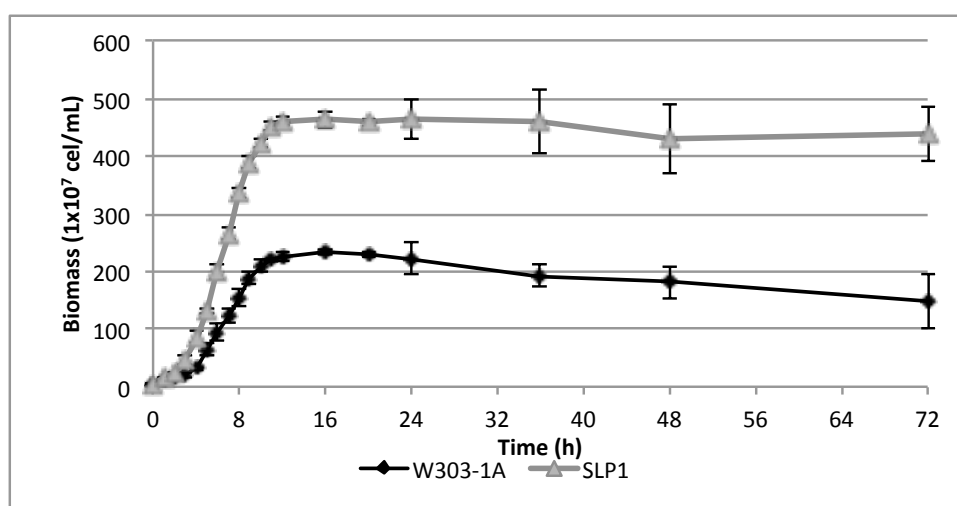
#### **6.4.7 Lipoperoxidation**

The method based on the reaction of thiobarbituric acid with reactive species derived from lipid peroxidation, particularly malondialdehyde (MDA), was used. Detection of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) was carried out by a colorimetric assay described by Buege and Aust (1978) with some modifications. Briefly, 50 mg of cells were resuspended in 500 µL of phosphate buffer 50 mM, pH 6.0, containing trichloroacetic acid 10%, and 0.3 g glass beads were added. The samples were broken by three cycles of 1 min agitation on a vortex mixer followed by 1 min on ice. After centrifugation at 5000 rpm, supernatants were mixed with 0.1 mL of EDTA 0.1 M and 0.6 mL of 1% (w/v) thiobarbituric acid in NaOH 0.05 M. The reaction mixture was incubated at 100 °C for 15

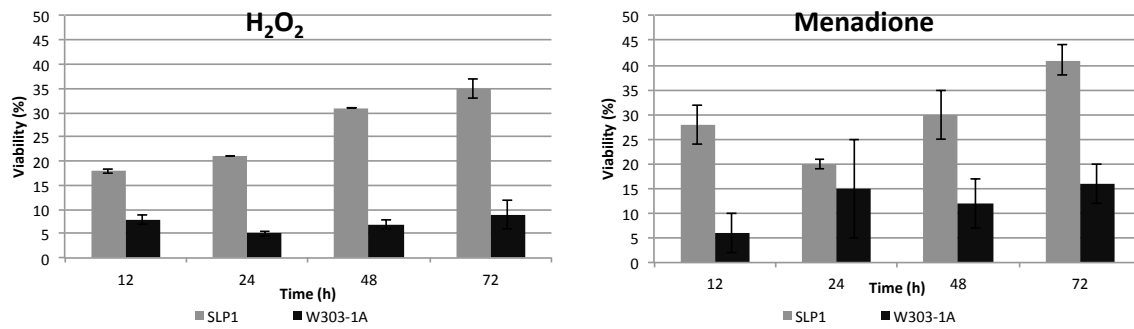
min and then cooled on ice for 5 min. The absorbance at 532 nm was measured in a spectrophotometer Perkin-Elmer. Lipid peroxidation is expressed as pmoles of malondialdehyde/mg of dry cell weight.

## 6.5 Results and discussion

In order to study thoroughly the oxidative stress response for *K. marxianus* compared with *S. cerevisiae*, the antioxidant enzyme activity in different grown phases were analyzed using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and menadione as superoxide anion producer. The figure 1 shows the growth of *K. marxianus* SLP1 and *S. cerevisiae* W303-1A during 72 h. The biomass produced and the growth rate for SLP1 were higher than the W303-1A. During the growth samples were took at 12, 24, 48 and 72 h, the yeast were collected for centrifugation, counted the cells in the microscope and  $1 \times 10^7$  cells were inoculated in YPD medium, and were added menadione or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the oxidative stress. The oxidants induced stress during 8 h. The viability after the oxidative stress is shown in the figure 2. Both yeast strains increased the viability in the stationary growth phase, but the most resistant were the *K. marxianus* in menadione. The results obtained were comparable to Biryukova *et al.* (2006) using *Yarrowia lipolitica* and for Jamieson *et al.* (1996), using *Candida albicans*, but were minor to Pinheiro *et al.* (2002) using *K. marxianus*. The difference obtained could be for the adaptation capacity of the yeast strain at the oxidative stress or the oxidative enzyme activity.

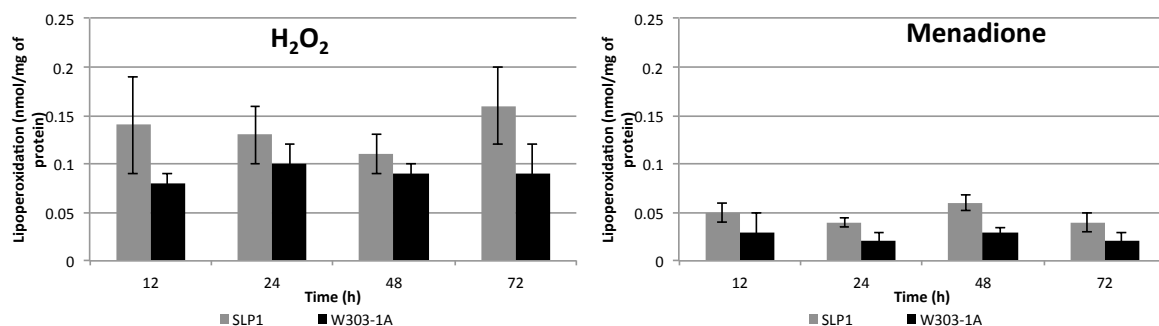


**Figure 1.** *K. marxianus* SLP1 and *S. cerevisiae* W303-1A growth in YPD medium for the oxidative stress before fermentation.



**Figure 2.** *K. marxianus* (SLP1) and *S. cerevisiae* (W303-1A) viability after oxidative stress with menadione or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in different grown phases.

To know the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or menadione in the yeasts SLP1 and W303-1A, the lipid oxidation were measured after oxidative stress, the *K. marxianus* showed more oxidation in both oxidant and were higher in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figure 3). However, the growth stage was not a factor, because the lipid oxidation was similar in all the stages. These results are contrary to the viability, while the viability increased during the stationary phase; the lipid oxidation is maintained in similar values, probably because the unsaturated lipids proportion (more oxidizable lipids) are maintained constant during all the growth stages tested (Steels *et al.* 1993; Cortes-Rojo *et al.* 2009).



**Figure 3.** Lipids oxidation after oxidative stress with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or menadione in the yeast SLP1 and W303-1A in different growth phases.

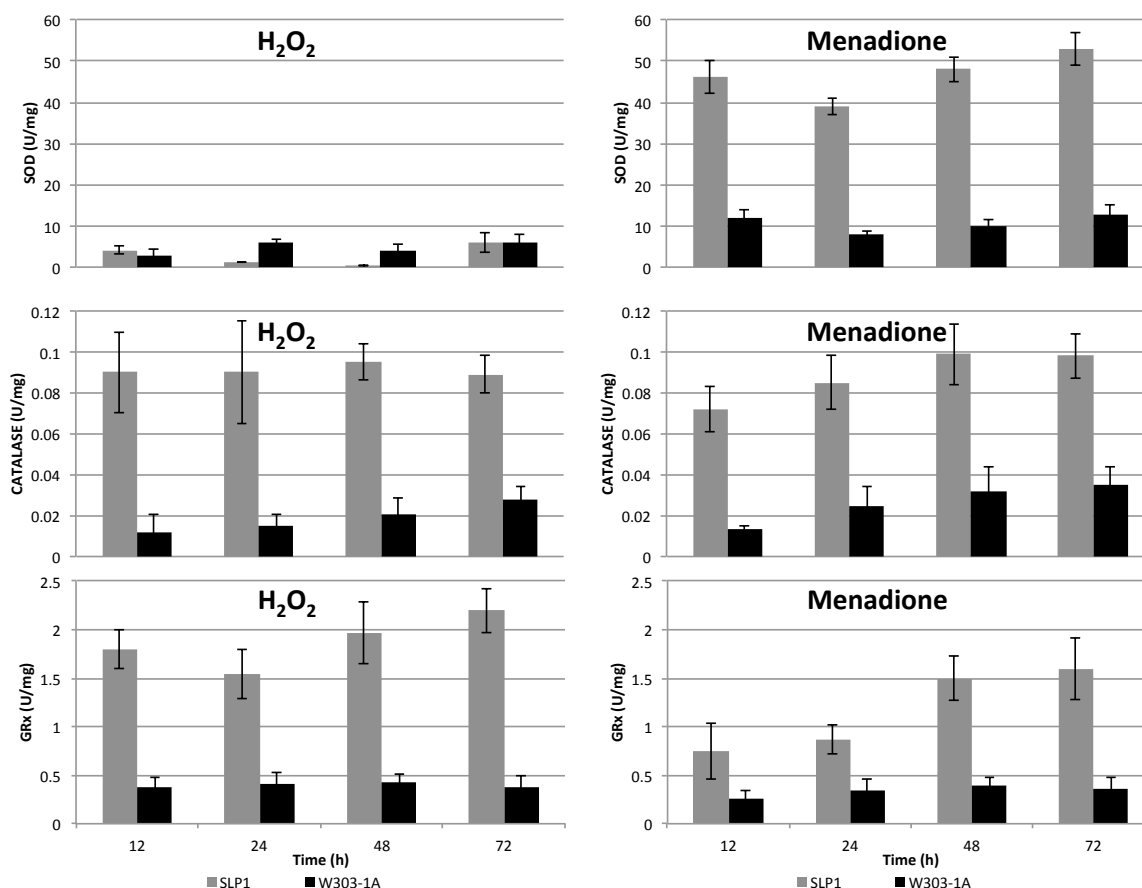
In order to compare the response mechanism for the oxidative stress in the yeast SLP1 and W303-1A, were measured the activity of three antioxidant enzymes (superoxide dismutase SOD, catalase CAT and glutathione reductase GRx) during different growth phases. The GRx are believed to scavenge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cytoplasm and mitochondria (Foyer and Halliwell,

1976); the CAT remove  $H_2O_2$  very efficiently (Scandalios, 1993); and SODs that scavenge the superoxide anion. The CAT and SOD are the most efficient antioxidant enzymes. Their combined action converts the potentially dangerous superoxide radical and hydrogen peroxide to water and molecular oxygen, thus averting cellular damage. The SOD activity was higher when the yeast strains were stressed with menadione, reaching 40 to 53 U/mg proteins, these activity were similar in *S. cerevisiae* reported for Liu *et al.* (2005) and also with Biryukova *et al.* (2006) in *Y. lipolitica*, but the SOD activity obtained for Pinheiro *et al.*, (2002) in *K. marxianus* were 2-fold higher than the obtained in this work. As the  $H_2O_2$  is the product of SOD enzyme, the yeasts no need increased the activity while the menadione produce superoxide anion it is necessary increased their activity as was observed for *K. marxianus*, but not for *S. cerevisiae*, it is probably one of the differences to the sensibility of W303-1A. The catalase activity were comparable between the oxidant used and the growth phases, but the activity were higher 3-folds in the SLP1, moreover, increased the catalase activity during the stationary phase 30%.

The glutathione reductase activity increased in *K. marxianus* with  $H_2O_2$  and was similar between the growth phases. The menadione increased the activity during the stationary phase in SLP1 yeast strain, but the activity was minor than in the  $H_2O_2$ . The W303-1A maintained the activity constant in both oxidants during the growth phase tested. The glutathione reductase activity was higher than obtained for Pinheiro *et al.* (2002), but they only tested the initial stationary phase (24 h) and the oxidant were maintained in the media for 3 h. As the glutathione reductase increased the activity, the glutathione total also increased (figure 4), and were higher with  $H_2O_2$  in both yeast, but the glutathione were 3-fold superior in *K. marxianus*.

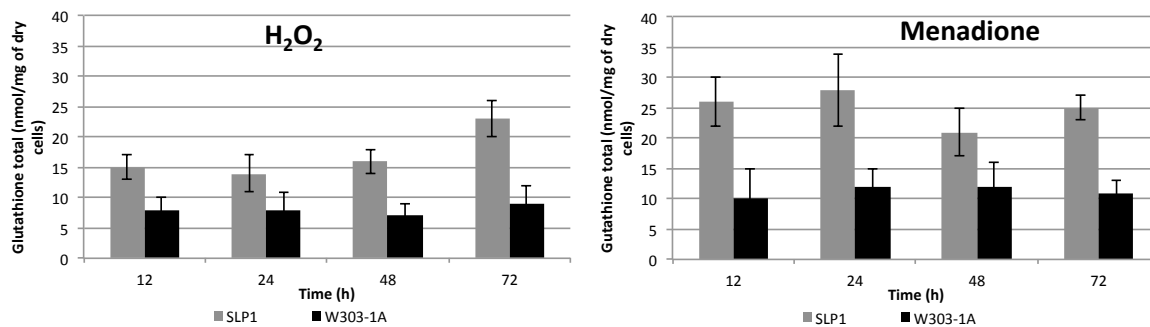
The tolerance of the yeast to oxidative stress during the stationary phase obtained in this work, were observed for Sousa-Lopez *et al.* (2004), and has been obtained in other kind of stress, including the heat shock and high ethanol levels (15% v/v) (Murray *et al.* 2011; Herrero *et al.* 2006), in different microorganisms. Moreover, the cells induce resistance to the oxidative stress using pretreatment with  $H_2O_2$  at no lethal levels (Jamieson, 1992). However, the cell adaptation with different concentrations of oxidants was not the aim of this work, because were no necessary a pretreatment, the SLP1 activated the antioxidant

system and increased during the stationary phase. High activity levels of SOD, catalase and GRx in *K. marxianus*, were obtained with menadione and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, these results shown the antioxidant activity of these three enzymes are involved in the defense against the ROS originated. Moreover, as the enzyme GRx require glutathione, then the increased in both variables could be for obtain more oxidant stress resistant for this system.



**Figure 4.** Antioxidant enzymes activity in *S cerevisiae* W303-1A and *K. marxianus* SLP1 after a oxidative stress with menadione or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in different growth phases. The activity units is: units of enzyme/ mg of proteine.

The GRx increased the activity, the glutathione total increased the activity and the catalase activity were maintained, it is possible the glutathione is recycled by the GRx and could be one mechanism used for the yeast to obtained adaptation in a similar way to Izawa *et al.* (1998). The antioxidant stress high response in *K. marxianus* suggested, that the yeast were strongly stressed in its natural habitat where was isolated and maintained activated the antioxidant enzymes more than the *S. cerevisiae*.



**Figure 5.** Glutathione total in the *K. marxianus* SLP1 and *S. cerevisiae* W303-1A, after oxidative stress using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or menadione.

Different gene markers as *Yap1* and *Skn7* increased the expression of antioxidant enzymes, although other transcriptional factors such *Msn2* and *Msn4* (Herrero *et al.* 2008). *Skn7* is used for upregulated other proteins as the thioredoxins peroxidases (TRX), but not for glutathione peroxidases (GPx), however, *Yap1* is used for both systems (Lee *et al.* 1999). The thioredoxins were no evaluated in this work, but if the glutathione reductase activity and the glutathione total increased, is possible that the antioxidant systems activation were principally for the *Yap1* (Lee *et al.* 1999). These facts must be verified by further works because does not exist information about *K. marxianus*.

## 6.6 References

Amaya-Delgado L, Herrera-López EJ, Arrizon J, Arellano-Plaza M, Gschaedler (2013) Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. World J Microbiol Biotechnol. Jan 18. [Epub ahead of print].

Arellano M, Gschaedler A, Alcazar M (2012) Major volatile compounds analysis produced from mezcal fermentation using gas chromatography equipped headspace (GC–HS), Gas Chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications, Bekir Salih and Ömür Çelikbıçak (Ed.), ISBN: 978-953-51-0127-7. InTech. pp 73-88

- Biriukova EN, Medentsev AG, Arinbasarova AIu, Akimenko VK. (2006) Tolerance of the yeast *Yarrowia lipolytica* to oxidative stress. *Microbiol* 75:293-298
- Christensen AD, Kádár Z, Oleskowicz-Popiel P, Thomsen MH (2010) Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:283-289.
- Cortés-Rojo C, Estrada-Villagómez M, Manzo-Ávalos S, Saavedra-Molina A (2009) Influencia de la peroxidación de lípidos sobre el daño oxidativo mitocondrial y la integridad de *Saccharomyces cerevisiae*. *Información Tecnológica* 20:71-81
- Fabre CE, Duviau VJ, Blanc PJ, Goma G (1995) Identification of volatile compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett* 17:1207-1212.
- Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 79:339-354.
- Herrero E, Ros J, Bellí G, Cabisco E. (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells *Biochim Biophys Acta* 1780:1217-1235.
- Hu N, Yuan B, Sun J, Wang SA, Li FL (2012) Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from Jerusalem artichoke by consolidated bioprocessing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 95:1359-1368.
- Izawa S, Maeda K, Miki T, Mano J, Inoue Y, Kimura A. (1998) Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 330:811-817
- Jamieson DJ (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol* 174:6678-6681
- Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, Toledano MB (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem*. 274:16040-16046



- Limtong S, Sringiew C, Yongmanitchai W (2007) Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresour Technol* 98:3367-3374.
- Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W (1996) The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* 19:651-658
- Murakami C, Kaeberlein M (2009) Quantifying yeast chronological life span by outgrowth of aged cells. *J Vis Exp* 6:1156
- Murray DB, Haynes K, Tomita M (2011) Redox regulation in respiring *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1810:945-958
- Parrella, E, Longo V D (2008) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease. *Methods (San Diego, Calif.)* 46:256-262
- Petranovic, D, Nielsen J (2008) Can yeast systems biology contribute to the understanding of human disease? *Trends biotechnol* 26:584-590.
- Pinheiro R, Belo I, Mota M (2002) Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:842-847
- Sousa-Lopes A, Antunes F, Cyrne L, Marinho HS (2004) Decreased cellular permeability to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Lett.* 578:152-156.
- Yanase S, Hasunuma T, Yamada R, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H (2010) Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88:381-388
- Wittmann C, Hans M, Bluemke W (2002) Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* 19:1351-1363

## 7. Capítulo 3:

### **Capacidad fermentativa de levaduras aisladas del proceso de producción del mezcal después de un estrés oxidativo**

En el tercer capítulo se presenta la metodología y los resultados obtenidos que serán publicados en el artículo “**Fermentative capacity of yeast isolated from mezcal processes after oxidative stress**” Melchor Arellano-Plaza, Anne Gschaedler-Mathis, Ruth Noriega-Cisneros, Mónica Clemente-Guerrero, Salvador Manzo-Ávalos, Rocío Montoya-Pérez, Patsy Dayana Robles-Herrera and \* Alfredo Saavedra-Molina . El artículo fue enviado a la revista Journal of industrial microbiological and biotechnological.

7.1 Title:

**Fermentative capacity of yeast isolated from mezcal processes after oxidative stress**

Authors:

<sup>1,2</sup>Melchor Arellano-Plaza, <sup>2</sup>Anne Gschaedler-Mathis, <sup>1</sup>Ruth Noriega-Cisneros, <sup>1</sup>Mónica Clemente-Guerrero, <sup>1</sup>Salvador Manzo-Ávalos, <sup>1</sup>Rocío Montoya-Pérez, Patsy Dayana Robles-Herrera and <sup>1\*</sup>Alfredo Saavedra-Molina

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas,  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,  
Edificio B-3, C.U.,  
58030 Morelia, Michoacán, México.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.,  
44270 Guadalajara, Jalisco, México

\*Corresponding author:

Alfredo Saavedra-Molina,  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,  
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Edificio B-3, C.U.,  
58030 Morelia, Michoacán, México.

Phone: (+52) (443) 326-5790, ext. 117. Fax: (+52) (443) 326-5788.

E-mail: [saavedra@umich.mx](mailto:saavedra@umich.mx)

## 7.2 Resumen

Durante la producción de biomasa de levaduras y el secado, puede activar el estrés oxidativo, debido a que el  $O_2$  es una molécula esencial para las células aeróbicas como las levaduras y debe ser adicionado al medio. Pocos estudios se han realizado para caracterizar las capacidades fermentativas de las levaduras después de un estrés oxidativo, tanto en los parámetros cinéticos fermentativos como para la producción de compuestos volátiles. Los parámetros de fermentación y ciertos compuestos volátiles de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (MC4) y dos de *Kluyveromyces marxianus* (OFF1 y SLP1) aisladas del proceso de producción del mezcal fueron evaluadas después de un estrés oxidativo con  $H_2O_2$  o menadiona y comparados con una cepa de *S. cerevisiae* como control (W303-1A). Las levaduras mostraron diferencias en la producción de etanol, rendimiento de conversión de azúcares en etanol ( $Y_{P/S}$ ) y en la velocidad máxima de producción de etanol ( $r_p$ ). En general la cepa OFF1 mostró el mejor potencial de fermentación después del estrés oxidativo, con rendimientos entre 0.424 y 0.447 y velocidad de producción máxima entre 3.15 y 3.26 g/Lh. La producción de alcoholes superiores fue diferente después del estrés oxidativo, principalmente, disminuyó la producción de alcohol amílico e incrementó la producción de isobutanol en la misma magnitud. La levadura OFF1 produjo significativamente mayor cantidad de ésteres (5 veces más) y la misma cantidad de acetaldehído fue producida en todas las fermentaciones. Estos resultados demuestran que el estrés oxidativo juega un papel importante en el perfil aromático final de las bebidas alcohólicas y es necesario contrararlo para garantizar la calidad de la fermentación.

### 7.3 Abstract

During yeast biomass production and drying, oxidative stress can be produced because O<sub>2</sub>, an essential nutrient for aerobic cells, is added to the growth medium. Few studies have been conducted on the characterization of yeasts after oxidative stress and their individual fermentation properties in volatile compound production. The fermentation parameters and certain volatile compounds of one strain of *Saccharomyces cerevisiae* (MC4) and two strains of *Kluyveromyces marxianus* (OFF1 and SLP1), isolated from small mezcal distilleries, were evaluated after an oxidative stress event with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or menadione and compared with a *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A strain. The yeasts showed significant differences in ethanol production, conversion factors of substrate into ethanol (Y<sub>P/S</sub>), and maximum ethanol production rate (r<sub>P</sub>). In general the OFF1 yeast strain showed better fermentation potential after oxidative stress, with yields between 0.424 and 0.447 and r<sub>P</sub> between 3.150 and 3.260 g/Lh. Higher alcohol production was different after oxidative stress, but the principal change was that the decrease in the quantity of amyl alcohol was the same as the increase in isobutanol. The OFF1 yeast produced a significantly larger quantity of esters (more than 5 times), and the same amount of acetaldehyde was produced in all the fermentations. These results demonstrate that oxidative stress before alcoholic beverage fermentation plays an important role in the final aroma profile, and is therefore a valuable control parameter for fermentation quality.

## 7.4 Introduction

Fermentation is defined as the biological transformation of foods by microorganisms. Alcoholic fermentation is probably the oldest biotechnological application of microorganisms. The most commonly encountered species is *Saccharomyces cerevisiae* and its different strains are known as baker's, brewer's or wine yeast [9]. Alcoholic fermentation is a dynamic process during which substrates obtained from fruits, cereals, roots, etc. are provided. Fermentation development is affected by physical factors (temperature, pH, etc) and the biological activity of the yeasts in the wort (or must). While the external environment is continually changing (temperature, pH, macronutrients, micronutrients, etc.) the yeasts must maintain their intracellular metabolisms in order to achieve optimal conditions for fermentation. Therefore, yeasts have developed numerous mechanisms allowing them to perceive changes and rapidly adapt to them, in order to maintain their metabolic activity and integrity [11]. Extreme conditions will lead to cell death or reduced growth, depending on the severity of the damage and therefore will always reduce fermentation efficiency [8]. The extreme conditions or environmental changes that elicit such an adaptive response are known as "stress", and the yeast response to those changes is referred to as the "stress response" [10].

Inoculation of a selected yeast strain into the wort is a common procedure in alcoholic beverage production [3]. The yeast selected for industrial wine production must be able to adapt well to environmental changes in order to avoid fermentation problems, such as stuck or sluggish fermentation, and the production of off-flavors by the yeast [23]. The best-studied stress responses include: temperature (hot and cold stress response) [11], essential nutrient limitation [9], osmotic stress (hyper or hypo-osmotic shock)[11], and ethanol toxicity [25], all of which are important during alcoholic fermentation [11]. Most of the

yeast strains used in the industry, are grown in media rich in nutrients adding air or oxygen and finally frozen or dried [19]. This can cause an increase in stress on the yeast through temperature, humidity, and oxidative stress, and must be taken into consideration during fermentation development.

In Mexico the traditional alcoholic beverages are tequila and mezcal, but there are others such the bacanora, the sotol, the raicilla, the henequen, etc [1]. that have been produced throughout the country for more than 200 years. Those beverages are obtained by distilling the fermented juice from different agave plants (*Agave tequilana* Weber blue variety for tequila, *Agave salmiana*, *Agave angustifolia*, *Agave cupreata*, and other agave species for mezcal) by industrial and rural distillers [5]. Fermentation can be carried out by inoculated strains of *Saccharomyces cerevisiae* but usually spontaneous fermentation, affecting the ethanol yields and volatile compound production produced. Some studies have been carried out to isolate and identify the microorganism during spontaneous fermentation [14, 24]. Others have described the factors that affect fermentation development such as temperature [4], sugar concentration [6], nitrogen concentration [20], yeast strain used [1, 5, 7], etc. The results have obtained shown the yeast capacity to be used at industrial levels [2], but the yeast must be selected according its fermentative capacities, but also its fermentative efficiency and its ability to produce the desired amounts of volatile compounds. In addition, it is necessary to study yeast stability after a stress event related to temperature, osmosis, ethanol concentration, etc. These stresses have been previously evaluated in different beverages, such as wine, beer, tequila, and others, but oxidative stress on yeast prior to fermentation has not been studied.

Oxygen is added to the yeast growth media because it is essential for aerobic

microorganisms. Oxygen can also be cytotoxic, damaging cells through the effects of the reactive oxygen species (ROS). Which are produced during normal metabolism but their creation is stimulated by different stresses, such as temperature [10], among others. Cells have developed several defense mechanisms, such as the antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Cell damage is produced when ROS production is higher than the antioxidant cell capacity [25], affecting the DNA, proteins, and lipids, and producing changes in cell physiology and morphology.

The oxidative stress response in *S. cerevisiae* has been studied under different conditions, including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadione, paraquat, etc. [18] in laboratory growth. There is not literature available on the effect of oxidative stress in yeast cells prior to fermentation. In this work, the influence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or menadione prior to fermentation was studied in order to determine the effect on volatile compound production and kinetic parameters. The objective of this study was to evaluate the fermentative behavior after oxidative stress of yeasts that were isolated in small mezcal distilleries. We used two *Kluyveromyces marxianus* and two *Saccharomyces cerevisiae* strains. Knowledge of the fermentation parameters of these yeasts, as well as the variation within the strains, makes yeast strain selection possible.

## **7.5 Materials and methods**

### **7.5.1 Yeast strain**

All experiments were carried out on 4 yeasts; two *Kluyveromyces marxianus*, SLP1 and OFF1, isolated at rural mezcal distilleries in the Mexican States of San Luis Potosi and Guerrero, respectively, and two *Saccharomyces cerevisiae*, MC4, isolated at a rural distillery in Oaxaca and the commercial W303-1A, as a control.



### **7.5.2 Oxidative stress**

Each yeast strain was grown in a YPD medium (1% [w/v] yeast extract, 2% bactopectone and 2% glucose). Incubation was carried out in an orbital shaker at 30°C and 250 rpm for 12 h and then  $1 \times 10^7$  cells/mL were collected. Menadione sodium bisulfite 100 mM or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM were added to produce oxidative stress [4](Arellano *et al.* 2013). After three hours the cells were collected again by centrifugation at 5000 rpm for 10 min and then washed 3 times with physiological solution. Finally, samples were taken for viability.

### **7.5.3 Fermentation conditions**

The fermentations were performed in 250 mL flasks containing 200 mL of YPD medium with a higher glucose level (yeast extract 1% [w/v], bactopectone 2% and glucose 14%). The yeast cells collected after oxidative stress were used to inoculate the fermentation flasks. The fermentation conditions were 33°C and a gentle agitation (100 rpm to homogenize the medium). During fermentation, samples were taken aseptically for 72 h and all the samples were frozen at -18°C until analyzed.

### **7.5.4 Analytical methods**

The optical density in the fermentation medium was measured at 600 nm. The number of suspended yeast cells was counted by Nuebauer chamber. Yeast viability was determined with successive dilutions. They were spotted onto YPD plates and incubated at 30°C for 24 h and the colonies were counted.

Ethanol and the volatile compounds were determined according Arellano *et al.* [5] with minor changes. The samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 min and the supernatant

transferred to 2 mL screw-cap tubes; 2 mL were transferred to 20 mL glass vials for headspace-gas chromatography and then put in a HP7694E head-space programmed for these conditions: vial temperature 80°C, loop temperature 110°C, transfer line 115°C, vial equilibrium time 5 min, pressurization 2 min, loop filling 0.2 min, loop equilibrium time 0.5 min, injection time 1 min, and injection volume 1 mL. The GC HP6890 with a FID detector was programmed as follows: the oven sloop was 55°C for 5 min, next it was increased at a rate of 5°C/min to reach 160°C, it was then increased 25°C/min to 220°C, and finally the temperature was maintained for 8 min. The chromatography column was a 60 m x 0.32 mm x 0.25 mm HP Innowax. The injector and detector temperatures were 250°C. The injection used a 1:10 split. The analysis time was 45 min, including the extraction by headspace and GC. The volatile compounds quantified were: acetaldehyde, ethyl acetate, methanol, 1-propanol, 1-butanol, amyl alcohols, isobutanol, ethyl valerate, ethyl lactate, ethyl caprylate, ethyl caproate, 2-furfuraldehyde, and 2-phenyl ethanol. Quantification was performed according to an external standard method.

The glucose consumed was determined for HPLC using an aminex HPX-87C column 300 mm x 7.8 mm biorad. The supernatant was first filtered using teflon filters at 0.45mm. The injection volume was 20 ml, the mobile phase was deionized water, the flow rate was 0.5 mL/min, and a refractive index was used as a detector.

### **7.5.5 Data analysis**

Statgraphics plus 5.1 (Statpoint, Inc) was used for statistical analysis. The statistical significance of the difference between averages of duplicate and triplicate measurements was evaluated using a two-way ANOVA test with a confidence level of  $p = 0.05$ . The

Curve Expert 2.1 program was used to interpolate the fermentation data and calculate the kinetic parameters.

## **7.6 Results and discussion**

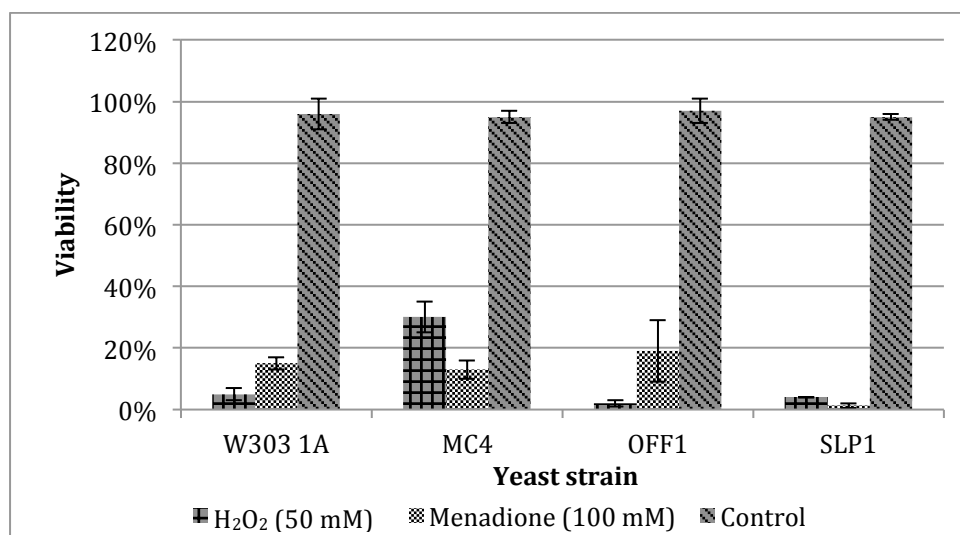
### **7.6.1 Yeast viability after oxidative stress**

Oxidative stress is one of the adverse conditions affecting yeasts during biomass producing and drying [11]. The yeasts strains *Kluyveromyces marxianus* SLP1 and OFF1 and *Saccharomyces cerevisiae* MC4, isolated from the mezcal processes, were compared with the laboratory yeast W303-1A to determine the ability of the yeasts to ferment after an oxidative stress event produced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or menadione. All the yeasts were exposed to the oxidant compounds for 3 h after which they were collected and their viability was evaluated. The results showed that both yeast growth after the stress and the resistance were different for each yeast strain (figure 1). MC4 was the most resistant and SLP1 was the most sensitive and then the resistance to oxidative stress could change the fermentation ability. Moreover, the viability obtained was taken into account in order to inoculate the fermentation flasks and guarantee that the cells inoculate start with the same viable number of suspended yeast.

### **7.6.2 Fermentation behavior after an oxidative stress event**

The fermentations were developed in a YPD medium because the agave juice used in the mezcal processes changes, depending on agave age, species, and where it is cultivated [21]. The YPD medium contains all the nutrients needed by the yeast and they are probably not limited, as in the agave juice. This medium allows for a better comparative study. The yeast

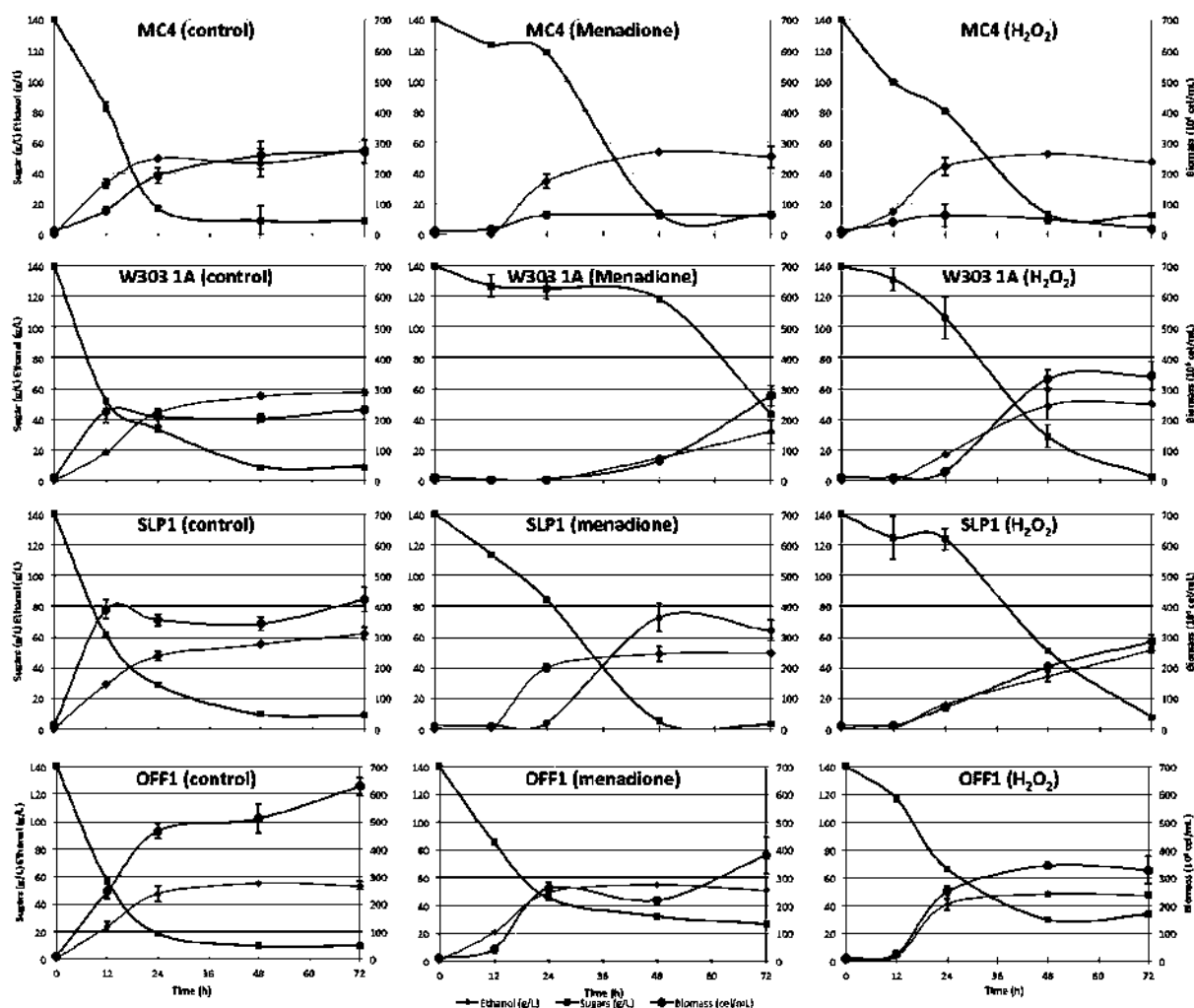
strains showed different behaviors after oxidative stress (figure 2). The number of suspended cells of the MC4 yeast decreased 75% when it was stressed with menadione and by 82% with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Even though the yeast did not grow as it did in the control, it was interesting that ethanol production did not decrease in the same manner as the number of cells did.



**Figure 1.** Viability before (control) and after oxidative stress produced with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or menadione on *S. cerevisiae* W303-1A and MC4.

The biomass of the W303-1A control fermentation grew until the stationary phase in only 12 h but, when it was stressed with menadione, the stationary phase was not detected and the yeast did not grow until 72 h of fermentation, whereas when it was stressed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the stationary phase was not detected until 48 h. Ethanol was produced after 72 h of fermentation and did not show a stationary phase when it was stressed with menadione. Production could probably be higher because the fermentation was finished before the sugars were totally consumed. The SLP1 yeast strain was more affected by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than by menadione, growth and ethanol production were slower than the control, and more than 72

h were needed to complete the fermentation. The *K. marxianus* yeast OFF1 was the most resistance, as is shown in figure 2. It grew less than the control and at the end of the fermentation (72 h) not all of the sugars were consumed. It is possible the sugar transporters were damaged during oxidative stress. However, higher ethanol production was obtained at 24 h of fermentation, independent of the oxidative stress.



**Figure 2.** The time course of glucose, biomass (number of cells), and ethanol during fermentation with *S. cerevisiae* W303-1A and MC4 and *K. marxianus* OFF1 and SLP1. Data points represent the mean of triplicate fermentations and standard deviation.

The kinetic parameters were calculated for the fermentations data obtained (table 1). After oxidative stress, there was a decrease in the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ), the production rate ( $r_p$ ) and the rate of sugar consumption ( $r_s$ ) in the yeast strains, and  $m$  and  $r_s$  decreased more than the ( $r_p$ ). Ethanol production after 72 h was almost the same for MC4 and OFF1 in the control fermentation and after oxidative stress. Ethanol production by the SLP1 yeast strain was more affected, decreasing 14 % with menadione and 18% with  $H_2O_2$ . Menadione caused greater damage in the W303-1A strain. The results showed that oxidative stress affected fermentation time but not ethanol production, however there was no statistically significant difference at the end of the fermentation. The ethanol production yield of the MC4 and OFF1 strains after the oxidative stress was similar to the control, but the sugars were not totally consumed, as was seen in W303-1A, MC4 and OFF1, the results shown the consumed sugars were metabolized to ethanol in the same proportions but not in high levels.

### **7.6.3 Volatile compound production after oxidative stress**

During the fermentation of alcoholic beverages are produced ethanol and other volatile compounds that give aroma and flavor as the higher alcohols and esters [5]. The higher alcohol compounds produced after an oxidative stress event and a control. 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, the amyl alcohols, and phenyl alcohol were evaluated at 24, 48, and 72 h of fermentation (figure 3). The columns describe the profiles of the higher alcohol production under the different fermentation conditions (yeast strain and oxidative stress). The *K. marxianus* species produced higher alcohols than the *Saccharomyces cerevisiae* in the control fermentations. After oxidative stress the *K. marxianus* OFF1 was more resistant to menadione because the higher alcohols produced were almost the same, while the *S.*

*cerevisiae* W303-1A was the most resistant to hydrogen peroxide. The compounds most affected by oxidative stress were the amyl alcohols because all the yeasts decreased production by more than 50%. Isobutanol increased production by almost 100%, and finally, the total higher alcohol production of the yeasts was not different with either oxidant. The fermentation using the yeast strain W303-1A control and hydrogen peroxide produced 210 mg/L under both conditions, but the difference was the amount of amyl alcohol (160 mg/L at control fermentation and 40 mg/L after hydrogen peroxide fermentation) and isobutanol (35 mg/L at control fermentation and 140 mg/L after hydrogen peroxide fermentation). 1-propanol was produced at almost the same quantity in the control fermentation and after oxidative stress. Finally, 2-phenyl ethanol and 1-butanol were produced in smaller amounts, but the production of the first compound was affected by the oxidative stress, because fermentation with W303-1A, OFF1, and SLP1 increased production. Fermentation with the SLP1 yeast strain after an oxidative stress event with hydrogen peroxide was more affected and increased production to 18 mg/L.

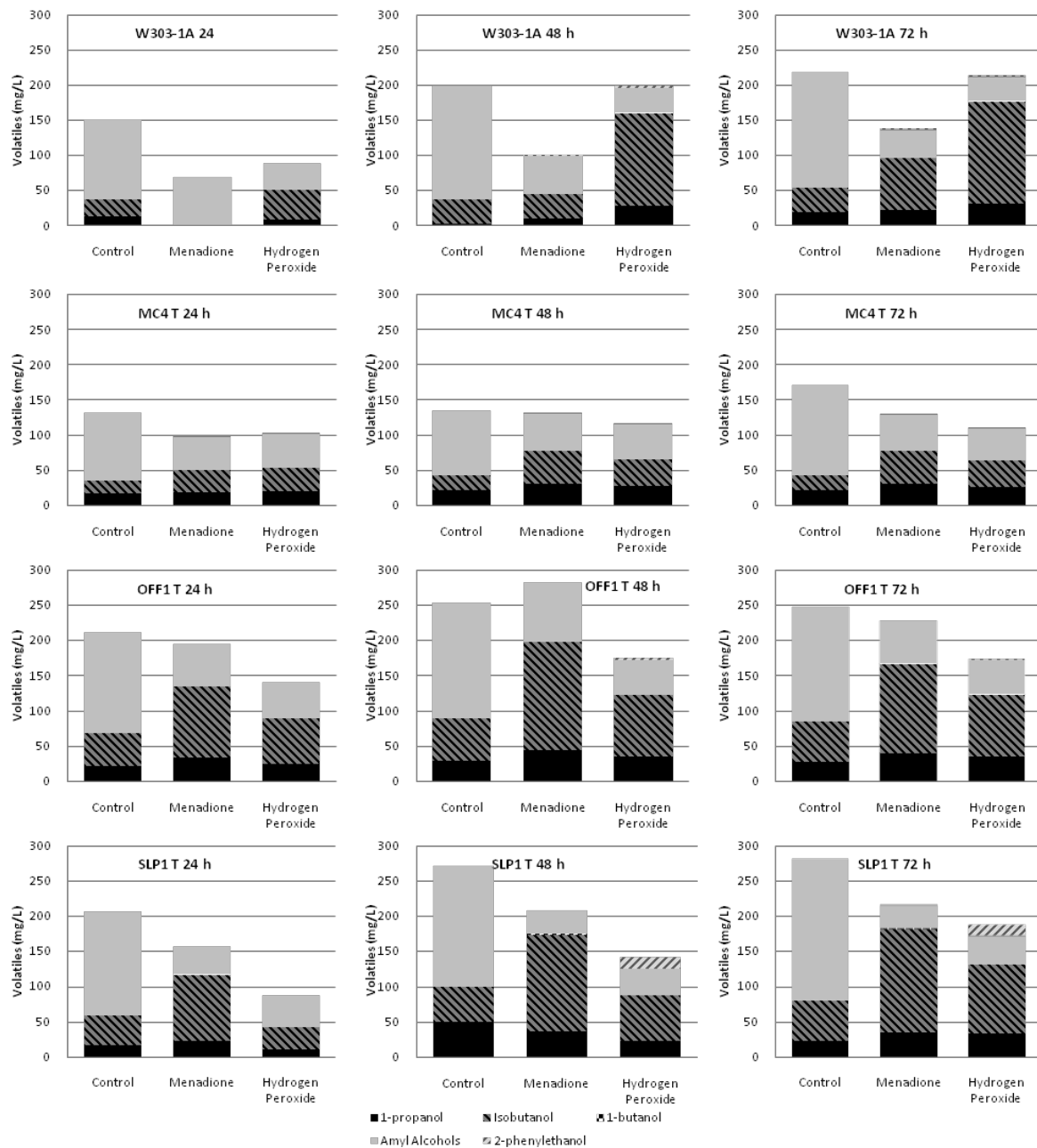
The final higher alcohol production reported in this study is similar to that obtained with natural agave juice in mezcal and tequila production [2, 3, 20] and with natural grape juices for wines [17]. However, it is not possible extend the results from those studies to ours, because there are different variables due to the fact that the natural juices can have volatile precursors. Nevertheless, the YPD medium that was used decreased the medium variations between fermentations. Cell growth did not affect higher alcohol production, because the number of cells decreased after oxidative stress, especially in the MC4 and OFF1 strains. Higher alcohol production was maintained when the cells were stressed with hydrogen peroxide.

Table 1. Kinetic fermentation parameters of the yeast strains after an oxidative stress event with menadione or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Yeast	Fermentation condition	Parameter									
		r <sub>x</sub> (g/Lh)	μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )	r <sub>s</sub> (g/Lh)	r <sub>p</sub> (g/Lh)	Y <sub>p/s</sub> (g ethanol/g sugars)	Ethanol produced (g/L)	Residual sugars (g/L)			
SLP1 <i>K. marxianus</i>	Control	0.464 +/- 0.058 <sup>a</sup>	0.524 +/- 0.098 <sup>a</sup>	7.740 +/- 0.354 <sup>a</sup>	2.975 +/- 0.233 <sup>a</sup>	0.434 +/- 0.009 <sup>a</sup>	58.5 +/- 0.707 <sup>a</sup>	3.99 +/- 3.875 <sup>a</sup>			
	Menadione	0.089 +/- 0.005 <sup>b</sup>	0.162 +/- 0.009 <sup>b</sup>	4.280 +/- 0.792 <sup>d</sup>	2.135 +/- 0.078 <sup>c</sup>	0.382 +/- 0.012 <sup>b</sup>	50.0 +/- 2.828 <sup>b</sup>	1.53 +/- 0.389 <sup>c</sup>			
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.043 +/- 0.001 <sup>e</sup>	0.076 +/- 0.002 <sup>c</sup>	2.450 +/- 0.014 <sup>f</sup>	1.105 +/- 0.106 <sup>d</sup>	0.378 +/- 0.017 <sup>b</sup>	48.5 +/- 0.757 <sup>b</sup>	6.73 +/- 0.305 <sup>d</sup>			
MC4 <i>S. cerevisiae</i>	Control	0.169 +/- 0.001 <sup>e</sup>	0.257 +/- 0.003 <sup>d</sup>	7.075 +/- 0.134 <sup>a</sup>	5.280 +/- 0.622 <sup>b</sup>	0.381 +/- 0.002 <sup>b</sup>	51.3 +/- 0.354 <sup>b</sup>	4.26 +/- 0.092 <sup>a</sup>			
	Menadione	0.092 +/- 0.004 <sup>b</sup>	0.201 +/- 0.004 <sup>b</sup>	3.435 +/- 0.601 <sup>c</sup>	4.880 +/- 0.028 <sup>b</sup>	0.374 +/- 0.045 <sup>b</sup>	49.8 +/- 6.010 <sup>b</sup>	13.21 +/- 0.163 <sup>c</sup>			
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.085 +/- 0.001 <sup>b</sup>	0.177 +/- 0.017 <sup>b</sup>	2.975 +/- 0.049 <sup>e</sup>	3.465 +/- 1.393 <sup>b</sup>	0.367 +/- 0.002 <sup>b</sup>	47.6 +/- 2.970 <sup>b</sup>	13.16 +/- 0.226 <sup>e</sup>			
W303-1A <i>S. cerevisiae</i>	Control	0.333 +/- 0.002 <sup>d</sup>	0.493 +/- 0.006 <sup>a</sup>	9.430 +/- 0.311 <sup>b</sup>	2.645 +/- 0.375 <sup>a</sup>	0.461 +/- 0.017 <sup>a</sup>	56.0 +/- 1.414 <sup>a</sup>	9.05 +/- 0.042 <sup>b</sup>			
	Menadione	0.068 +/- 0.002 <sup>b</sup>	0.077 +/- 0.006 <sup>c</sup>	3.015 +/- 0.064 <sup>e</sup>	1.670 +/- 0.311 <sup>d</sup>	0.356 +/- 0.086 <sup>b</sup>	31.5 +/- 7.778 <sup>c</sup>	43.50 +/- 0.707 <sup>f</sup>			
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.076 +/- 0.005 <sup>b</sup>	0.089 +/- 0.006 <sup>c</sup>	3.150 +/- 0.005 <sup>e</sup>	2.530 +/- 1.287 <sup>a</sup>	0.377 +/- 0.004 <sup>b</sup>	49.5 +/- 0.738 <sup>b</sup>	2.70 +/- 0.214 <sup>c</sup>			
OFF1 <i>K. marxianus</i>	Control	0.211 +/- 0.006 <sup>d</sup>	0.345 +/- 0.011 <sup>e</sup>	6.140 +/- 0.046 <sup>e</sup>	3.385 +/- 0.629 <sup>b</sup>	0.406 +/- 0.023 <sup>a</sup>	53.0 +/- 2.828 <sup>b</sup>	9.45 +/- 0.409 <sup>b</sup>			
	Menadione	0.117 +/- 0.016 <sup>b</sup>	0.185 +/- 0.030 <sup>b</sup>	4.980 +/- 0.014 <sup>d</sup>	3.150 +/- 0.905 <sup>b</sup>	0.447 +/- 0.001 <sup>a</sup>	50.0 +/- 0.378 <sup>b</sup>	26.28 +/- 0.386 <sup>e</sup>			
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.092 +/- 0.005 <sup>b</sup>	0.152 +/- 0.013 <sup>b</sup>	2.560 +/- 0.014 <sup>f</sup>	3.260 +/- 0.156 <sup>b</sup>	0.424 +/- 0.010 <sup>a</sup>	47.1 +/- 1.556 <sup>b</sup>	23.59 +/- 0.140 <sup>e</sup>			

r<sub>x</sub>: Maximum growth rate, μ<sub>max</sub>: Specific growth rate, r<sub>s</sub>: maximum sugar consumed rate, r<sub>p</sub>: maximum ethanol production rate, Y<sub>p/s</sub>: conversion factors of substrate into ethanol (ethanol yield).



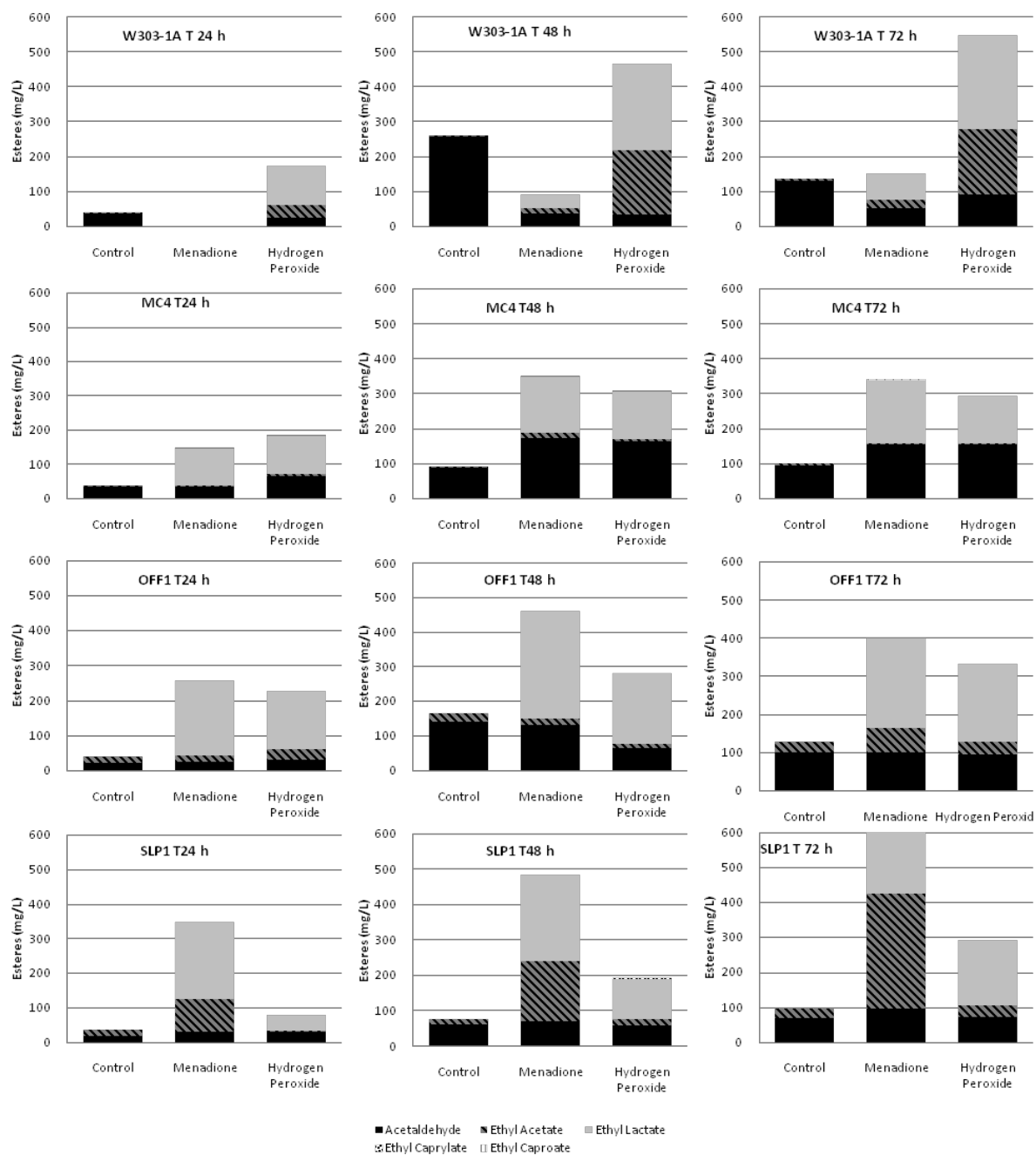


**Figure 3.** Higher alcohol concentrations produced during fermentation after oxidative stress with menadione or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using yeast isolated from mezcal processes.

Higher alcohols are produced by the Ehrlich reaction when amino acids produce and  $\alpha$ -keto acid [15, 26] after transamination. The reaction is catalyzed by mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid aminotransferases (BCAATases) [12], five decarboxylases

(Ydl080cp, Ydr380wp, Pdc1p, Pdc5p and Pdc6p), and six decarboxylases (ADH1, ADH2, ADH3, ADH4 and ADH5 or SFA1) [13]. The precise combination of enzymes used at a particular time depends on the amino acid, the carbon source, and the stage of growth of the culture. In our study we showed a difference between isobutanol and amyl alcohol and it is possible that there is greater valine decarboxylation because it is the amino acid that is most necessary for oxidative stress resistance.

Other important volatile compounds in alcoholic beverages are esters, such as ethyl acetate, ethyl lactate, ethyl caprylate, and ethyl caproate. Esters are produced by esterification of activated fatty acids and alcohol. The behavior of esters and acetaldehyde for yeast after an oxidative stress are shown in the figure 4. The control yeast W303-1A did not produce esters. The most important compound it produced was acetaldehyde, with more than 200 mg/L at 48 h, but it decreased to 100 mg/L at 72 h; when it was stressed with menadione this compound decreased more than 50%, probably because the biomass also decreased. The production of ethyl acetate and ethyl lactate increased after oxidative stress, but was higher when stressed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The MC4 yeast strain showed almost the same behavior, but ethyl acetate was produced in smaller quantities. When no oxidative stress was applied, *K. marxianus*, unlike *S. cerevisiae*, produced ethyl acetate, but no ethyl lactate. However, after oxidative stress, ethyl lactate was produced in greater quantities from the first hours and more than 200 mg/L were generated by the OFF1 yeast. The results obtained here showed metabolic correlations between the esters and the oxidative stress increasing the production in all of the yeasts, but it was highest in the *K. marxianus* species.



**Figure 4.** Esters produced during fermentation after oxidative stress with menadione or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using yeast isolated from mezcal processes.

To explain the regulation of ester synthesis, many studies have focused on the availability of acetyl CoA because of its central role in yeast metabolism. Changes in wort composition and/or fermentation conditions such as temperature, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, and the unsaturated fatty

acids in the wort, affect the regulation of ester synthesis. Many attempts have been made to explain this [3, 16, 22, 23], but yeast is the principal factor. The yeast metabolism has to adapt to the changes in the wort and in the fermentation conditions. In this case, the oxidative stress affected the specific growth rate and ethanol production, but the esters were produced in greater quantities. This could be explained by the fact that fatty acid are precursors and are released from the cytoplasmic fatty acid synthase (FAS) complex where the acetyl-CoA carboxylase is the key regulation enzyme. During fermentation using yeast after an oxidative stress, some lipids were oxidized, which causes the activation of the acetyl-CoA carboxylase to biosynthesize new and more resistant lipids [19]. It is possible that when fatty acids are unfinished, short and medium fatty acid chains could be used for ester production.

## **7.7 Conclusions**

Oxidative stress can be produced during yeast growth or during drying to obtain the biomass used for alcoholic beverage production. After the process is scaled up to industrial production, it is necessary know the behavior of the yeast strain prior to an oxidative stress event. We used two different oxidants, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and menadione, because both have different effects on yeast. The results obtained showed that the yeast strain was the principal factor and that *K. marxianus* strains were more resistant than *S. cerevisiae* strains. In addition, the mezcals yeast produced a larger amount of ethanol and thus could be used in industrial processes. Moreover, the yeast strains isolated from mezcals processes showed different and unique volatile compound profiles during fermentations after oxidative stress using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or menadione. While the oxidative stress increased the concentration of ester compounds associated with fresh and fruity aromas, and the higher alcohols were increased compared

with the non-oxidative stress condition. However, the main difference was that isobutanol was produced in greater quantities than amyl alcohol. Taken together, these results demonstrate that fermentation using yeast after an oxidative stress can modify the final concentration of important aroma-contributing compounds, influencing the overall fermentation aroma profile. Further studies in which additional expressed genes as *ADHI*, *PDC1*, *BAT1*, *BAT2*, *LEU2*, *ILV2*, *ATF1*, *ATF2*, *EHT1* and *IAHI* involved in volatile compounds production for yeast strains will be included to obtain a better understanding of the contribution of oxidative stress in the biosynthesis of yeast aroma compounds during fermentation.

**7.8 Acknowledgements:** The authors appreciate the partial economic support from the Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH to AS-M (2.16), to SM-A (2.37), and from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México to AS-M (169093). The authors would also like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México (CONACyT) for the grant that made this study possible.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## 7.8 References

1. Alcazar-Valle EM (2011) Capacidades Fermentativas y Generación de volátiles de cepas de levadura aisladas en diferentes estados productores de mezcal. In: Biotecnología Industrial. pp. 101. Guadalajara: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

2. Amaya-Delgado L, Herrera-López EJ, Arrizon J, Arellano-Plaza M, Gschaedler A (2013) Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in Industrial tequila fermentation. World J Microbiol Biotechnol Published on line: 18 January 2013
3. Arellano M, Pelayo C, Ramirez J, Rodriguez I (2008) Characterization of kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeasts isolated from agave juice. J Ind Microbiol Biotechnol 35:835-841
4. Arellano-Plaza M, Gschaedler A, Noriega-Cisneros R, Clemente-Guerrero M, Manzo-Avalos S, González-Hernández JC, Saavedra-Molina A (2013) Respiratory capacity of the *Kluyveromyces marxianus* yeast isolated from the mescal process during oxidative stress. World J Microbiol Biotechnol In Press DOI: 10.1007/s11274-013-1291-7
5. Arellano M, Gschaedler A, Alcazar M (2012) Major volatile compounds analysis produced from mescal fermentation using gas chromatography equipped headspace (GC-HS). In Dr Bekir Salih (ed) Gas chromatography in plant science, wine technology toxicology and some specific applications. In Tech. pp 73-88
6. Arrizon JP, Gschaedler A (2007) Effect of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. J Appl Microbiol 102:1123-1131
7. Arrizon J, Fiore C, Acosta G, Romano P, Gschaedler A (2006) Fermentation behavior and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. Antonie van Leeuwenhoek 89:181-189

8. Belo I, Pinheiro R, Mota M (2005) Morphological and physiological changes in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidative stress from hyperbaric air. *J Biotechnol* 115:397-404
9. Bauer FF, Pretorius IS (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review. *S Afr J Enol Vitic* 21:27-51
10. Cardona F, Carrasco P, Pérez-Ortín J, del Olmo M, Aranda A (2007) A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *Int J Food Microbiol* 114:83-91
11. Carrasco P, Querol A, del Olmo M (2001) Analysis of stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch Microbiol* 175:450–457
12. Colón M, Hernández F, López K, Quezada H, González J, López G, Aranda C, González A (2011) *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* Orthologous Enzyme. *PLoS One* 6:1-13
13. Dickinson JR, Salgado LE, Hewlins JE (2003) The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278:8028-8034
14. Gschaedler MAC, Ramirez CJJ, Díaz MDM, Herrera LJE, Arellano PM, Arrizón GJ, Pinal ZL (2004) Fermentación etapa clave en la elaboración de tequila, capítulo 4. In *Ciencia y tecnología del tequila avances y perspectivas*. In: Gchaedler MAC (ed) Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, AC, pp 62–120

15. Hazelwood LA, Daran JM, van Maris A, Pronk JT, Dickinson JR (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74:2259-2266
16. Landaud S, Latrille E, Corrieu G (2001) Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer fermentation. *J Inst Brew* 107:107-117
17. Lilly M, Bauer FF, Styger G, Lambrechts MG, Pretorius IS (2006) The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Res* 6:726-743
18. Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W (1996) The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* 19:651-658
19. Pérez-Torrado R, Gómez-Pastor R, Larsson C, Matallana E (2009) Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:951-960
20. Pinal L, Cedeño M, Gutiérrez H, Alvarez-Jacobs J (1997) Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnol Lett* 19:45-47
21. Pinal L, Cornejo E, Arellano M, Herrera E, Nuñez L, Arrizon JP, Gschaedler A (2009) Effect of Agave tequila age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:655-661
22. Pisarnitskii AF (2001) Formation of wine aroma: tones and imperfections caused by minor components (a review). *Prikl Biokhim Mikrobiol* 37:651-659



23. Saerens SMG, Delvaux F, Verstrepen KJ, Van Dijck P, Thevelein JM, Delvaux FR (2008) Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Environ Microbiol* 74:454-461
24. Verdugo A, Segura L, Kirchmayr M, Ramirez P, Gonzalez A, Gschaedler A (2011) Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100:497-506
25. Verbelen PJ, Depraetere SA, Winderickx J, Delvaux FR, Delvaux F (2009) The influence of yeast oxygenation prior to brewery fermentation on yeast metabolism and the oxidative stress response. *FEMS Yeast Res* 9:226-239
26. Volbrecht D, Radler F. (1973) Formation of higher alcohols by amino acid deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. The decomposition of amino acids to higher alcohols. *Arch Mikrobiol* 94:351-358

## 8. Discusión general

La respuesta de las levaduras a las condiciones ambientales, involucra un sistema complejo de vías de traducción de señales. Estas vías permiten censar las condiciones externa del ambiente y la transmisión de la señal desde la superficie de la célula a el núcleo, convirtiendo la señal de estrés en cambios en la expresión génica (Iguar y Estruch, 2000; Carrasco y col., 2001). Las proteínas sintetizadas bajo las condiciones de daño permiten que las células reparen el daño celular y protegen a la célula del estrés generado.

En este trabajo se evaluó la sensibilidad de diferentes cepas silvestres aisladas del proceso de producción del mezcal a un estrés oxidativo provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o menadiona, a diferentes concentraciones y durante diferentes fases del crecimiento (exponencial y estacionaria). Las levaduras analizadas fueron *Kluyveromyces marxianus* SLP1 y OFF1 aisladas de los estados de San Luis Potosí y Oaxaca respectivamente; además de una *Saccharomyces cerevisiae* aislada del estado de Guerrero denominada MC4 y se utilizó la levadura *S. cerevisiae* W303-1A como control. Las levaduras silvestres son consideradas importantes por su capacidad de fermentar jugos de agave de diferentes especies con altos niveles de eficiencia, por lo que son de importancia para la industria de las bebidas destiladas de agave.

La selección de las levaduras fue debido a su capacidad de adaptación a fermentaciones con alto grado de estrés como: estrés osmótico, en el proceso de producción de mezcal la concentración de azúcares al inicio puede superar los 200 g/L; estrés térmico, durante la fermentación la temperatura puede incrementarse hasta un valor cercano a 40°C; estrés por concentración de etanol, conforme avanza la fermentación la concentración de etanol incrementa llegando a niveles que pueden causar estrés; estrés por la presencia de compuestos inhibitorios del crecimiento, el jugo de agave contiene saponinas y furfurales que son conocidos como inhibidores de crecimiento, dependiendo de la especie de agave y de las condiciones de cocimiento su concentración puede variar llegando incluso a limitar la fermentación (Arellano y col., 2012). Por lo anterior, las levaduras durante la fermentación están expuestas a diferentes tipos de estrés y como es sabido, los microorganismos cuando son expuestos a ambientes no letales pero que causan un estrés,

activan su sistema de adaptación y resistencia al estrés. Por ejemplo, Jamieson (1992), realizó una adaptación de levaduras *S. cerevisiae* a concentraciones no letales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o menadiona, él observó que después de la adaptación mostraron mayor capacidad de resistir elevadas concentraciones de ambos oxidantes que las levaduras que no fueron adaptadas.

En este sentido, se planteó la siguiente hipótesis, las levaduras aisladas del proceso de producción de mezcal al estar en un estrés constante su sistema de adaptación está activo y presentan mayor resistencia al estrés oxidativo. Para demostrarlo, se realizó un estudio de sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y menadiona. A diferencia de lo esperado, las levaduras *S. cerevisiae* fueron más resistentes que las *K. marxianus* al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sin embargo tuvieron la capacidad de soportar concentraciones de hasta 100 mM durante la fase estacionaria, mientras con menadiona su resistencia fue mayor en ambas especies de levadura. Este resultado obtenido muestra que incluso las levaduras de mezcal tienen la misma resistencia que la W303-1A, lo que parecía indicar que la hipótesis de mayor resistencia no existía. Sin embargo, debido a que la etapa fermentativa en el proceso de producción de mezcal se realiza en un tiempo de 1 a 2 semanas, la capacidad de respuesta al estrés podría incrementar durante la fase estacionaria, y como menciona Jamieson (1992) que durante la fase estacionaria las levaduras incrementan la capacidad de resistencia al estrés oxidativo. además, que es necesario concentraciones no letales de compuestos generadores de ERO para estimular la capacidad antioxidante. En este trabajo al eliminar el oxidante después de una hora de exposición para la prueba de viabilidad, tal vez se requiera mayor tiempo de exposición para generar una mayor resistencia al estrés oxidativo.

Con los resultados obtenidos hasta el momento se abre una pregunta ¿el tiempo de exposición de los oxidantes es suficiente para establecer la resistencia o daño celular en levaduras? Para responder la pregunta se realizó un experimento para determinar la capacidad de crecimiento de las levaduras en presencia de los oxidantes, agregando concentraciones de 0, 10, 50 y 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o menadiona y se evaluó el crecimiento cada hora. El resultado obtenido fue diferente al experimento anterior, en este caso las levaduras aisladas del proceso de producción de mezcal mostraron una mayor resistencia en ambos oxidantes que la cepa W303-1A, lo que indica que el sistema antioxidante requiere

de mayor tiempo de respuesta, pero una vez activado tiene la capacidad de soportar mayor concentración de oxidantes. Varios trabajos realizados han demostrado que la adición de concentraciones no letales de oxidantes pueden incrementar la capacidad antioxidante tal y como observamos en este trabajo (Jamieson, 1992; Beckhouse y col., 2008; Bravim, y col., 2010).

El efecto del  $H_2O_2$  siempre fue mayor que la menadiona debido probablemente a que este compuesto ingresa a la célula y provoca la inhibición de la producción de ATP e iosina al modificar la vía de consumo de los azúcares por la glucólisis (Osorio y col., 2003), mientras que la menadiona necesita metabolizarse para formar semiquinona por flavoenzimas como las NADPH reductasas produciendo anión superóxido (Castro y col., 2007). El tiempo para ejercer el estrés oxidativo por lo tanto, es mayor para la menadiona que para el  $H_2O_2$ . Lo anterior se evidencia durante la respiración de la *K marxianus* y en el comportamiento del pH durante el crecimiento en presencia de  $H_2O_2$  o menadiona. Se observó que al momento de la adición de menadiona, la respiración continua por algunas horas, posteriormente se detiene, y el pH se mantiene constante lo que evidencia que la capacidad metabólica de la levadura se detuvo o se esta modificando por el daño de estrés oxidativo causado. Cuando se utilizó  $H_2O_2$ , la respiración no fue posible medirla debido a que se incrementó el porcentaje de oxígeno disuelto y fue necesario esperar varias horas para que el oxígeno se estabilizara, sin embargo, posteriormente el oxígeno se consumió en forma similar al crecimiento control sin oxidante. Por tanto, la menadiona requiere de algunas horas para ejercer estrés oxidativo para después detener el metabolismo celular, mientras que el  $H_2O_2$  ejerce el estrés oxidativo al momento de ser adicionado, pero cuando la concentración baja a niveles no letales, la levadura continuó con su metabolismo normal. La oxidación de lípidos al parecer juega un papel relevante en la diferencia entre  $H_2O_2$  y menadiona, pues se observó, que la oxidación de lípidos fue mayor en peróxido de hidrógeno que en menadiona y no depende de la fase de crecimiento. La oxidación de lípidos en levaduras depende en gran medida de la producción de ácidos grasos insaturados como mencionan Cipak y col. (2008), sin embargo las levaduras no son capaces de producir lípidos poliinsaturados pero pueden obtenerlos del medio de cultivo (Kim y col., 2011), por lo tanto las levaduras mantienen niveles constantes de lípidos insaturados durante las

diferentes fases del crecimiento (Cipak y col., 2008), considerando que la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en altas concentraciones (50 mM) incrementa la producción del radical hidroxilo ocasionando mayor oxidación de lípidos que la menadiona debido a que este compuesto requiere de mayor tiempo para causar el daño oxidativo (Castro y col., 2007).

La fase de crecimiento sin embargo incrementó la capacidad antioxidante de las levaduras, debido a que el estrés provocado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y menadiona fue menor en la fase estacionaria (48 y 72 h) con una mayor viabilidad celular a las 72 h. Este efecto también fue observado en la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la glutatión reductasa (GRx), las cuales mostraron un aumento de su actividad durante la fase estacionaria. Con lo anterior se concluye que la GRx es una enzima indispensable para la resistencia al estrés oxidativo y que su actividad depende del grado de estrés producido, pues al el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al producir un mayor estrés induce una mayor actividad de la enzima. Pinheiro y col., (2002) mostraron resultados similares con *K. marxianus* pero induciendo el estrés con aire a presión y paraquat, sin embargo, ellos indujeron una resistencia previa a las levaduras adicionando concentraciones no letales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sus resultados demostraron una mayor viabilidad, además de una mayor actividad de la SOD principalmente. Sin embargo, a pesar que en este trabajo la viabilidad fue menor, se obtuvieron las actividades de las enzimas antioxidantes endógenas de la levadura silvestre que al parecer son suficientes para resistir el estrés oxidativo.

Por otro lado, la SOD no incrementó su actividad cuando se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero si la menadiona y fue mayor en la fase estacionaria, lo que indica que la levadura establece una diferencia entre ambos oxidantes. Debido a que la menadiona produce el anión superóxido y mediante la acción de la SOD es dismutado para producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual posteriormente las enzimas catalasa y GRx lo convierten en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> (Yamashiji y col., 1991). Sin embargo, al no incrementar la actividad de la catalasa es posible que la principal enzima antioxidante sea la Grx. Una evidencia más de este fenómeno es el incremento de glutatión total intracelular, lo que permite que la enzima GRx tenga los niveles de concentración necesaria de este cofactor. Como se sabe las GRx son enzimas que en conjunto con el NADPH y el GHS protegen a las células de estrés oxidativo (Grant y Dawes, 1996), se ha

determinado la existencia de 5 diferentes tipos de enzimas; dos ditiólicas (GRx1 y GRx 2) y tres monotiólicas (GRx3, GRx4 y GRx5), de las cuales las GRx2 y GRx5 son imprescindibles para el crecimiento celular, debido a que las levaduras con la mutación GRx2 y GRx5 es inviable (Rodríguez-Manzaneques, y col., 1999) un incremento en su actividad esta relacionado con estrés oxidativo y osmótico (Grant y col., 2000).

Como ya mencionó anteriormente, el estrés oxidativo puede ser causado por la aireación durante el crecimiento celular de forma natural (Verbelen y col., 2009), cuando se adiciona O<sub>2</sub> puro al crecimiento (Pinheiro y col., 2002), durante la producción de levaduras secas activas (Garre y col., 2010; Perez-Torrado y col., 2008). El daño oxidativo causado durante estos procesos modifica la activación de los genes de resistencia al estrés y el metabolismo celular (Verbelen y col., 2009). Sin embargo, no se encontraron evidencias previas de cuales son los efectos de utilizar levaduras después de un estrés oxidativo en la fermentación. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las levaduras del género *Kluyveromyces* (SLP1 y OFF1), fueron más resistentes debido a que pudieron realizar la fermentación en menor tiempo y con rendimiento cercanos a la fermentación control sin oxidante. Lo que demuestra que la capacidad antioxidante activada por estas levaduras, les permite realizar crecimiento celular y producción de etanol durante la fermentación a pesar del estrés oxidativo ejercido. Debido a su capacidad de resistencia es posible utilizarlas para realizar fermentaciones a nivel industrial, puesto que la resistencia al estrés son criterios que se utilizan ampliamente para la selección de levaduras para su uso industrial (Zuzuarregui y del Olmo, 2004; Carrasco y col., 2001)

El impacto del estrés oxidativo en las levaduras se reflejó en la composición volátil, pues el perfil de alcoholes superiores y ésteres fueron evidentemente diferentes. Se observó una disminución de los alcoholes amílicos, sin embargo, el efecto contrario se observó con el isobutanol lo que evidencia un cambio en las vías metabólicas de estos compuestos. Las vías metabólicas para la producción de alcoholes superiores proviene de las rutas de catabolismo de aminoácidos (Dickinson y col., 1998; Carrau y col., 2008). La diferentes tipos de alcoholes superiores generados en la fermentación control y después del estrés oxidativo puede tener dos diferentes vías. La primera puede implicar que las proteínas

oxidadas durante el estrés oxidativo fueran ricas en valina, que es el aminoácido precursor del isobutanol (Swiegers and Pretorius, 2005). Al incrementar el nivel de este aminoácido, las aminotransferasas desaminan en mayor cantidad a la valina, generando el oxiácido y posteriormente por una enzima deshidrogenasa, producir el isobutanol. La segunda ruta posible es que al generarse el estrés oxidativo, se requiere de proteínas de reparación y enzimas antioxidantes, que pueden contener niveles altos de valina y que una sobreproducción de este aminoácido por la levadura, permita la producción de isobutanol (Procopio y col., 2011).

Otro grupo de compuestos volátiles importantes en las bebidas alcohólicas fermentadas son los ésteres (López y col., 2002; Arellano y col., 2008), debido a que producen notas aromáticas dulces y frutales, por lo que su evaluación durante la fermentación después de un estrés oxidativo es indispensable. Como se observó en los resultados, el perfil de ésteres producidos después del estrés oxidativo fue diferente al control, lo que evidencia un cambio metabólico en las levaduras (Otterstedt y col., 2004). La producción de acetato de etilo mostró la mayor diferencia entre las cepas SLP1 y W303-1A y el lactato de etilo en todas las levaduras. El resultado es sorprendente debido a que al ser compuestos que proporcionan aromas dulces y afrutados son muy deseados en las bebidas alcohólicas (Arellano y col., 2008; Procopio y col., 2011; Swiegers and Pretorius, 2005) por tanto, si un estrés oxidativo incrementa su producción tal vez pueda ser una actividad industrial que pueda ser adaptada en sus procesos. Sin embargo, no se tiene evidencia que levaduras como *S. cerevisiae* y *K. marxianus* produzcan lactato de etilo en fermentaciones estériles, por lo tanto, es necesario establecer cómo las levaduras modifican su metabolismo y puedan producir ácido láctico. En el caso de *K. marxianus*, existe una levadura del mismo género que si puede producir ácido láctico como lo es la *K. lactis* (González-Siso y col., 2009), por lo que es posible que el sistema metabólico para la producción de ácido láctico se encuentre atenuado en la homeostasis y que al someterse a un estrés oxidativo severo se active su producción. Es indispensable realizar otros estudios que permitan establecer como se produce el lactato de etilo en levaduras cuando son sometidas a un estrés oxidativo.

Con la finalidad de esquematizar los resultados del presente trabajo, se presenta un modelo propuesto de la actividad metabólica de las levaduras después de un estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o menadiona (figura 1). Como ya se mencionó, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ingresa a través de la membrana de la célula por transporte pasivo y puede reaccionar con el Fe<sup>2+</sup> y producir el radical hidroxilo, el cual, puede oxidar los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos cercanos al lugar de producción, el daño incluso puede ser irreversible (Costa y Moradas-Ferreira, 2001). En el caso de la menadiona no se sabe con exactitud los transportadores que utiliza para su ingreso a la célula (Yamashoki y col., 1991), sin embargo, se propone que utiliza los de las vitaminas K1 y K2 (liposolubles), al ser la menadiona una sustancia similar (vitamina K3), incluso se ha propuesto que la menadiona no entre a la célula por el contrario produce el anión superóxido utilizando la NADH menadiona oxidoreductasa de la membrana celular (Yamashoji, y col., 1991). La respuesta al estrés causada por el estrés oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y menadiona implica primero la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y glutatión reductasa activas de la célula para transformar en anión superóxido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente en agua y oxígeno, lo cual permite que la célula pueda disminuir el estrés causado (Belo y col., 2005).

Sin embargo, no son todos los cambios observados en las levaduras, en la figura 1 se muestran en los cuadros y flechas azules una sobreproducción de metabolitos como el glutatión. Se observó que al utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante, las levaduras disminuyeron la respiración, debido a que en la cadena transportadora de electrones se generan ERO de forma endógena, provocando por tanto, una disminución de especies reactivas de oxígeno y emplearan sus enzimas antioxidantes para reducir el estrés. En el caso de las *K. marxianus* en respuesta al estrés oxidativo incrementó la actividad de la catalasa y de la glutatión reductasa comparada con las *S. cerevisiae*, lo cual permitió una disminución del daño oxidativo permitiendo el crecimiento celular manteniendo una velocidad específica de crecimiento de las *K. marxianus*.



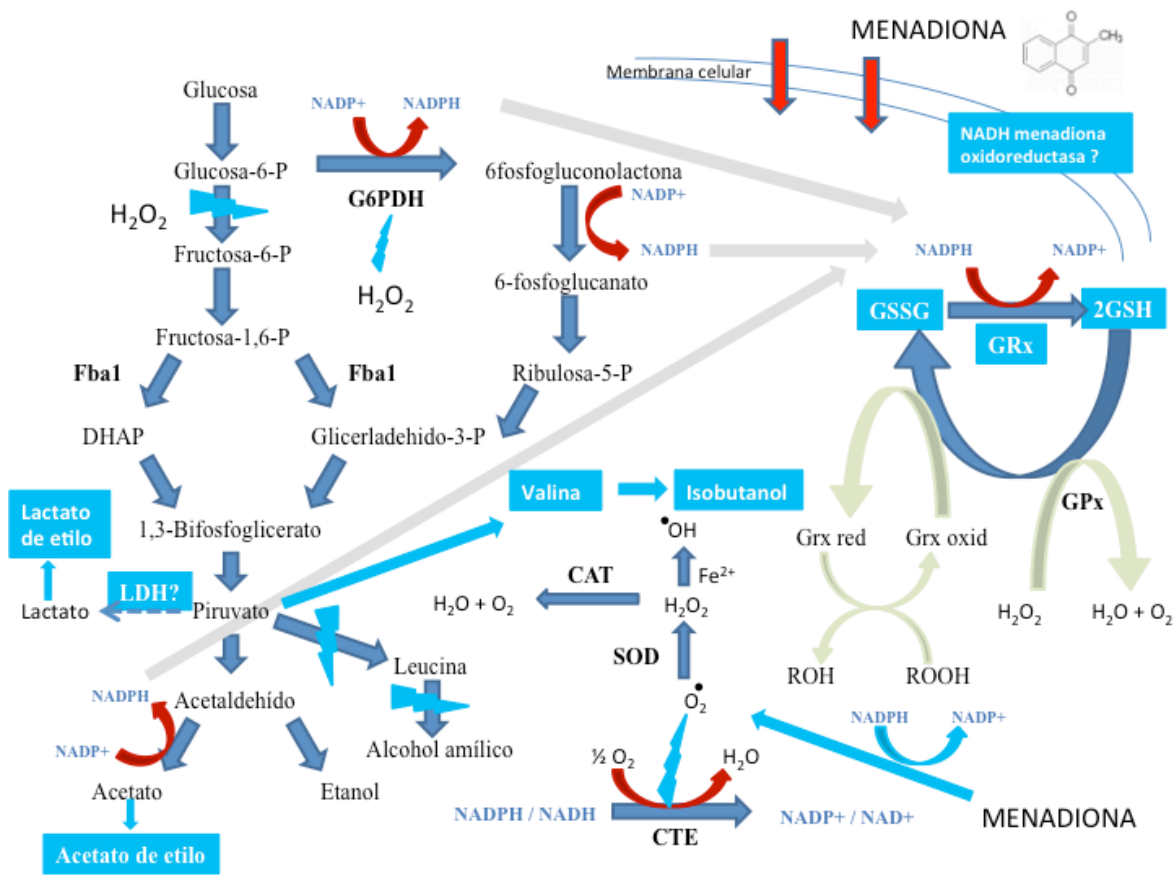


Figura 1. Resumen de los cambio metabólicos provocado por el estrés oxidativo en *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En el caso de la menadiona la respiración no disminuyó, por el contrario se mantuvo en la misma tasa de consumo, lo que implicó que la generación de especies reactivas endógenas se mantuviera. En este sentido las levaduras bloquearon la glucólisis y activaron la vía de las pentosas fosfato por lo que la formación de NADPH se incrementó y debido a que la menadiona la utiliza como cofactor para la producción de anión superóxido ocasionando posiblemente la oxidación de proteínas ocasionando que no realicen su función, impidiendo el crecimiento de las levaduras después de 8 h, resultados similares fueron obtenidos por Shenton y Grant (2003), pues observaron que enzimas como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y la alcohol deshidrogenasa se inhibían por estrés oxidativo.

Las levaduras después del estrés oxidativo mostraron variaciones en su metabolismo, por un lado incrementaron la producción de isobutanol, lo que implica un mayor catabolismo de valina (Swiegers y Pretorius, 2005). Por otro lado, este aumento provocó que la cantidad de alcohol amílico disminuyera por requerir o metabolizar un menor cantidad la leucina (Swiegers y Pretorius, 2005). Este resultado, pone de manifiesto que el catabolismo de aminoácidos varía después del estrés oxidativo. Se observó una disminución en la producción de etanol y un aumento en la producción de acetato de etilo, es probable que parte del acetaldehído se metabolizara en acetato por una menor actividad de la alcohol deshidrogenasa, debido a que esta enzima es inactivada por el  $H_2O_2$  (Shenton y Grant, 2003).

Finalmente, al evidenciar que las levaduras silvestres aisladas del proceso de producción de mezcal son más resistentes al estrés oxidativo, que presentan una mayor actividad de las enzimas antioxidantes, que la capacidad respiratoria se mantiene durante un estrés oxidativo, que la producción de etanol durante una fermentación alcohólica es similar en levaduras no estresadas, además que la producción de compuestos volátiles como los alcoholes superiores y ésteres se incrementan durante el estrés oxidativo, evidenciando con todo ello cambios fisiológicos; la hipótesis establecida al inicio de este trabajo es aceptada.

## 9. Perspectivas

- a. Estudiar como las levaduras *K. marxianus* regulan su sistema transcripcional y si acaso los factores Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 funcionan de forma homóloga a *S. cerevisiae*.
- b. Establecer si el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes es por una mayor producción de la enzima o solo incrementan su capacidad catalítica.
- c. Determinar si las enzimas GPx y SOD son diferentes en *K. marxianus* respecto a *S. cerevisiae*, produciendo una mayor capacidad catalítica.
- d. Establecer las desviaciones metabólicas después de un estrés oxidativo que estimulen la generación de compuestos de interés como son los ésteres en las bebidas alcohólicas.
- e. Conocer si otros tipos de estrés como temperatura, pH, osmótico o presencia de compuestos inhibidores de crecimiento como saponinas y furfural incrementan la capacidad de respuesta al estrés oxidativo en *K. marxianus* y les permite una mayor adaptación a condiciones de fermentación estresantes.
- f. Evaluar la capacidad fermentativa después de un estrés oxidativo en jugos de agave, uva, caña, etc, y establecer si son capaces de realizar la fermentación completa, así como, su composición volátil.

## 10. Referencias

Arellano M, Gschaedler A, Alcazar M (2012) Major volatile compounds analysis produced from mezcal fermentation using gas chromatography equipped headspace (GC–HS), Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications, Bekir Salih and Ömür Çelikkıçak (Ed.), ISBN: 978-953-51-0127-7. InTech. pp 73-88

Arellano, M., Pelayo, C., Ramirez, J., y Rodriguez, I. (2008). Characterization of kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeasts isolated from agave juice. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:835-841

Attfield PV, Kletsas S (2000) Hyperosmotic stress response by strains of bakers' yeasts in high sugar concentration medium. *Lett Appl Microbiol.* 31:323-7.

Beckhouse AG, Grant CM, Rogers PJ, Dawes IW and Higgins VJ (2008) The adaptive response of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* to hydrogen peroxide is mediated by the Yap1 and Skn7 transcription factors. *FEMS Yeast Res.* 8:1214–1222

Belo I, Pinheiro R, Mota M. (2005) Morphological and physiological changes in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidative stress from hyperbaric air. *J Biotechnol* 115:397-404

Biryukova E N, Medentsev A G, Arinbasarova A Y, Akimenko V K (2006) Tolerance of the yeast *Yarrowia lipolytica* to oxidative stress. *Microbiology* 75:243-247

Blomberg A (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett* 182:1-8

Bravim F, Palhano FL, Fernandes AA, Fernandes PM. (2010) Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 37:1071-1079

Cardona F, Carrasco P, Pérez-Ortín J, del Olmo M, Aranda A (2007) A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *Int J Food Microbiol* 114:83-91

Carrasco P, Querol A, del Olmo M (2001) Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch Microbiol* 175:450-457

Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes *Mol Biol Cell.* 12:323–337.

Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, and Bähler J (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* 14:214–229.

Cohen T, Lee K, Rutkowski, H, Strich R (2003) Ask10p mediates the oxidative stress-induced destruction of the *Saccharomyces cerevisiae* C-type cyclin Ume3p/Srb11p. *Eukariot Cells* 2:962-970

Cyrne L, Antunes F, Sousa-Lopes A, Diaz-Bérrio J, Marinho S (2010) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is largely unresponsive to low regulatory levels of hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochem* 11:49

De León-Rodríguez A, González-Hernández L, Barba de la Rosa P, Escalante-Minakata P, López M (2006) Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *J Agric Food Chem* 54:1337-1341

Dellomonaco C, Amaretti A, Zanoni S, Pompei A, Matteuzzi D, Rossi M (2007) Fermentative production of superoxide dismutase with *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34:27-34

Demasi A, Pereira G, Netto L (2006) Yeast oxidative stress response. Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *FEBS J* 273:805-816

Eskander J, Lavaud C, Harakat D (2010) Steroidal saponins from leaves of *Agave macrocarantha*. *Fitoterapia* 81:371-374

Estruch F (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24:469-486

Favre C, Aguilar P S, Carrillo M C (2008) Oxidative stress and chronological aging in glycogen-phosphorylase-deleted yeast. *Free Radic Biol Med* 45:1446-1456

Fickers P, Fudalej F, Nicaud JM, Destain J, Thonart P (2005) Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* 115:379-86

Fitzgerald DJ, Stratford M, Gasson MJ, Ueckert J, Bos A, Narbad A (2004) Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *J Appl Microbiol* 97:104-113

Flattery-O'Brien J, Collinson LP, Dawes IW (1993) *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. J Gen Microbiol 139:501-507

Flattery-O'Brien JA, Dawes IW (1998) Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function J Biol Chem 273:8564-71.

Fleet G H (2007) Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. Current Opinion in Biotechnology 18:170–175

Folch-Mallol J L, Garay-Arroyo A, Lledías F, Covarrubias R A A (2004) La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Rev Latinoam Microbiol 46: 24-46.

Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Appl Microbiol Biotechnol. 79:339-54.

Garre E, Raginel F, Palacios A, Julien A, Matallana E (2010) Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. Int J Food Microbiol. 136:295-303.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, and Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes Mol Biol Cell 11: 4241–4257.

Gershon H, Gershon D (2000) The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. Mech Ageing Dev 120:1-22

Gille G, Sigler K (1995) Oxidative stress and living cells. Folia Microbiol 40:131-152

González-Siso MI, García-Leiro A, Tarrío N, Cerdán ME (2009) Sugar metabolism, redox balance and oxidative stress response in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *Microb Cell Fact* 8:46-63

Guerzoni ME, Ferruzzi M, Sinigaglia M, Criscuoli GC (1997) Increased cellular fatty acid desaturation as a possible key factor in thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* 43:569-576

Gschaedler A, Ramírez J, Díaz D, Herrera E, Arrizón J, Pinal L, Arellano M (2004) Fermentación. En: *Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas*. Guadalajara, Jalisco, México: CIATEJ. pp. 61-120

Halliwell B, Gutteridge C (2007) *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford, UK: Oxford University Press. pp 488-613

Higgins V J, Beckhouse A G, Oliver A D, Rogers P J, Dawes, I W (2003) Yeast genome-wide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during the initial stages of an industrial lager fermentation. *Appl Environ Microbiol* 69:4777-4787

Herdeiro RS, Pereira MD, Panek AD, Eleutherio EC (2006) Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1760:340-346

Herrero E, Ros J, Bellí G, Cabisco E. (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1780:1217-35



Igual JC and Estruch F (2000) Signalling Stress in Yeast. Food Technol Biotech 38:263-276.

Ivorra, C, Pérez-Ortíz JE and del Olmo M (1999) An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. Biotechnol Bioengin. 64, 698– 708.

Jamieson DJ (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. J Bacteriol 174:6678-6681

Jamieson DJ, Stephen DW, Terrière EC. (1996) Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett 138:83-8.

Joon L, Ian W D, Jung-Hye R. (1995) Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. Microbiology 141:3127-3132

Kim IS, Moon HY, Yun HS, Jin I. (2006) Heat shock causes stress and induces a variety of cell rescue proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. J Microbiol 44:492-501

Kurtzman CP y Fell JW. (1998) The yeast: a taxonomic study. Fourth revised and enlarge revision. Elsevier Amsterdam Netherlands

Lappe-Oliveras P, Moreno-Terrazas R, Arrizón-Gaviño J, Herrera-Suárez T, García-Mendoza A, Gschaedler-Mathis A (2008) Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. FEMS Yeast Res 8:1037-1052

Lachance MA (1995) Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 68:151-160

Liang G, Liao X, Du G, Chen J (2009) A new strategy to enhance glutathione production by multiple H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stresses in *Candida utilis*. *Bioresour Technol* 100:350-355

Limtong S, Sringiew C, Yongmanitchai W (2007) Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresour Technol*. 98:3367-3374

Madrid M, Soto T, Franco A, Paredes V, Vicente J, Hidalgo E, Gacto M, and Cansado J. (2004) A cooperative role for Atf1 and Pap1 in the detoxification of the oxidative stress induced by glucose deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 279:41594-41602

Magwene PM, Kayıkçı O, Granek JA, Reininga JM, Scholl Z, Murray D (2011) Outcrossing, mitotic recombination, and life-history trade-offs shape genome evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 108:1987-1992

Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15:2227-2235

Martini A, Ciani M, and Scorzetti G (1996) Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am J Enol Vitic* 47:435-440

Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W (1996) The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* 19:651-658

Moradas-Ferreira P, Costa V (2000) Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Rep* 5:277-285.

Ng C H, Tan S X, Perrone G G, Thorpe G W, Higgins V J, Dawes I W (2008) Adaptation to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of NADPH-generating systems and the SKN7 transcription factor. *Free Radic Biol Med* 44:1131-45

Nikolaoua E, Souflerosb EH, Bouloumpasib E, Tzanetakisa N (2006) Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their enological characteristics and vinification results. *Food Microb.* 23:205-211

NOM-070-SCFI-1997 (1997) Bebidas Alcohólicas, Mezcal-Especificaciones. México, D.F., México: SCFI. pp. 2-31

Ojovan SM, Knorre DA, Markova OV, Smirnova EA, Bakeeva LE, Severin FF (2011) Accumulation of dodecyltriphenylphosphonium in mitochondria induces their swelling and ROS-dependent growth inhibition in yeast. *J Bioenerg Biomembr* 43:175-80

Osorio H, Carvalho E, del Valle M, Günther-Sillero A, Moradas-Ferreira P, Sillero A (2003) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not menadione, provokes a decreased in the ATP and increase in the inosine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. An experimental and theoretical approach. *Eur J Biochem* 270:1578-1589

Palmqvist J, Almeida S, Hahn-Hägerdal B (1999) Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *S. cerevisiae* in bath culture. *Biotechnol Bioeng* 62:447-454

Pereira da Silva B, Valente AP, Paz Parente P (2006) A new steroidal saponin from *Agave shrevei*. *Nat Prod Res* 20:385-390

Pérez-Torrado R, Gómez-Pastor, R, Larsson, C, Matallana E (2009) Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:951-960

Pinheiro R, Belo I, Mota M (2002) Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:842-847

Pretorius, I, van der Westhuizen T and Augustyn O (1999) Yeast biodiversity in vineyard and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *S Afr J Enol Vitic* 20:61–74

Procopio S, Qian F, Becker T (2011) Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohols and ester metabolism during beverages fermentation. *Eur. Food Res Technol.* 23:721-729.

Rodríguez-Manzaneque MT, Ros J, Cabisco E, Sorribas A, Herrero E (1999) Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19:8180-8190

Romano P, Capece A, Jespersen L (2006) Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. *Yeasts in food and beverages*. Querol A, Fleet G (Editors.) Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. pp. 13-53

Sánchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. EMBO J 11:2357-2364

Silva VC, Peres MFS and Gattás EAL (2009) Application of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* in the field of food industry - A review. J Food Agricul Environ Vol.7 (2) : 268-273. 2009

Stephen S, Jamieson DJ (1997) Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene by hydrogen peroxide. Mol Microbiol 23:203-210

Swiegers J H, Pretorius I S (2005) Yeast modulation of wine flavour. Adv in appl microbiol 57:131-175.

Thorpe GW, Fong CS, Alic N, Higgins VJ, Dawes IW (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. Proc Natl Acad Sci 101:6564-6569

Varela JC, Praekelt UM, Meacock PA, Planta RJ, Mager WH (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. Mol Cell Biol 15:6232–6245.

Verbelen PJ, Depraetere SA, Winderickx J, Delvaux FR, Delvaux F (2009) The influence of yeast oxygenation prior to brewery fermentation on yeast metabolism and the oxidative stress response. FEMS Yeast Res 9:226-39

Vivancos AP, Jara M, Zuin A, Sansó M, Hidalgo E (2006) Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, different response pathways. Mol Genet Genomics 276:495-502

Voorst Fv, Houghton-Larsen J, Jonson L, Kielland-Brandt MC, Brandt A (2006) Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast*. 2006 23:351-359.

Walker GM (1998) *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley and Sons England pp 1-9.

Wei W, McCusker JH, Hyman RW, Jones T, Ning Y, Cao Z, Gu Z, Bruno D, Miranda M, Nguyen M, Wilhelmy J, Komp C, Tamse R, Wang X, Jia P, Luedi P, Oefner PJ, David L, Dietrich FS, Li Y, Davis RW, Steinmetz LM (2007) Genome sequencing and comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strain YJM789. *Proc Natl Acad Sci* 104(31):12825-30

Westwater C, Balish E, Schofield DA (2005) *Candida albicans* conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing. *Eukaryot Cell* 10:1654-1661

Zakrajsek T, Raspor P, Jamnik P (2011) *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism – characterization at cellular and proteome level. *J Proteomics* 74:2837-2845