



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“EFECTO DEL FURFURAL Y EL ÁCIDO ACÉTICO EN LA  
FERMENTACIÓN Y BIOENERGÉTICA DE *Scheffersomyces*  
*stipitis* Y *Saccharomyces cerevisiae*”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

JOSÉ DE JESÚS SAUCEDO GUTIÉRREZ

DIRIGIDA POR

Dr. JOSÉ ÁNGEL GRANADOS ARVIZU

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Efecto del furfural y el ácido acético en la  
fermentación y bioenergética de *Scheffersomyces*  
*stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

**por**

José de Jesús Saucedo Gutiérrez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** FQLIN-289618



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DEL FURFURAL Y EL ÁCIDO ACÉTICO EN LA  
FERMENTACIÓN Y BIOENERGÉTICA DE *Scheffersomyces  
stipitis* Y *Saccharomyces cerevisiae*”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**JOSÉ DE JESÚS SAUCEDO GUTIÉRREZ**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. JOSÉ ÁNGEL GRANADOS ARVIZU**

**SINODALES**

**Dr. JOSÉ ÁNGEL GRANADOS ARVIZU**

**DIRECTOR**

**Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA**

**SINODAL**

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**

**SINODAL**

**Dr. ALDO AMARO REYES**

**SINODAL**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## **Dedicatoria**

Para mi familia, quienes en toda mi vida han sido fuente de inspiración y de fortaleza. Su dedicación y sacrificio fue el motor que impulsó cada paso que he dado, cada desafío superado es un reflejo de la resiliencia que me han enseñado, este logro es tanto suyo como mío, cada página escrita es un tributo para ustedes. Agradezco infinitamente su fe en mis habilidades, el presente trabajo se los dedico con todo mi corazón.

### **Agradecimientos.**

La elaboración de esta tesis fue posible gracias al respaldo financiero proporcionado por el laboratorio de biotecnología en alimentos del Dr. Carlos Regalado en el parque Biotecnológico de la Universidad Autónoma de Querétaro, al Tecnológico de Monterrey campus Querétaro que me permitió realizar experimentos en sus instalaciones. Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Ashutosh Sharma por su valiosa colaboración en la medición de la producción de bioetanol mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier. Al MC. Andrés Carrillo Garmendia por guiarme y apoyarme con los experimentos de potencial de membrana mitocondrial.

## **Agradecimientos.**

Expreso mi profundo agradecimiento a aquellas personas que han contribuido de forma significativa en el desarrollo del presente trabajo, el cual no solo representa mi esfuerzo, sino también la suma de su apoyo.

Agradezco especialmente a mi asesor, el Dr. Ángel, por depositar su confianza en mí. Su orientación, dedicación, apoyo y experiencia han sido clave para inspirarme a alcanzar estándares más altos. A la Dra. Monse, por compartirme sus conocimientos, por guiarme para crecer profesionalmente y por su amistad. Al Dr. Regalado y el Dr. Aldo por sus observaciones detalladas y críticas que han sido fundamentales para el desarrollo del proyecto. A la Universidad Autónoma de Querétaro por ser mi segundo hogar, por brindarme un entorno académico enriquecedor, para mi crecimiento personal y académico.

A mi mamá, tus palabras de aliento y tu presencia constante fueron refugio en los momentos de incertidumbre. A mi papá, tu ejemplo de perseverancia y de compromiso con mi educación son la razón por la cual he llegado hasta aquí. A mi hermano, gracias por ser mi faro en la tormenta, mi cómplice en la risa y mi apoyo inquebrantable. A mis amigos que considero como hermanos, Alexis, Luis y Daniel, su apoyo dentro y fuera del laboratorio convirtieron los desafíos en aventuras compartidas.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL .....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Biomasa lignocelulósica .....	4
2.1.1 Celulosa .....	5
2.1.2 Hemicelulosa.....	6
2.1.3 Lignina.....	6
2.2 Biocombustibles .....	7
2.2.1 Biocombustibles de primera generación.....	7
2.2.2 Biocombustibles de segunda generación .....	8
2.2.2.1 Bioetanol .....	8
2.2.3 Biocombustibles de tercera generación.....	9
2.3 Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.....	9
2.3.1 Hidrólisis ácida de la biomasa lignocelulósica.....	12
2.4 Fermentación.....	13
2.5 Levaduras para producir bioetanol .....	14
2.6 Metabolismo de las levaduras .....	15
2.7 Inhibidores de la fermentación alcohólica.....	19
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 General.....	22
4.2 Específicos .....	22
5. METODOLOGÍA .....	23
5.1 Materiales .....	23
5.1.1 Reactivos.....	23

5.1.2 Cepas .....	23
5.2 Métodos.....	24
5.2.1 Esquema experimental.....	24
5.2.2 Determinación de la velocidad específica de crecimiento .....	25
5.2.3 Parámetros bioenergéticos.....	25
5.2.3.1 Potencial de membrana mitocondrial (PMM) .....	25
5.2.3.2 Determinación de especies reactivas de oxígeno .....	26
5.2.3.3 Cuantificación del flujo glucolítico a través de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) .....	27
5.2.4 Fermentación .....	28
5.2.5 Análisis Estadístico.....	29
6. RESULTADOS .....	30
6.1 Cinéticas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> .....	30
6.2 Cinéticas de crecimiento de <i>S. stipitis</i> .....	30
6.3 Velocidad específica de crecimiento de <i>S. stipitis</i> . .....	32
6.4 Determinación de especies reactivas de oxígeno .....	34
6.5 Tasa de Acidificación Extracelular (ECAR).....	36
6.6 Potencial de membrana mitocondrial (PMM).....	38
6.7 Determinación de biomasa por gravimetría .....	40
6.8 Consumo de glucosa.....	42
6.9 Producción de bioetanol .....	44
7. DISCUSIÓN.....	46
7.1 Cinéticas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> .....	46
7.2 Cinética de crecimiento de <i>S. stipitis</i> .....	48
7.3 Velocidad específica de crecimiento de <i>S. stipitis</i> .....	53
7.4 Especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	56
7.5 Tasa de acidificación extracelular (ECAR) .....	60
7.6 Potencial de membrana mitocondrial (PMM).....	63
7.7 Fermentación.....	67
8. CONCLUSIONES .....	79
9. REFERENCIAS .....	80



ANEXOS..... 98

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Tratamientos experimentales .....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Cinéticas de crecimiento de <i>S. stipitis</i> .....	30
2. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) .....	32
3. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	34
4. Tasa de acidificación extracelular (ECAR) .....	36
5. Potencial de membrana mitocondrial (PMM) .....	38
6. Producción de biomasa .....	40
7. Consumo de glucosa por método de DNS .....	42
8. Producción de bioetanol .....	44

## RESUMEN

La biomasa lignocelulósica es una fuente abundante de azúcares para producir bioetanol, antes de la fermentación, necesita un pretratamiento que convierte la celulosa y hemicelulosa en azúcares simples, sin embargo, provoca la formación de inhibidores. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del furfural y ácido acético sobre el crecimiento, fermentación y los parámetros bioenergéticos de *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se emplearon 0.1, 0.2 y 0.3 % (v/v) de furfural, de ácido acético y la combinación de estos, usando glucosa 0.5 M a 30 °C por 48 horas y 250 rpm. Se evaluó la velocidad específica de crecimiento, consumo de la fuente de carbono, producción de biomasa y la producción de etanol durante 48 h. Se cuantificaron las especies reactivas de oxígeno, tasa de acidificación extracelular y potencial de membrana mitocondrial. *S. cerevisiae* no creció en los tratamientos empleados, mientras que *S. stipitis* creció en la mayoría de tratamientos. El aumento en la concentración del furfural y del ácido acético disminuyeron la generación de biomasa, consumo de glucosa y la producción de etanol. El furfural al 0.1 % (v/v) aumentó la tasa de acidificación extracelular, mientras que el ácido acético la disminuyó. Ambos inhibidores redujeron el potencial de membrana mitocondrial a un nivel similar, mientras que la acumulación de especies reactivas de oxígeno fue mayor en la mezcla a 0.1 % (v/v) de cada inhibidor, evidenciando un efecto sinérgico. Los resultados obtenidos nos ayudan a entender el efecto de los inhibidores sobre el metabolismo de las levaduras con el fin de lograr condiciones óptimas para la producción de bioetanol.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El crecimiento exponencial de la población y el alto crecimiento de la actividad industrial han ocasionado un aumento constante en la demanda de la energía. Una de las principales fuentes de energía son los combustibles fósiles, los cuales son utilizados para el sector industrial, agricultura, construcción y principalmente en el transporte.

Al ser fuentes de energía no renovables se convierten en un problema, ya que fuentes como hidrocarburos derivados del petróleo como lo son la gasolina y el diesel son componentes que no se pueden recuperar con facilidad. Por lo cual, a medida que pasa el tiempo dicho recurso natural se verá notablemente disminuido, además de que genera la producción de gases nocivos para la salud y el medio ambiente, generando problemas como el calentamiento global y el cambio climático.

Bajo este contexto, los biocombustibles emergieron como una alternativa prometedora porque podrían reducir la dependencia de los combustibles fósiles y al mismo tiempo mitigar los efectos del efecto invernadero. El biocombustible es una fuente de energía producida a partir de un microorganismo vivo, dentro de ellos el más estudiado es el bioetanol, un alcohol que se puede producir a partir de una variedad de materias primas renovables, dentro de ellas, la biomasa lignocelulósica. La conversión eficiente de esta biomasa en bioetanol es un desafío en la producción de biocombustibles, debido a que su estructura es compleja, lo que dificulta a los microorganismos convertir los carbohidratos en bioetanol.

Por lo anterior, es necesario realizar un pretratamiento para descomponer la estructura compleja del material, lo que permitirá la hidrólisis y fermentación. El pretratamiento más utilizado dado a su gran efectividad para romper las estructuras de la lignocelulosa es el ácido. Sin embargo, este procedimiento conlleva a un desafío, y es que, debido a su reactividad, termina generando inhibidores, los cuales son subproductos que afectan negativamente los rendimiento de producción de bioetanol.

Dos de los inhibidores más comunes son el ácido acético y el furfural, estos compuestos se liberan durante el pretratamiento ácido y pueden tener efectos perjudiciales en las levaduras utilizadas en la fermentación. Las levaduras de mayor interés para uso industrial son *Saccharomyces cerevisiae*, levadura Crabtree positiva capaz de fermentar una gran cantidad de carbohidratos y *Scheffersomyces stipitis*, cepa Crabtree negativa, la cual se caracteriza por ser más resistente a inhibidores.

Dichos inhibidores pueden ejercer efectos negativos tanto en el crecimiento y en la fermentación del bioetanol, por lo que es fundamental comprender en profundidad los mecanismos de inhibición y desarrollar estrategias para mitigar sus efectos negativos. El presente trabajo se centra en evaluar el efecto del furfural y ácido acético sobre el crecimiento, fermentación y parámetros bioenergéticos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Scheffersomyces stipitis*. Con lo anterior se contribuirá al avance del conocimiento en la producción de bioetanol y viabilidad comercial de los biocombustibles.

## **2. ANTECEDENTES**

La economía global es dependiente de la energía proveniente de combustibles fósiles para producir electricidad, carburantes y sustancias químicas, los cuales son fundamentales para llevar a cabo actividades económicas como la industria, agricultura, construcción y transporte (Holechek y col., 2022).

Año con año, la humanidad se enfrenta a la problemática de una mayor demanda de energía, por lo que la búsqueda de fuentes alternativas es una opción que se debe considerar. Recientemente, se ha establecido que la energía que se produce a través de biocombustibles puede ser un suministro estable (Krishnan y col., 2018).

Los combustibles fósiles no son una fuente de energía renovable, en comparación a los biocombustibles como el bioetanol, el cual se produce a partir de la fermentación de azúcares, provenientes de materiales residuales o subproductos. En los últimos años, se ha incrementado la cantidad de investigaciones sobre la producción de dicho biocombustible. Por lo anterior, cada vez existen más estudios con los cuales se pueden comparar distintos métodos que permitan obtener mayores rendimientos de producción de bioetanol (Zheng y col., 2022). Una opción es producir bioetanol a través de la biomasa lignocelulósica, compuesta en su mayoría de celulosa, hemicelulosa y lignina. Cuando se produce bioetanol a partir de dicho material se considera como biocombustible de segunda generación (Mikulski y Kłosowski, 2020).

Producir bioetanol a partir de este material es una buena área de oportunidad, debido a que la mayoría de los residuos que generan la agricultura y la agroindustria son residuos de biomasa lignocelulósica (Clauser y col., 2021). Se ha considerado que

emplear biomasa lignocelulósica es más conveniente debido a su alta disponibilidad, permitiendo que los costos de producción sean menores, además es un material totalmente renovable (Yousuf y col., 2019). Debido a la gran cantidad de componentes que contiene la biomasa procedente de plantas, es necesario encontrar un microorganismo que a nivel industrial nos permite obtener conversiones eficientes de lignocelulosa a etanol.

## 2.1 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es un material cuya accesibilidad ha aumentado por desechos que generan las industrias y los residuos agrícolas (Magalhães y col., 2019). Se ha establecido que los componentes de la lignocelulosa son sustratos renovables y que al mismo tiempo son importantes para la producción de bioetanol, por lo que son fundamentales para alcanzar la sostenibilidad ambiental (Limayem y Ricke, 2012). Con lo cual se pretende cubrir uno de los objetivos de desarrollo sostenible para nuestro país. Por esta razón, aprovechar la biomasa lignocelulósica para producir biocombustibles es un área de oportunidad, ya que permite generar un producto de interés para el beneficio humano, se encuentra en gran cantidad y, además, al ser utilizado no genera daños al ambiente.

La biomasa lignocelulósica se puede clasificar en dos formas. La primera es la leñosa, y se refiere a aquella que tiene ver con la madera, mientras que la segunda es no leñosa e involucra residuos agrícolas, plantas o fibras vegetales. De ambos tipos de lignocelulosa, es importante considerar que su composición y sus



propiedades físicas son diferentes (Tye y col., 2016). Una de las principales características de la biomasa lignocelulósica es su naturaleza resistente a la degradación, convirtiéndolo en un obstáculo para la producción de bioetanol. Por lo tanto, es necesario entender su estructura y sus características químicas para poder superar esta resistencia. La lignocelulosa es un material heterogéneo conformado por lignina, se encuentra unida a la hemicelulosa por medio de enlaces covalentes, mientras que la celulosa y la hemicelulosa se encuentran unidas por enlaces de hidrógeno (Zoghlami y Paës, 2019).

### 2.1.1 Celulosa

La celulosa es un material fibroso e insoluble en agua, conformado por monómeros de glucosa cuya unión se da por enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos, formando cadenas que toman una disposición de microfibrilla (Velmurugan y col., 2020). Cada microfibrilla de celulosa cuenta con 36 cadenas de glucosa. En las cadenas de celulosa se puede tener un grado de polimerización de 2000 a 2500 residuos de glucosa (Festucci-Buselli y col., 2007). La celulosa consiste en partes cristalinas y no cristalinas, en su forma cristalina, los puentes de hidrógeno son los que se encargan de estabilizar las cadenas de glucosa, mientras que las regiones con poca interacción forman la parte amorfa. Entre ambas partes, la forma no cristalina es más susceptible a la degradación, mientras la parte cristalina es más resistente (Rusli y col., 2021).

### 2.1.2 Hemicelulosa

Es un compuesto más complejo, ya que puede estar compuesto de varios polisacáridos con estructuras lineales o ramificados derivados de distintos azúcares (Sutikno y Kismurtono, 2018). De los monosacáridos que componen a la hemicelulosa se encuentran pentosas y hexosas. De las pentosas se encuentran D-xilosa y L-arabinosa, por otro lado, de las hexosas se pueden encontrar D-galactosa, D-glucosa, y D-manosa (Musa y Bwatanglang, 2020). En comparación a la celulosa, la hemicelulosa es más fácil de hidrolizar para obtener los monómeros de pentosas y hexosas (Laca y col., 2019).

### 2.1.3 Lignina

La lignina es un componente importante para las células vegetales, permite que la pared celular sea más robusta, siendo el componente más difícil de degradar, a diferencia de la celulosa y de la hemicelulosa (Yadav y col., 2022). La lignina es un polímero aromático que está conformado por tres monómeros fenilpropanoicos, los cuales se encuentran unidos por enlaces éter, y junto con la hemicelulosa tienen la función de adherir las microfibrillas de celulosa (Zhang y col., 2022). La estructura de la lignina hace que físicamente se convierta en una barrera que limita la conversión de polisacáridos a monosacáridos debido a la unión irreversible e improductiva de las enzimas (Robak y Balcerek, 2020).

Afortunadamente, la lignina es una barrera que se puede degradar por medio de distintos pretratamientos para hacer más accesible a la celulosa y a la hemicelulosa a la acción de las enzimas (Yuan y col., 2021). En los procesos de producción de

bioetanol a partir de material lignocelulósico se pueden obtener cantidades significativas de lignina. Dicho subproducto se puede utilizar para producir adhesivos para madera, adhesivos sensibles a la presión, protectores de rayos ultravioleta, y elastómeros termoplásticos, entre otros productos. Por lo anterior, la lignina se ha convertido en un componente de valor por ser una fuente renovable (Xia y col., 2020).

## 2.2 Biocombustibles

El término biocombustible se puede definir como un combustible generado por microorganismos, proveniente de biomasa, plantas o material biológico. Su definición más simple sería como combustible que fue fabricado a partir de un organismo vivo, es importante destacar que los biocombustibles se pueden encontrar de forma líquida, sólida o gaseosa (Ruan y col., 2019). Existe una amplia variedad de materias primas que pueden ser usadas para la producción de biocombustibles y considerando esto, se podrán clasificar estos compuestos como biocombustibles de primera, segunda y tercera generación (Nanda y col., 2018).

### 2.2.1 Biocombustibles de primera generación

Los biocombustibles de primera generación se obtienen a partir de cultivos, los cuales pueden ser de maíz, trigo u otros cereales como la cebada, caña de azúcar, remolacha, coco o girasol, entre otros. Esta generación de biocombustibles ha resultado ser útil, desafortunadamente amenaza el abastecimiento de los alimentos (Dahman y col., 2019).

### 2.2.2 Biocombustibles de segunda generación

Los biocombustibles de segunda generación se obtienen a partir de lignocelulosa y a diferencia de la primera generación, esta no compite con los suministros de alimentos (Tudge y col., 2021). La materia prima que se puede utilizar para generar biocombustibles son biomasa vegetal no comestible, como los residuos agroindustriales. La ventaja de usar biomasa lignocelulósica radica en que es una buena fuente renovable y, a su vez, puede generar efectos positivos en el ambiente al aprovechar un residuo (Hernández-Beltrán y col., 2019). A pesar de que esta generación cuenta con beneficios prometedores, lo que dificulta la obtención de biocombustibles son los altos costos de producción, por lo que no se ha llegado a usar en escala comercial (Datta y col., 2019).

#### 2.2.2.1 Bioetanol

Los biocombustibles que se pueden obtener a partir de biomasa son extensos, y se pueden obtener de forma líquida, sólida y gaseosa. Dentro de los biocombustibles líquidos se encuentran el bioetanol, biobutanol, biometanol, biodiésel, entre otros. Para el caso de los sólidos, el carbón vegetal, conocido como bio-char, se obtiene por la descomposición térmica de la biomasa, y para los gaseosos se pueden obtener biogás o biohidrógeno (Sindhu y col., 2019). El bioetanol es un biocombustible líquido producido a través de la fermentación de biomasa lignocelulósica, es muy atractivo debido a su alto octanaje, para utilizarlo como combustible, ya que se puede mezclar con la gasolina hasta un 85 % (v/v) sin tener que modificar el motor (Bušić y col., 2018).

La producción de bioetanol generalmente contempla tres operaciones unitarias, las cuales son pretratamiento, fermentación y recuperación. El reto actual para obtener dicho biocombustible radica en reducir costos y al mismo tiempo obtener rendimientos altos (Rezania y col., 2020).

### 2.2.3 Biocombustibles de tercera generación

Los biocombustibles de la tercera generación se obtienen con el uso de biomasa de algas, su producción depende del contenido de lípidos de los microorganismos. Las ventajas de esta generación radican en que no es necesario el uso de alimentos, se obtienen altos rendimientos de producción y es un proceso asequible, debido a que los recursos necesarios son baratos. El problema de esta generación es que aún no se puede economizar por aspectos de viabilidad económica y evaluaciones de ciclos de vida (Rafa y col., 2021).

### 2.3 Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica

Los residuos de lignocelulosa tienen un gran potencial para producir distintos productos como biocombustibles, bioquímicos y biomateriales, convirtiéndolo en un material de gran impacto para una mayor sustentabilidad en el mundo (Borrero-López y col., 2022). A pesar de que es una gran idea utilizar residuos que consisten en lignocelulosa, el problema es su estructura compleja. Actualmente, el concepto de biorrefinerías se aplica a los procesos donde se convierte biomasa en energía. Las biorrefinerías se definen como estructuras en las cuales la biomasa se emplea en un proceso optimizado para la producción de múltiples productos como precursores

químicos, biodiesel y biocombustibles, como el bioetanol (Kumar y col., 2020). La composición heterogénea de la lignocelulosa y factores como la presencia de lignina, cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa hacen que la biomasa sea un material resistente a la hidrólisis catalizada por enzimas (Andlar y col., 2018).

La presencia de la lignina hace que sea necesario el uso de pretratamientos para aumentar la disponibilidad de los carbohidratos hacia las levaduras y consecuentemente obtener rendimientos altos de producción de bioetanol (Broda y col., 2022). Las microfibrillas de la celulosa cuentan con regiones cristalinas y amorfas, las regiones cristalinas hacen que disminuyan los rendimientos de producción de bioetanol, por lo que es importante reducirlas (Vasić y col., 2021). Adicionalmente, es necesario considerar que, durante el proceso, se evite degradar los carbohidratos para prevenir la formación de inhibidores que afecten directamente la fermentación ya que esto puede derivar en procesos más costoso (Brodeur y col., 2011).

El pretratamiento se puede llevar a cabo de distintas formas, las cuales pueden ser por procesos biológicos, físicos, químicos o fisicoquímicos. Los pretratamientos físicos reducen el tamaño de partícula de los residuos y disminuyen la cristalinidad por medio de molienda o trituración; mejorando el proceso de hidrólisis, pero desafortunadamente a escala industrial resulta ser costoso por la cantidad de energía que se tiene que emplear (Baruah y col., 2018). El pretratamiento químico consiste en cambiar las propiedades recalcitrantes de la lignocelulosa por medio de

reacciones químicas utilizando ácidos, bases, líquidos iónicos u oxígeno (Jędrzejczyk y col., 2019). De todos los pretratamientos químicos, el ácido es el que más se suele emplear, debido a los altos rendimientos en la obtención de monómeros de carbohidratos comparados contra otros compuestos (Oriez y col., 2019). Los ácidos se pueden emplear concentrados o diluidos, ambos tienen la capacidad de obtener grandes cantidades de azúcares. Para el caso de los concentrados, resulta ser costoso porque se tienen que usar grandes cantidades, los reactores deben ser resistentes a la corrosión y debe considerarse un costo extra para la recuperación del ácido, por lo que el ácido diluido es más conveniente (Zheng y col., 2022).

El pretratamiento químico, en particular con ácidos diluidos, es el más comúnmente utilizado a nivel comercial, por ser económico y por su gran eficiencia para degradar la lignina (Niju y col., 2019). El inconveniente del uso de ácidos es la generación de inhibidores como hidroximetilfurfural, furfural y ácido acético, ya que son compuestos que provocan que el microorganismo muera o tenga un crecimiento más lento. Considerando lo anterior, es necesario buscar alternativas para reducir o eliminar la presencia de los inhibidores generados para evitar tener menores rendimientos de producción de etanol (Luo y col., 2022).

El pretratamiento biológico consiste en utilizar microorganismos como hongos para degradar la estructura de la biomasa, específicamente sus tres componentes; aunque no se suele emplear para la producción de bioetanol debido a que la degradación de la lignocelulosa es lenta (Galbe y Wallberg, 2019). Las enzimas

ligninolíticas (lacasas y peroxidasas) degradan la lignina por su alto potencial óxido reductor, oxidando la lignina directamente (Wang y col., 2018). Para obtener mejores rendimientos, se busca desarrollar microorganismos con mejor capacidad de realizar la hidrólisis, aunque otra alternativa es la combinación con pretratamientos físicos (Brodeur y col., 2011). De los pretratamientos fisicoquímicos, la extracción de fibra con amoníaco (AFEX), consiste en exponer la biomasa lignocelulósica a amoníaco anhidro con temperaturas moderadas y altas presiones para la ruptura de la celulosa cristalina. También se pueden emplear otros pretratamientos como procesamiento hidrotérmico, explosión de vapor, agua caliente líquida, fluidos supercríticos y mezcla de alta presión de CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (Silveira y col., 2015).

### 2.3.1 Hidrólisis ácida de la biomasa lignocelulósica

La hidrólisis es el paso en el que se obtienen los monómeros de hexosa y pentosa, que se encuentran dentro de la celulosa y de la hemicelulosa de la biomasa lignocelulósica. Los métodos de hidrólisis que se emplean para la producción de bioetanol son hidrólisis química con el uso de ácidos inorgánicos concentrados o diluidos, y el otro método es la hidrólisis enzimática (Periyasamy, 2018). Las enzimas y los ácidos tienen el mismo mecanismo de hidrólisis, ambos rompen los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 (Zhou y col., 2023). Cuando se aplica la hidrólisis química, al emplear ácidos concentrados se usan temperaturas bajas, mientras que al usar ácidos diluidos se usan temperaturas altas; el inconveniente de estos procesos es que, al emplear los ácidos a altas temperaturas, se generan compuestos que pueden



inhibir el crecimiento de los microorganismos en etapas posteriores (Baruah y col., 2018).

Por otro lado, la hidrólisis enzimática se realiza después del pretratamiento, utilizando celulasas, pudiendo utilizarse bacterias u hongos que producen dichas enzimas. Esto es un procedimiento más económico comparado con el uso de sustancias químicas; su desventaja son los tiempos largos de reacción (Damayanti y col., 2021).

## 2.4 Fermentación

Los monómeros de azúcares obtenidos después de realizar el pretratamiento y la hidrólisis se pueden utilizar para la obtención de bioetanol a través de la fermentación (Vasić y col., 2021). En este paso es donde la presencia de sustancias inhibidoras, puede resultar en un punto perjudicial para el proceso. Otro aspecto que puede afectar la productividad son la mezcla de pentosas y hexosas presentes, debido a que hay microorganismos que no son capaces de metabolizar las pentosas (Hashem y col., 2021).

Durante la fermentación, los factores ambientales como la temperatura, pH, concentración de bioetanol, concentración de sustrato y agitación influyen en los rendimientos (Selim y col., 2018). Por lo cual, es importante identificar las posibles condiciones de estrés que afectan la viabilidad y el rendimiento de la fermentación. Si la concentración de azúcares es alta, puede afectar por medio del estrés osmótico o a medida que se lleva a cabo la fermentación se irá acumulando el etanol, por lo

que una alta concentración puede tener impacto sobre el microorganismo (Samakkarn y col., 2021). El microorganismo siempre estará expuesto a condiciones que les generen estrés, para la producción de bioetanol es importante encontrar microorganismos que cuenten con una alta capacidad de tolerar dichas condiciones, para que su viabilidad no afecte los rendimientos de producción de bioetanol.

## 2.5 Levaduras para producir bioetanol

Las levaduras son microorganismos eucarióticos unicelulares, cuentan con núcleo, aparato de Golgi, mitocondria, vesículas, retículo endoplasmático y todo el contenido celular de la levadura que se encuentra envuelto por la membrana y pared celular (Walker, 1998). Se pueden reproducir asexualmente por gemación o sexualmente por formación de esporas (Hernández-Cervantes y col., 2020). Las levaduras tienen distintas aplicaciones, pueden producir alimentos como pan y cerveza, proteínas para uso terapéutico, biocombustibles, entre otras aplicaciones. Son microorganismos que se manipulan con facilidad, crecen rápido y se les pueden aplicar herramientas genéticas para comprender su metabolismo; con lo anterior son el modelo ideal para estudiar modelos eucarióticos (Tullio, 2022).

La fermentación alcohólica de las levaduras es un aspecto que está bien estudiado, se consideran excelentes microorganismos para producir bioetanol por su capacidad de fermentar distintos azúcares, tolerar temperaturas altas y concentraciones elevadas de azúcares y etanol (Tenea y Veintimilla, 2021).

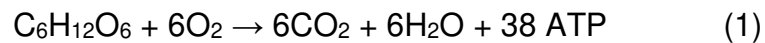
## 2.6 Metabolismo de las levaduras

El metabolismo involucra todas las reacciones catalizadas por enzimas que ocurren dentro del organismo y cuenta con distintas funciones. La primera consiste en obtener energía química, la segunda es convertir nutrientes en macromoléculas, la tercera es para ensamblar proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros componentes celulares; y la última consiste en la degradación de biomoléculas para funciones específicas (Jain y col., 2004). La glucosa es la fuente de energía más básica; el metabolismo del carbono es aquel que se encarga de procesarla, por lo que tendrá un impacto directo en la reproducción de las células. Para el caso de las levaduras, hay distintos tipos de metabolismos de la glucosa, el cual dependerá de la cantidad que se encuentre disponible (Maślanka y Zdraż-Tęcza, 2020).

Para que la célula pueda crecer, sintetizar biomoléculas y desarrollar otras actividades, requiere de una molécula portadora de energía, se le conoce como adenosín trifosfato (ATP). Su obtención es por medio de dos vías; la primera es por respiración celular, mientras que la segunda vía corresponde a la fermentación. La respiración es la que resulta ser más eficiente en cuanto a la producción de ATP (Pfeiffer y Morley, 2014). La fermentación y la respiración se consideran metabolismos antagónicos. El metabolismo de la levadura dependerá de la respuesta a las condiciones fisiológicas o de los nutrientes disponibles (Malecki y col., 2016).

La respiración es un proceso metabólico donde se produce energía química a partir de la oxidación de moléculas orgánicas, como los carbohidratos. Este proceso

requiere la presencia de oxígeno, el ATP es la fuente estándar de energía que se libera en la respiración, por la desfosforilación del ATP a ADP. Este proceso metabólico involucra la glucólisis, el ciclo de Krebs y la transferencia de electrones del hidrógeno para sintetizar el ATP (Cox, 2013). En todo el metabolismo de la respiración se produce energía y una molécula de agua. Todo el proceso se puede representar mediante la Ecuación (1).



La glucólisis es una serie de reacciones enzimáticas para romper una molécula de glucosa para producir dos moléculas de piruvato. El piruvato obtenido en la vía glucolítica tiene dos posibles destinos, dependiendo de la levadura y de las condiciones en las que se encuentre (Pfeiffer y Morley, 2014). En ausencia de oxígeno, el piruvato se convertirá en lactato, mientras que en presencia de oxígeno será convertido a Acetil-CoA en la mitocondria para seguir el ciclo de Krebs y el transporte de electrones (Betts y col., 2022).

Ante condiciones de estrés, las células pueden regular el flujo glucolítico para sobrevivir por medio de enzimas que tengan regulación alostérica (hexoquinasa, fosfofructoquinasa y la piruvatoquinasa) o por medio de sustratos como ADP, ATP, NAD<sup>+</sup> y NADH (Posas y Nebreda, 2008). El ciclo de Krebs se da en la matriz mitocondrial y consta de una serie de reacciones en un circuito cerrado. Inicia con Acetil-CoA para terminar produciendo dióxido de carbono, y la mayoría de las

coenzimas reducidas para la generación de ATP en la cadena transportadora de electrones (Martínez-Reyes y Chandel, 2020).

El último paso es la fosforilación oxidativa, que consiste en una cadena en la que hay transferencia de electrones, los cuales son impulsados por la oxidación del sustrato que se ajusta para la síntesis de ATP a través de un gradiente transmembranal electroquímico (Horton y col., 2008). La transferencia de electrones se puede llevar a cabo por NADH a través de los complejos I, III y IV, o se puede dar por FADH<sub>2</sub> por los complejos II, III y IV. Ambos caminos son independientes, pero permanecen acoplados por el gradiente electroquímico de la membrana mitocondrial y solamente tienen similitud al comenzar con la reducción de quinona a hidroquinona (Korla y Mitra, 2013).

La fermentación es un término que cuenta con varias definiciones. La definición más aceptada es la reacción incompleta de oxidación-reducción en la que tanto el donador como el aceptor de electrones son compuestos orgánicos producidos a partir de la degradación del mismo sustrato inicial (Al-Daccache y col., 2021).

La fermentación complementa la glucólisis y hace posible que se pueda seguir produciendo ATP en ausencia de oxígeno, ya que oxida el NADH que se produjo en la glicólisis para que vuelva a ser utilizado y producir más ATP para el organismo (Choudhary y col., 2018). En la producción de etanol, se ha logrado determinar el rendimiento teórico de producto/sustrato (Yp/s), siendo 0.511 g/g. Dicho valor

expresa la cantidad de etanol que puede producirse por cada gramo de glucosa consumida. Experimentalmente, el valor real será menor, porque el microorganismo primero produce el material necesario para la síntesis de componentes celulares que le permitan estar en un estado estable (Mutton, y col., 2019). Los factores ambientales como la disponibilidad de glucosa y los niveles de oxígeno pueden regular la respiración y fermentación de las levaduras, es importante destacar que las levaduras son capaces de adaptarse a las condiciones de crecimiento (Walker, 1998). Los nutrientes del medio no solo son sustratos para crecimiento, también sirven como señales para determinar su metabolismo y crecimiento, ya que cuentan con mecanismos que al detectar nutrientes ajustan sus rutas metabólicas para garantizar la supervivencia (Tsang y col., 2018).

Las levaduras se clasifican en fermentativas obligadas y fermentativas facultativas, de acuerdo con la forma en la que obtienen energía (Tofalo y Suzzi, 2016). Las levaduras fermentativas obligadas son aquellas levaduras que solo pueden metabolizar glucosa por medio de la fermentación, incluso en la presencia de oxígeno (Rodrigues y col., 2006). Dentro de las fermentativas facultativas se encuentran las Crabtree positivas, Crabtree negativas y las no fermentativas. Las Crabtree positivas, son levaduras que realizan la fermentación cuando se encuentran en medios con altas concentraciones de azúcares en presencia de oxígeno. Las Crabtree negativas, no crecen en condiciones anaeróbicas y no producen etanol en condiciones de aerobiosis; mientras que las no fermentativas no producen etanol (Walker, 2011). Para el caso del efecto Crabtree positivo, se puede dividir en dos subgrupos. El

primero es Crabtree a corto plazo, el cual activa de manera repentina la fermentación por las altas concentraciones de glucosa y el otro es el Crabtree a largo plazo, donde la fermentación aeróbica se encuentra en estado estacionario con las levaduras completamente adaptadas (De-Alteriis, 2018). El efecto Crabtree es también ocasionado porque la glucosa reprime la síntesis de varias enzimas respiratorias y gluconeogénicas, este fenómeno se le conoce como represión catabólica (Laussel y León, 2020).

## 2.7 Inhibidores de la fermentación alcohólica

Se ha demostrado que el furfural inhibe directamente a las enzimas como alcohol deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa; por lo que afecta directamente su crecimiento. También provoca la acumulación de especies reactivas de oxígeno, por lo que termina dañando los componentes principales de la célula (Liu y col., 2020). El ácido acético es un inhibidor que es capaz de atravesar la membrana de la célula para posteriormente afectar el metabolismo (Artifon y col., 2018). El crecimiento de la levadura se verá afectado por la acidificación intracelular, dicho estrés provoca que se reprima el uso de nutrientes y de energía; al mismo tiempo el ácido acético también genera daño oxidativo por las especies reactivas de oxígeno (Zhang y col., 2019).

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura Crabtree positiva y resulta ser la levadura más utilizada para la producción industrial de bioetanol por su gran capacidad para fermentar glucosa y por tener excelentes rendimientos de etanol. Mientras tanto,

*Scheffersomyces stipitis* es Crabtree negativa, es una levadura que se considera como gran candidato para producir bioetanol a partir de lignocelulosa por su capacidad de fermentar xilosa, pero también se ha demostrado que es capaz de catabolizar glucosa (Ruchała y col., 2020). Se ha demostrado que *S. stipitis* y otras levaduras Crabtree negativas son capaces de inducir la fermentación por la limitación de oxígeno, por lo que proporcionarle condiciones de microaerofilia permitirán a la cepa producir bioetanol (Jeffries y Van-Vleet, 2009).



### **3. HIPÓTESIS**

La presencia del furfural y ácido acético, al utilizar glucosa como fuente de carbono, impactará de manera similar en *S. cerevisiae* y *S. stipitis*. Dado que estos inhibidores afectan directamente la mitocondria, se postula que el incremento en la concentración de ambos inhibidores, estará correlacionado con un aumento en la desregulación del crecimiento, disminuyendo la fermentación y alterando los parámetros bioenergéticos como la acumulación de especies reactivas de oxígeno, potencial de membrana mitocondrial y tasa de acidificación extracelular.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Evaluar el efecto del furfural y ácido acético sobre el crecimiento, la fermentación y bioenergética de *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

### 4.2 Específicos

- Evaluar el efecto del furfural y el ácido acético en la velocidad específica de crecimiento de *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- Relacionar el efecto del furfural y el ácido acético sobre especies reactivas de oxígeno, potencial de membrana mitocondrial y en la tasa de acidificación extracelular de *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- Determinar la influencia del furfural y el ácido acético en la producción de biomasa, consumo de glucosa y producción de etanol utilizando *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Reactivos

Para los diversos experimentos se empleó extracto de levadura, furfural ACS reactivo 99 %, tartrato sódico potásico, hidróxido de sodio, ácido 3,5-dinitrosalisílico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), peptona de caseína, agar bacteriológico (BD Bioxon, Estado de México, México), extracto de levadura, glucosa monohidratada, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA), ácido acético glacial, alcohol etílico absoluto (Meyer, CDMX, México), NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J.T Baker, NJ, EUA).

#### 5.1.2 Cepas

Todos los experimentos se realizaron utilizando las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 y *Scheffersomyces stipitis* NRRLY-7124, mantenidos a -70 °C. Las levaduras se activaron usando medio YPD (10 g L<sup>-1</sup> extracto de levadura, 20 g L<sup>-1</sup> de peptona), adicionado con 20 g L<sup>-1</sup> glucosa, y creciéndolas a 30 °C por una noche a 250 rpm. Posteriormente, se propagaron en placas de agar YPD (20 g L<sup>-1</sup> agar bacteriológico, 10 g L<sup>-1</sup> extracto de levadura, 20 g L<sup>-1</sup> peptona y 20 g L<sup>-1</sup> glucosa) previas a los experimentos.

## 5.2 Métodos

### 5.2.1 Esquema experimental

Para los tratamientos se empleó la metodología propuesta por Granados-Arvizu y col. (2019). Se utilizó medio YPD con una concentración de glucosa de 0.5 M, como inhibidores se estudiaron furfural y ácido acético a tres concentraciones, 0.1, 0.2 y 0.3 % (v/v). Los tratamientos experimentales se llevaron a cabo por triplicado, considerándolos como se muestran a continuación (Cuadro 1):

Cuadro 1. Tratamientos experimentales

<b>Tratamiento</b>	<b>Fuente de carbono</b>	<b>Inhibidor</b>	<b>Concentración de inhibidor (%) (v/v)</b>
Control	Glucosa 0.5 M	-	-
1	Glucosa 0.5 M	furfural	0.1
2	Glucosa 0.5 M	furfural	0.2
3	Glucosa 0.5 M	furfural	0.3
4	Glucosa 0.5 M	Ácido Acético	0.1
5	Glucosa 0.5 M	Ácido Acético	0.2
6	Glucosa 0.5 M	Ácido Acético	0.3
7	Glucosa 0.5 M	Ácido acético+ furfural	0.1
8	Glucosa 0.5 M	Ácido acético+ furfural	0.2
9	Glucosa 0.5 M	Ácido acético+ furfural	0.3

### 5.2.2 Determinación de la velocidad específica de crecimiento

El crecimiento de ambas levaduras se evaluó empleando medio YPD a pH 5.0, usando glucosa 0.5 M como fuente de carbono. Los crecimientos se llevaron a cabo en microplaca de 96 pozos, usando un agitador orbital a 30 °C a 250 rpm. Se evaluó la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 h empleando un lector de microplacas multimodal (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Waltman, MA, EUA). Se usó el software GraphPad Prism (Version 8.0.1, San Diego CA, EUA) para determinar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), la cual se calculó mediante la Ecuación (2):

$$X_f = x_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

Donde  $x_0$  es la población inicial de células,  $X_f$  es la población final y  $t$  es el tiempo (h).

### 5.2.3 Parámetros bioenergéticos

Se seleccionaron los tratamientos donde se observó crecimiento para evaluar los parámetros bioenergéticos.

#### 5.2.3.1 Potencial de membrana mitocondrial (PMM)

El potencial de membrana mitocondrial se midió empleando el kit de ensayo JC-10 (Sigma-Aldrich) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las cepas de levadura se crecieron en medio YPD suplementado con 2 % de glucosa (p/v) durante toda la noche (12 h) a 30 °C, con agitación constante (250 rpm). Posteriormente, se midió la

DO<sub>600</sub> para determinar el volumen de inóculo necesario para una DO<sub>600</sub> inicial ~ 0.1, que se agregó a un matraz de 25 mL que contenía 5 mL de medio YPD con glucosa 0.5 M suplementado con furfural, ácido acético o la mezcla de estos, de acuerdo con los tratamientos del Cuadro 1. Se incubaron a 30 °C a 250 rpm, hasta alcanzar la fase media exponencial (DO<sub>600</sub> ~ 0.6). Posteriormente, se centrifugaron a 4000 x g durante 4 min, se lavaron y se resuspendieron en solución salina de fosfatos (PBS) cuya composición fue de 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Al final, se colocaron 50 µL de células resuspendidas (3x10<sup>6</sup> células/pocillo) en una placa oscura de 96 pocillos para incubarla a 37 °C por 30 min, se agregaron posteriormente 50 µL del tampón B a cada pocillo y se midió la fluorescencia con una intensidad de fluorescencia roja ( $\lambda_{ex} = 490 / \lambda_{em} = 525$  nm) y verde ( $\lambda_{ex} = 540 / \lambda_{em} = 590$  nm) con un lector de microplacas multimodal (Varioskan). Se empleó la relación de intensidad de fluorescencia rojo/verde para reportar el potencial de membrana mitocondrial (PMM).

#### 5.2.3.2 Determinación de especies reactivas de oxígeno

La determinación de especies reactivas se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por Sinha y Pick (2020) con algunas modificaciones. Se crecieron los inóculos en medio YPD con glucosa al 2 % (p/v) en agitación a 250 rpm y 30 °C por una noche (12 h). Una vez transcurrido el tiempo se midió la DO<sub>600</sub> para determinar el volumen de inóculo necesario para una DO<sub>600</sub> inicial ~ 0.1, al que se agregó a un matraz de 25 mL que contenía 5 mL de medio YPD con glucosa 0.5 M considerando los tratamientos del Cuadro 1. Se incubaron a 30 °C a 250 rpm, hasta alcanzar la fase

media exponencial ( $DO_{600} \sim 0.6$ ). Posteriormente, se recolectaron aproximadamente  $2 \times 10^7$  células a  $3,000 \times g$  durante 3 min, se desechó el sobrenadante (conservando en el tubo 200  $\mu$ L de medio), homogenizando las células y se les adicionó 4  $\mu$ L de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (5 mg/mL disuelto en agua destilada) para posteriormente incubarlas por 1 h a 28 °C con agitación moderada (200 rpm). Transcurrido el tiempo, las células se recolectaron a  $3,000 \times g$  durante 3 min y se lavaron 2 veces con 500  $\mu$ L de (PBS). En seguida, las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de PBS y se transfirieron 150  $\mu$ L de células suspendidas a un pozo de una microplaca (negra de 96 pozos). Por último, se midió la fluorescencia empleando un lector de microplacas (Varioskan) a una longitud de onda de  $484 \pm 10$  nm (excitación) y  $518 \pm 10$  nm (emisión).

#### 5.2.3.3 Cuantificación del flujo glucolítico a través de la tasa de acidificación extracelular (ECAR)

El ECAR se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por Olivares-Marin y col. (2018). Se crecieron los inóculos en medio YPD con glucosa al 2 % (p/v) en agitación a 250 rpm y 30 °C por una noche (12 h). Posteriormente, se inocularon 1.8 mL de *S. stipitis* crecida en matraz de 250 mL con 50 mL de medio empleando glucosa 0.5 M considerando los tratamientos del Cuadro 1 y se incubaron a 30 °C a 250 rpm, hasta que se alcanzó la fase media exponencial ( $DO_{600} \sim 0.6$ ). Posteriormente, se cosecharon las células a 5,000 rpm por 5 min y se lavaron 3 veces con 5 mL de agua destilada. Las células se suspendieron en agua destilada estéril para alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.18. Para llevar a cabo la medición, se emplearon 25 mL de la suspensión

de células ( $DO_{600} = 0.18$ ) y se midió el pH por 2 min hasta que la solución alcanzó el equilibrio usando el titulador Titrand (Mod 902, Metrohm, Herisau, Suiza). Transcurridos los 2 min, se añadieron 1.4 mL de glucosa 1 M y se midió el pH por 3 min. La pendiente del gráfico resultante del pH (miliunidades) vs tiempo (s) se empleó para calcular la tasa de acidificación extracelular, reportándola como la disminución del pH en mili unidades por min por mg de células.

#### 5.2.4 Fermentación

Se seleccionaron los tratamientos donde se observó crecimiento para evaluar las fermentaciones. Los tratamientos se incubaron con agitación a 250 rpm y 30 °C por 48 h a volúmenes de 50 mL de YPD con glucosa 0.5 M. Después de 48 h, para la medición de biomasa se realizaron tres lavados con agua destilada a 3,000  $\times g$  y se resuspendieron en 1 mL de agua destilada para medir la biomasa por diferencia de peso mediante secado a 100 °C por 24 h. La glucosa consumida durante la fermentación se midió por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS); el reactivo DNS se elaboró con ácido 3, 5-dinitrosalicílico (10 g L<sup>-1</sup>), tartrato sódico potásico (30 g L<sup>-1</sup>) e hidróxido de sodio (16 g L<sup>-1</sup>) y se almacenó en frasco ámbar, en oscuridad y en refrigeración (Wood y col., 2012). El etanol producido se midió a través de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) empleando un espectrómetro Agilent (Mod. 630, Cary, NC, EUA) con números de onda de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> y una resolución de 4.0 cm<sup>-1</sup>. Se elaboró una curva de calibración empleando etanol absoluto a concentraciones de 0 a 10 % (v/v) y la ecuación



obtenida por regresión lineal se empleó para el cálculo de las muestras previamente medidas a las mismas condiciones.

#### 5.2.5 Análisis Estadístico

Todos los resultados se representaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE).

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa GraphPad Prism (Versión 8.0.1). Se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones de medias por el método de Tukey para los tratamientos, con nivel de significancia  $\alpha < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Cinéticas de crecimiento de *S. cerevisiae*

La presencia del furfural, ácido acético y la mezcla de ambos inhibió el crecimiento de *S. cerevisiae* en todos los tratamientos evaluados (ver Anexos). Por lo tanto, se descartó su evaluación en experimentos posteriores.

### 6.2 Cinéticas de crecimiento de *S. stipitis*

En la Figura 1 se muestran las cinéticas de crecimiento de *S. stipitis* en presencia de los inhibidores (furfural y ácido acético), así como en la mezcla de estos.

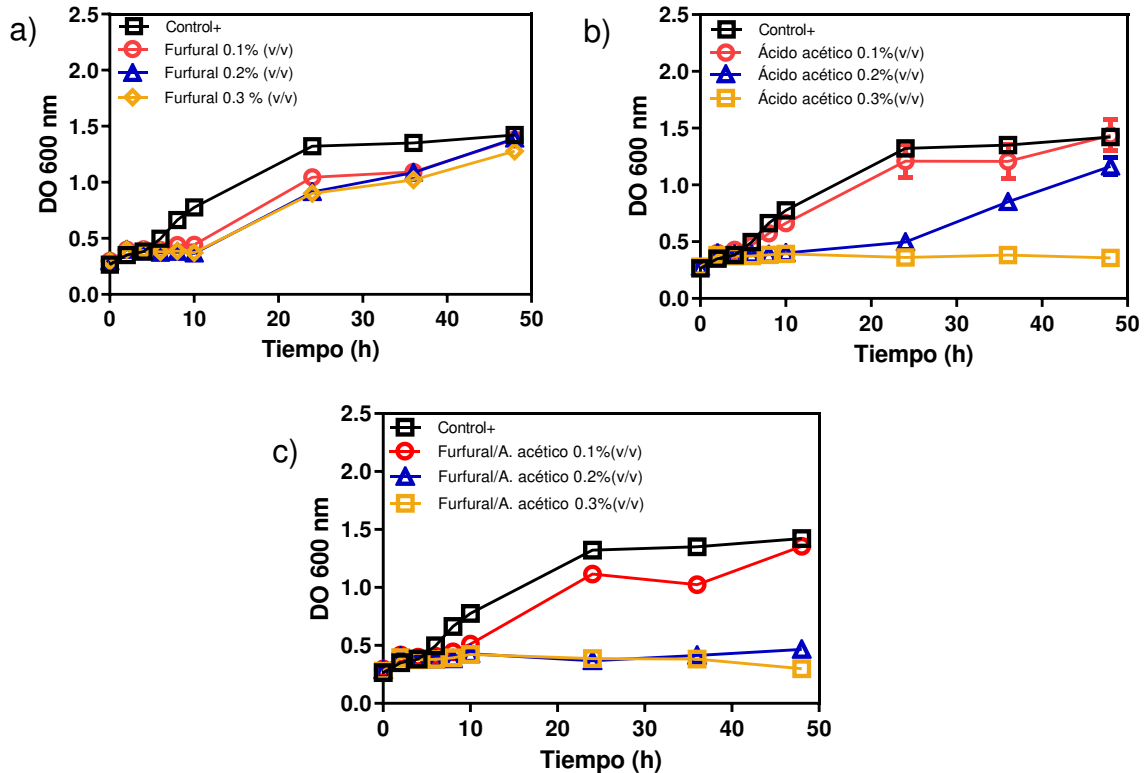


Figura 1. Cinéticas de crecimiento de *S. stipitis* realizadas en medio YPD con 0.5 M de glucosa a 250 rpm por 48 h con a) furfural, b) ácido acético, c) mezcla de furfural y ácido acético al 0.1, 0.2 y 0.3 % (v/v) (de cada uno). Los resultados representan la media  $\pm$  DE; n = 5 réplicas de cinco experimentos independientes.

Las cinéticas muestran que, sin la presencia de inhibidores (Figura 1), la cepa tiene una fase de latencia de 4 h. Por otro lado, las tres concentraciones del furfural provocaron que la fase de latencia aumentara a 10 h (Figura 1a). En cuanto el ácido acético (Figura 1b), la concentración 0.1 % (v/v) no generó un efecto significativo en la fase de latencia, mientras que la concentración 0.2 % (v/v) produjo un marcado incremento, alargando la fase de latencia hasta un período de 24 h. Por último, en la mezcla de inhibidores (Figura 1c), con una concentración 0.1 % (v/v), la fase de latencia aumentó a las 6 h. Por lo tanto, la presencia de furfural o ácido acético en forma individual, así como la mezcla de ambos causaron un incremento notable en la fase de latencia de la cepa *S. stipitis*.

En cuanto al crecimiento de la cepa, las tres concentraciones de furfural (Figura 1a) no mostraron efectos inhibitorios en el crecimiento de la cepa. Al concluir las 48 horas de las cinéticas, se observó que, frente a las concentraciones 0.1 % y 0.2 % (v/v), la densidad óptica fue similar al control, con un valor de  $DO_{600}$  de 1.42 unidades. Mientras que la concentración 0.3 % (v/v) generó una ligero disminución a una  $DO_{600}$  de 1.27 unidades.

Con el ácido acético (Figura 1b), al concluir las 48 horas de la cinética observamos que a 0.1 % (v/v) la cepa alcanzó una densidad óptica similar al control de una  $DO_{600}$  de 1.42 unidades, mientras que a 0.2 % (v/v) la  $DO_{600}$  fue de 1.16 unidades. Por otro lado, la concentración de 0.3 % (v/v) resultó ser una concentración inhibitoria ya que no hubo crecimiento. Para el caso de la mezcla (Figura 1c), se puede constatar que

la cepa solo fue capaz de crecer en la concentración de 0.1 % (v/v), con una  $DO_{600}$  de 1.35 unidades al concluir las 48 h. Por otro lado, dicho tratamiento fue capaz de inhibir el crecimiento de la cepa a concentraciones de 0.2 % y 0.3 % (v/v).

### 6.3 Velocidad específica de crecimiento de *S. stipitis*.

En la Figura 2 se muestran las velocidades específicas de crecimiento de *S. stipitis* en presencia de los inhibidores (furfural y ácido acético), así como en la mezcla de estos.

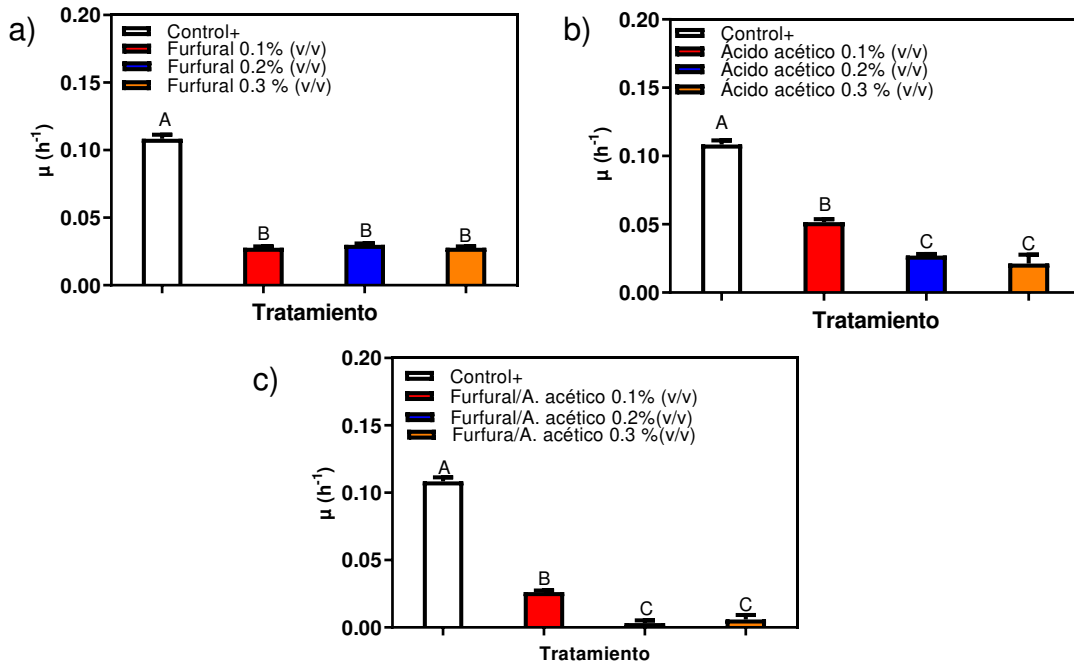


Figura 2. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) empleando medio YPD con 0.5 M de glucosa a 250 rpm por 48 h con a) furfural, b) ácido acético. c) mezcla de furfural y ácido acético. Los valores representan la media  $\pm$  DE;  $n = 5$  réplicas de cinco experimentos independientes. Letras iguales indican que los tratamientos son estadísticamente equivalentes, mientras que letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Las tres concentraciones de furfural (Figura 2a) provocaron una disminución en la velocidad específica de crecimiento de *S. stipitis* a valores cercanos de  $0.02 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ , el

cual comparado con la velocidad específica de crecimiento de  $0.1 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  del grupo control, la disminución fue de aproximadamente el 80 %. Dicha reducción no mostró variaciones estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las tres concentraciones empleadas. Es decir, las tres concentraciones utilizadas tuvieron un efecto inhibitorio similar, dentro del rango evaluado, afectando la velocidad del crecimiento celular de manera semejante. A pesar de la disminución de la velocidad específica de crecimiento en las tres concentraciones de furfural (Figura 2a), es importante resaltar que después de las 48 h, *S. stipitis* fue capaz de tener una  $\text{DO}_{600}$  cercana al control. Esto sugiere que la cepa tiene cierta capacidad de tolerancia al furfural para poder recuperarse y continuar creciendo bajo las condiciones estrés.

Para el ácido acético (Figura 2b) a la concentración de 0.1 % (v/v) redujo la velocidad específica de crecimiento a  $0.05 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ , el cuál es un 50 % menor comparada con el control. Las concentraciones 0.2 % y 0.3 % (v/v) redujeron la velocidad específica de crecimiento a  $0.02 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ , dicho valor es un 80 % menor respecto al control. Es importante resaltar que a pesar de no observar crecimiento en la concentración de 0.3 % (v/v), aún así se registró un valor de  $0.02 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ . En el caso de la mezcla de inhibidores (Figura 2c), la concentración de 0.1 % (v/v) redujo la velocidad específica de crecimiento a  $0.02 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ , el cual es aproximadamente un 80 % menor comparado con el grupo control, mientras que en las últimas dos concentraciones se obtuvieron valores nulos debido a la ausencia de crecimiento. En la mayoría de los tratamientos empleados en los que se observó crecimiento, la reducción de la velocidad específica de crecimiento fue del 80 %, obteniendo valores similares de  $0.02 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ ; el único

tratamiento que es estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) es el ácido acético, ya que su reducción es del 50 % respecto al control con una velocidad específica de crecimiento de  $0.05 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ .

#### 6.4 Determinación de especies reactivas de oxígeno

En la Figura 3 se presentan los resultados obtenidos de la intensidad fluorescente de las especies reactivas de oxígeno en *S. stipitis* en presencia de los inhibidores (furfural y ácido acético), así como en la mezcla de estos.

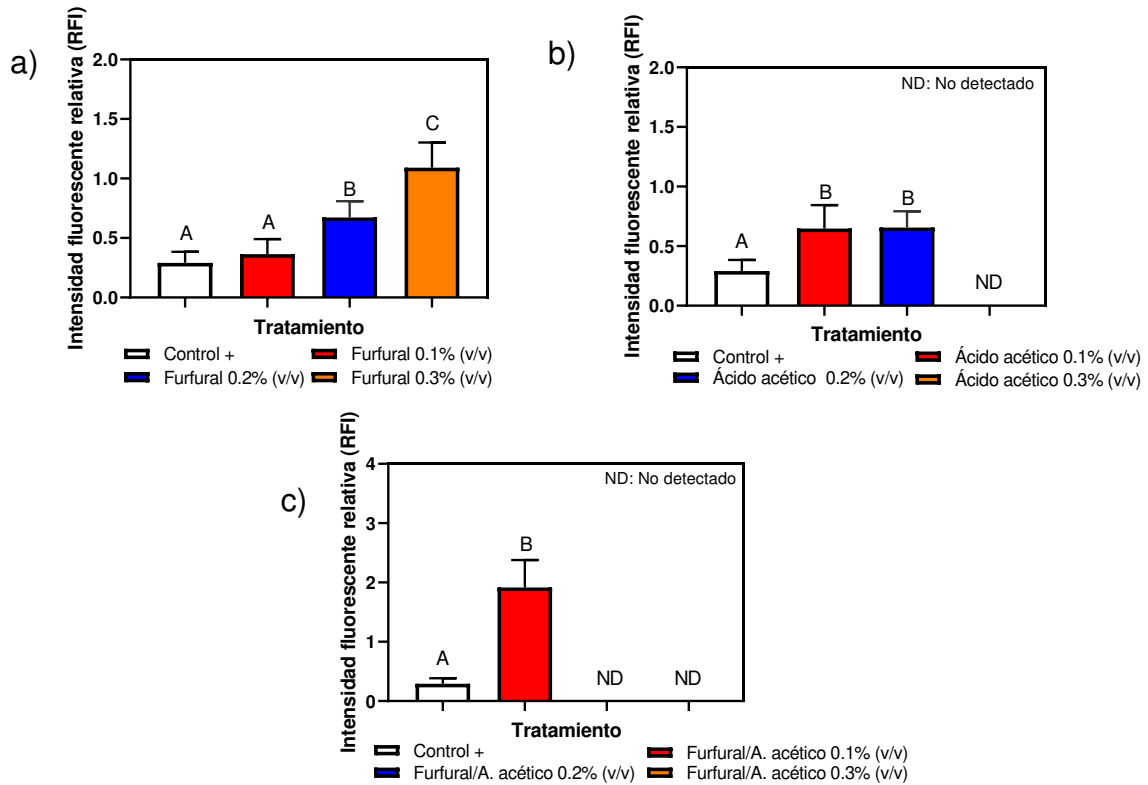


Figura 3. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) empleando medio YPD con 0.5 M de glucosa a 250 rpm hasta la fase media de crecimiento exponencial con a) furfural, b) ácido acético, c) mezcla de furfural y ácido acético. Los valores representan la media  $\pm$  DE;  $n = 5$  réplicas de cinco experimentos independientes. Letras iguales indican que los tratamientos son estadísticamente equivalentes, mientras que letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En los tratamientos donde se añadió furfural (Figura 3a), se observó que, al aumentar su concentración, también aumentó la acumulación de ROS. A través de la comparación de medias utilizando la prueba de Tukey, la concentración de 0.1 % (v/v) no generó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo control, el cual tiene un valor de 0.29 de intensidad de fluorescente relativa (FR). Sin embargo, la concentración de 0.2 % y 0.3 % (v/v) provocaron un aumento significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) al control. La concentración 0.2 % (v/v) obtuvo un valor de 0.69 FR, por lo que la acumulación de ROS aumentó un 138 % respecto al control, mientras la concentración de 0.3 % (v/v) generó que la acumulación de ROS fuese de 1.09 FR, el cual es un aumento del 276 % del valor del control.

El ácido acético (Figura 3b) fue un inhibidor que también generó un incremento en las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, su efecto mostró un comportamiento distinto al furfural, ya que las concentraciones 0.1 % y 0.2 % (v/v) alcanzaron un valor de 0.65 (FR), el cual es un aumento del 122 % respecto al control. Ambas concentraciones no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) al valor que se obtuvo con el furfural 0.2 % (v/v).

La concentración 0.1 % (v/v) de la mezcla de inhibidores (Figura 3c) generó un valor de 1.91 (FR), por lo que su incremento fue del 559 % respecto al grupo control, por lo que, de todos los tratamientos, fue el que provocó mayor acumulación de dichas especies. Con lo anterior, se demostró que el furfural, el ácido acético y la mezcla causaron un incremento en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

## 6.5 Tasa de Acidificación Extracelular (ECAR)

En la Figura 4 se presentan los resultados obtenidos de la tasa de acidificación extracelular para cuantificar el flujo glucolítico de *S. stipitis* en presencia de los inhibidores (furfural y ácido acético), así como en la mezcla de estos.

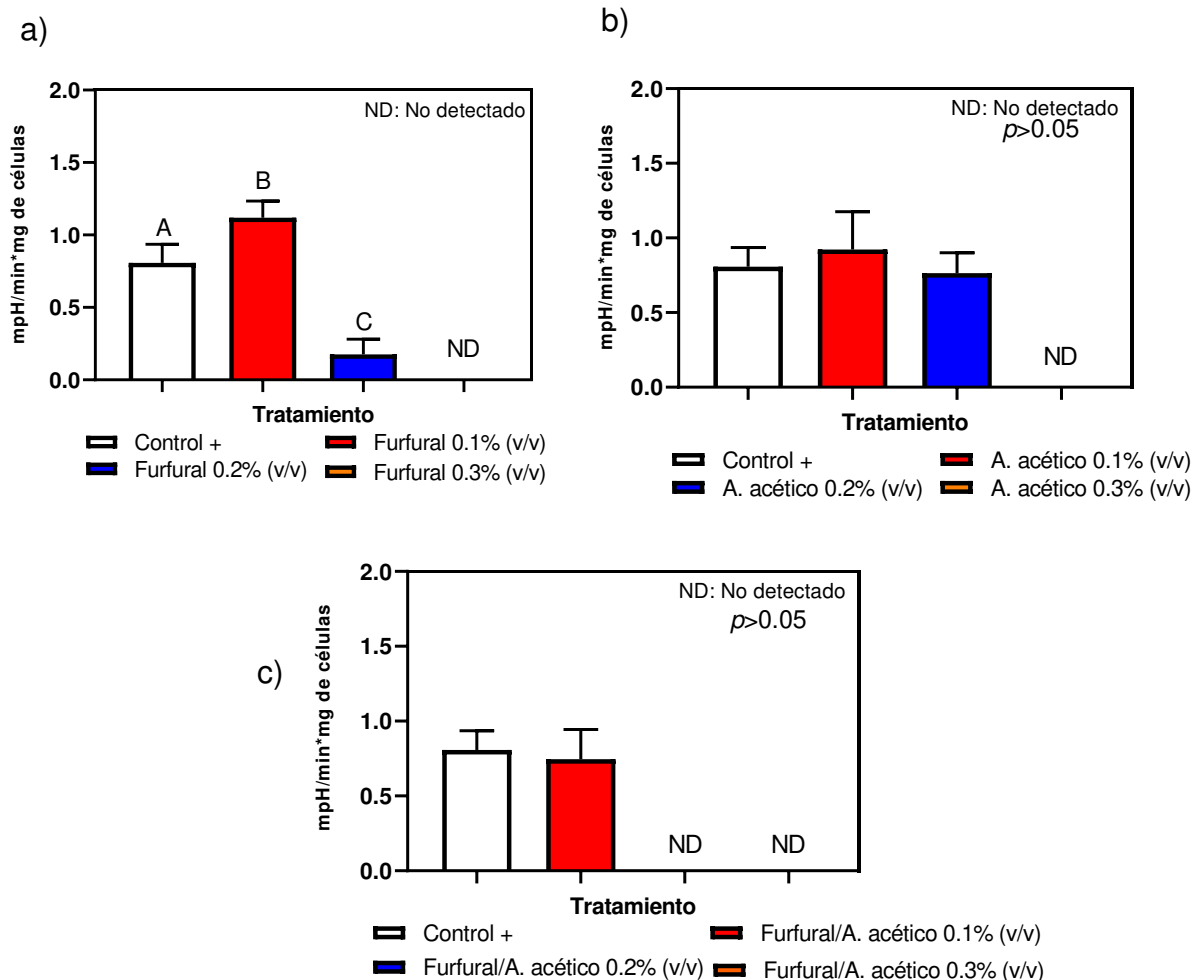


Figura 4. Tasa de acidificación extracelular (ECAR) empleando medio YPD con 0.5 M de glucosa a 250 rpm hasta la fase media de crecimiento exponencial con a) furfural. b) ácido acético. c) mezcla de furfural y ácido acético. Los valores representan la media  $\pm$  DE;  $n = 3$  réplicas de 3 experimentos independientes. Letras iguales indican que los tratamientos son estadísticamente equivalentes, mientras que letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



Para los valores de ECAR, observamos que, para el furfural (Figura 4a), las tres concentraciones generaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al control.

Dentro de ellos la concentración de 0.1 % (v/v) generó un valor de 1.11 mpH/min\*mg de células, el cual es un incremento del 39 %, a comparación del control, cuyo valor es de 0.80 mpH/min\*mg de células.

La concentración de 0.2 % (v/v) obtuvo un valor de 0.17 mpH/min\*mg de células, lo que corresponde a una disminución del 79 % respecto al control, mientras que para el tratamiento de 0.3 % (v/v), la tasa de acidificación extracelular fue positiva, por lo cual se puede presumir que las células no están viables o su viabilidad está altamente reducida.

Por otro lado, el ácido acético (Figura 4b) y la mezcla de ambos inhibidores (Figura 4c) no generaron cambios significativos ( $p < 0.05$ ) respecto al tratamiento control en la lectura de la tasa de acidificación extracelular.

Por lo tanto, el furfural (Figura 4) fue el único inhibidor en provocar un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) del control, lo que significa que afecta la tasa glucolítica.

## 6.6 Potencial de membrana mitocondrial (PMM)

En la Figura 5 se presentan los resultados obtenidos del índice de fluorescencia para cuantificar el potencial de membrana mitocondrial de *S. stipitis* en presencia de los inhibidores (furfural y ácido acético), así como en la mezcla de estos.

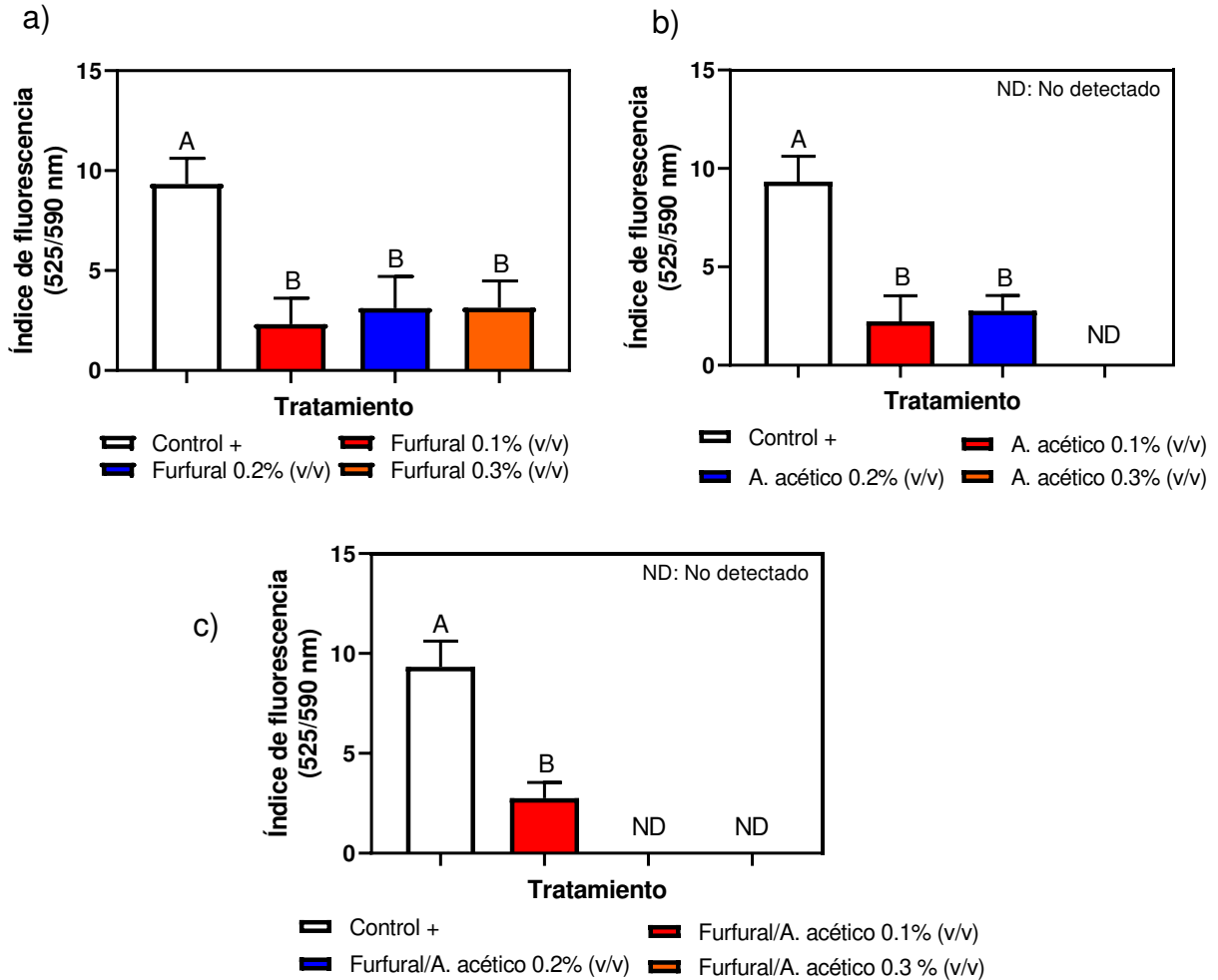


Figura 5. Potencial de membrana mitocondrial (PMM) empleando medio YPD con 0.5 M de glucosa a 250 rpm hasta la fase media de crecimiento exponencial con a) furfural, b) ácido acético, c) mezcla de furfural y ácido acético. Los valores representan la media  $\pm$  DE;  $n = 4$  réplicas de 2 experimentos independientes. Letras iguales indican que los tratamientos son estadísticamente equivalentes, mientras que letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a PMM, observamos que para el furfural (Figura 5a), las tres concentraciones disminuyeron el índice de fluorescencia a valores cercanos de 3.1 en índice de fluorescencia, por lo que la disminución en el potencial de membrana mitocondrial fue de aproximadamente un 70 % comparado con el índice de fluorescencia de 9.3 que corresponde al grupo control (Figura 5a). No se observó una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos evaluados de furfural, por lo cual, las tres concentraciones disminuyeron el índice de fluorescencia de forma similar, lo cual se traduce al potencial de membrana mitocondrial.

Para el caso del ácido acético (Figura 5b), las concentraciones 0.1 % y 0.2 % (v/v) disminuyeron el potencial de membrana mitocondrial a valores cercanos de 2.4 en índice de fluorescencia, por lo que el potencial de membrana mitocondrial disminuyó aproximadamente un 75 % respecto al control. Por lo que no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las dos concentraciones de ácido acético, por lo tanto, la disminución en el índice de fluorescencia es similar.

Por último, la mezcla de inhibidores (Figura 5c) a 0.1 % (v/v) generó una disminución del índice de fluorescencia a 2.7, por consiguiente, la reducción en el potencial de membrana mitocondrial es de aproximadamente un 70 % respecto al grupo control. Es importante destacar que todos los tratamientos empleados donde logró crecer la cepa, el impacto de los inhibidores empleados, no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ), por consiguiente, tuvieron el mismo efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial.

### 6.7 Determinación de biomasa por gravimetría

En la Figura 6 se presentan los resultados obtenidos en gravimetría para obtener la biomasa de *S. stipitis* en presencia de los inhibidores (furfural y ácido acético), así como en la mezcla de estos.

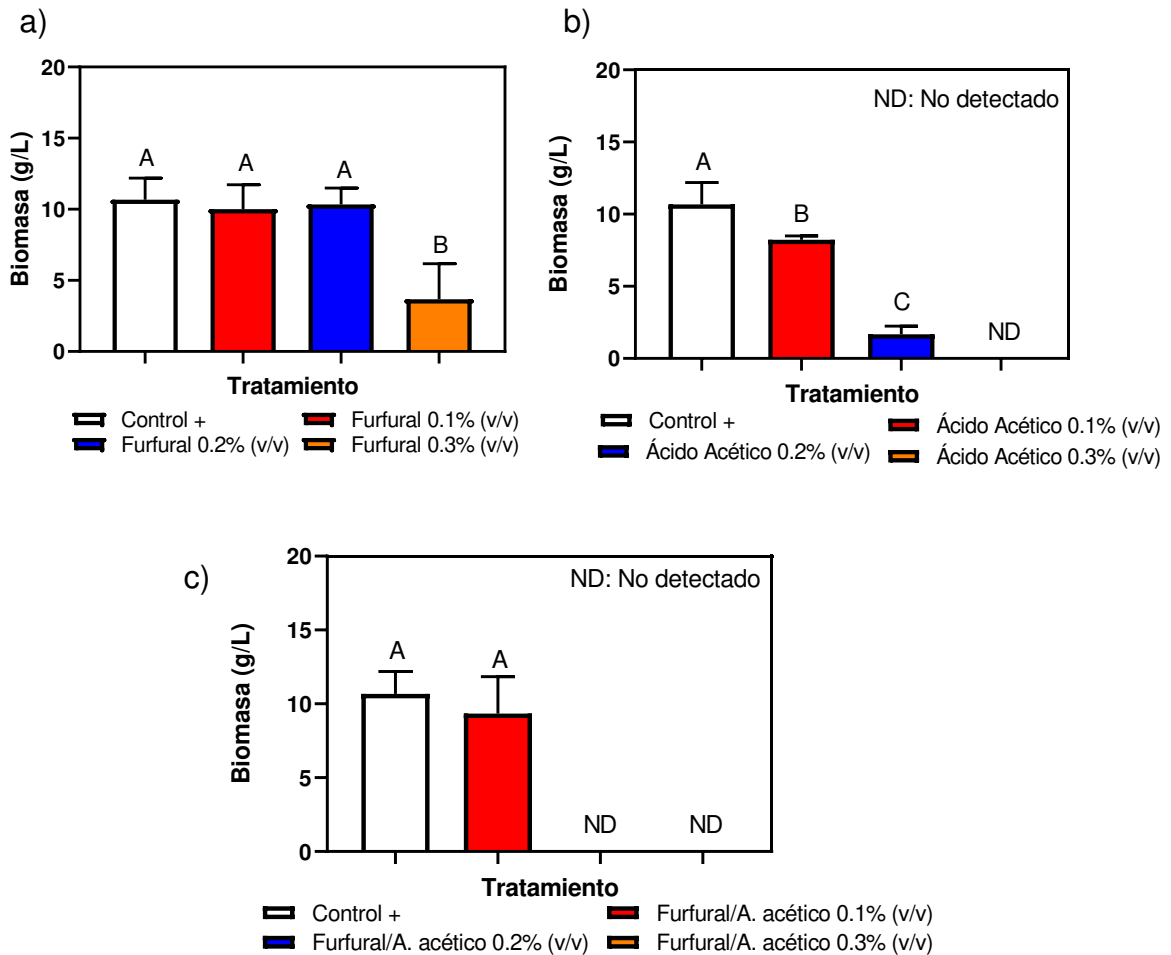


Figura 6. Producción de biomasa en medio YPD con 0.5 M de glucosa a 250 rpm a las 48 h con a) furfural, b) ácido acético, c) mezcla de furfural y ácido acético. Los valores representan la media  $\pm$  DE;  $n = 1$  réplica de 3 experimentos independientes. Letras iguales indican que los tratamientos son estadísticamente equivalentes, mientras que letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En furfural (Figura 6a), las concentraciones 0.1 % y 0.2 % (v/v) no provocaron cambios significativos respecto al grupo control, cuyo valor es de 10.6 g/L, mientras que la concentración de 0.3 % (v/v) ocasionó la disminución a 3.5 g/L, por lo que redujo un 65 % la generación de biomasa comparado con el grupo control.

El ácido acético (Figura 6b) mostró un comportamiento distinto al furfural, ya que a medida que aumentaba la concentración del inhibidor, la generación de biomasa disminuyó.

La concentración de 0.1 % (v/v) generó un valor de 8.2 g/L, lo que es una disminución del 20 % de biomasa comparada con el control, mientras que a 0.2 % (v/v) se obtuvo un valor de 1.6 g/L, por lo que la reducción fue del 85 % al valor del control. Por otro lado, en 0.3 % (v/v) no hubo lectura debido a la ausencia de crecimiento de la cepa.

En el caso de la mezcla de inhibidores (Figura 6c), a 0.1% (v/v) no hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al control, mientras que en las concentraciones de 0.2 % y 0.3 % (v/v) no hubo generación de biomasa debido a la inhibición del crecimiento de la levadura, por lo tanto, de todos los tratamientos, la mezcla de inhibidores fue el que tuvo mayor efecto en la generación de biomasa.

## 6.8 Consumo de glucosa

En la Figura 7 se presentan los resultados obtenidos en el método del DNS para obtener el consumo de glucosa de *S. stipitis* en presencia de los inhibidores (furfural y ácido acético), así como en la mezcla de estos.

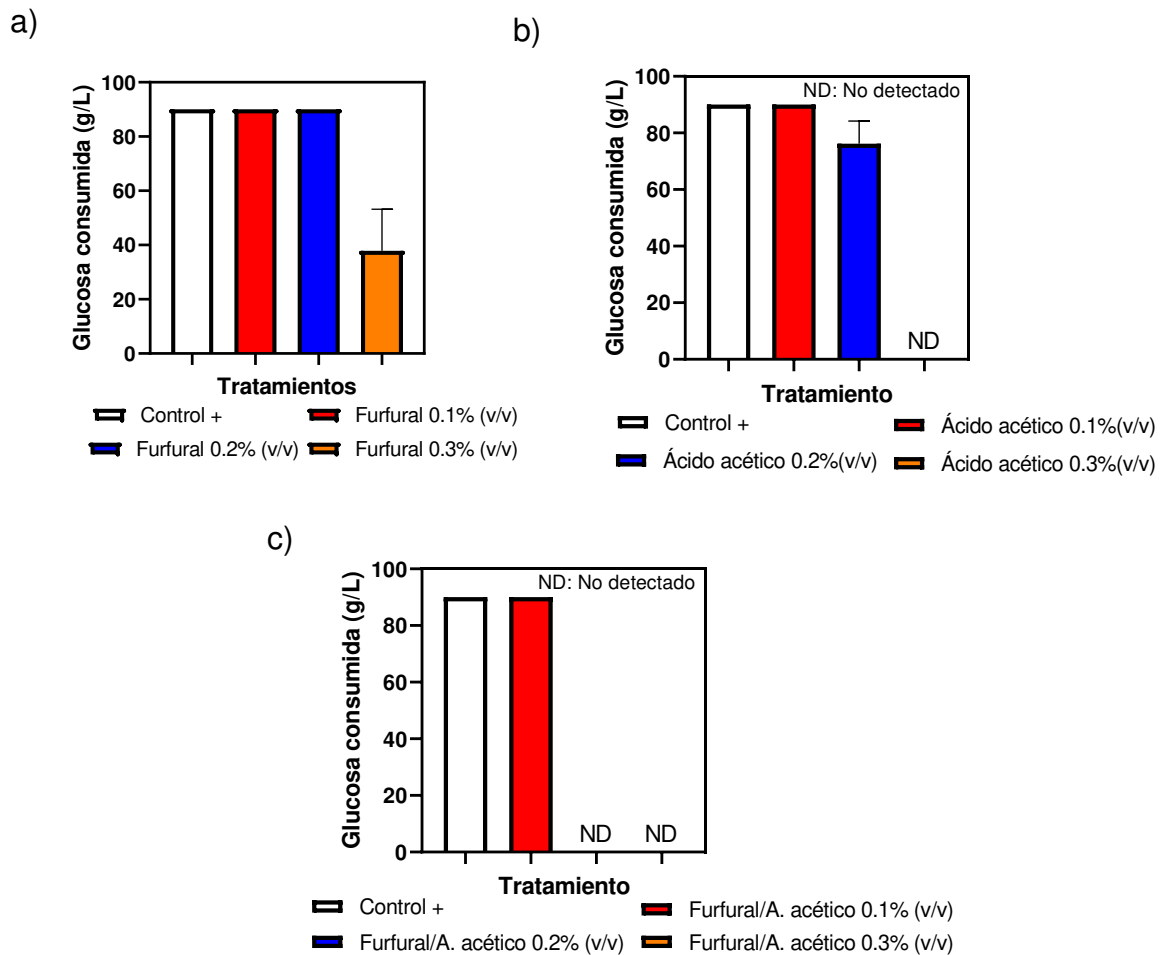


Figura 7. Consumo de glucosa por método de DNS con medio YPD con 0.5 M de glucosa a 250 rpm a las 48 h con a) furfural, b) ácido acético, c) mezcla de furfural y ácido acético. Los valores representan la media  $\pm$  DE; n = 1 réplica de 3 experimentos independientes. Letras iguales indican que los tratamientos son estadísticamente equivalentes, mientras que letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

De las tres concentraciones de furfural (Figura 7a), las concentraciones de 0.1 % y 0.2 % (v/v) no generaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en cuanto control, cuyo consumo de glucosa fue de 90 g/L, mientras que la concentración 0.3 % (v/v) provocó un consumo de 37.8 g/L, lo que es una disminución 58 % respecto al control.

En el caso del ácido acético (Figura 7b), la concentración de 0.1% (v/v) no generó diferencia significativa respecto al control. Por otro lado, la concentración de 0.2 % (v/v) generó un consumo de glucosa de 76.17 g/L, lo que es una disminución del 15 % respecto al control.

La mezcla de inhibidores a 0.1 % (v/v) no provocó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el consumo de glucosa.

Mientras que en las demás concentraciones donde no hubo crecimiento no hubo consumo de glucosa, por lo tanto, la mezcla de inhibidores fue el tratamiento que más afectó en el consumo de glucosa.

## 6.9 Producción de bioetanol

En la Figura 8 se presentan los resultados obtenidos en la producción de etanol de *S. stipitis* en presencia de los inhibidores (furfural y ácido acético), así como en la mezcla de estos.

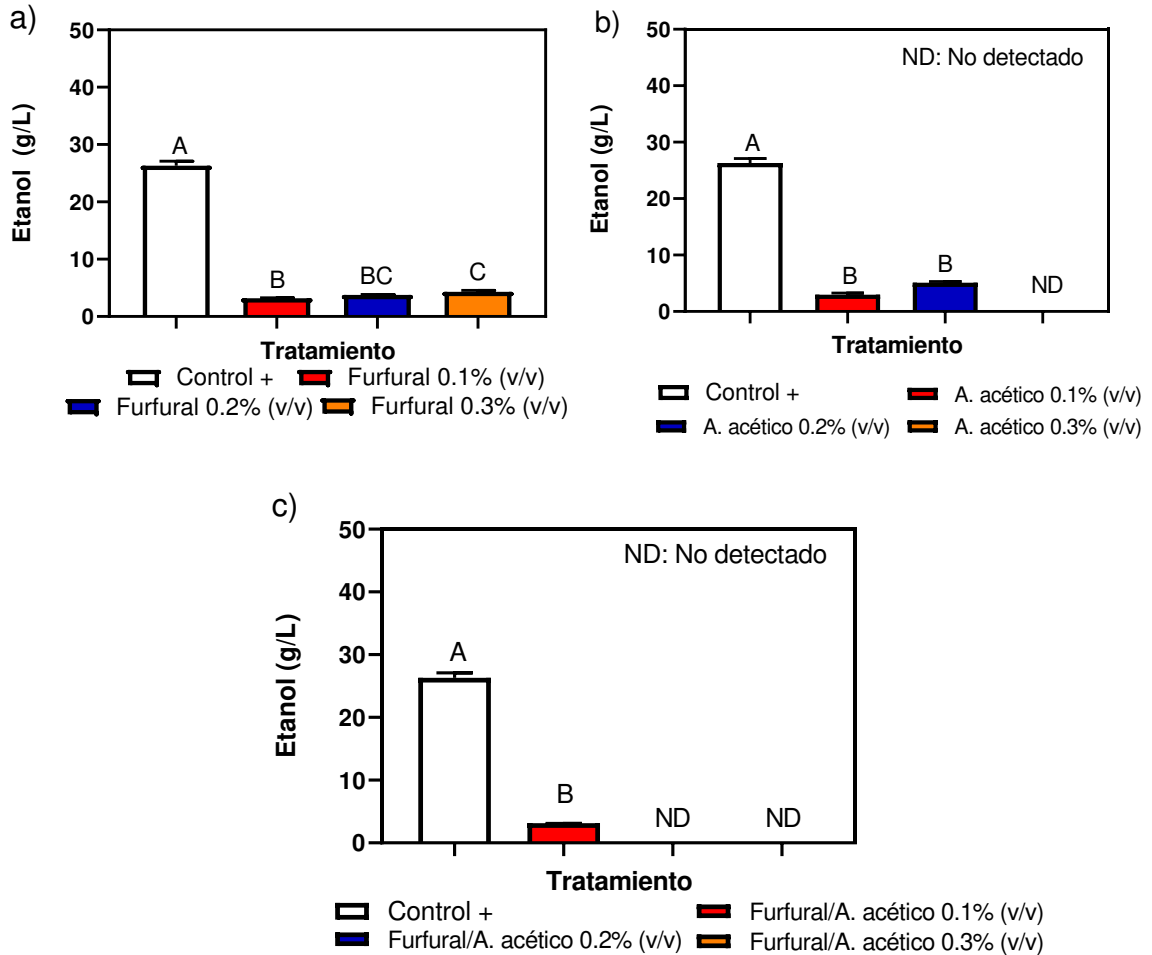


Figura 8. Producción de bioetanol empleando medio YPD con 0.5 M de glucosa a 250 rpm a las 48 h con a) furfural, b) ácido acético, c) mezcla de furfural y ácido acético. Los valores representan la media  $\pm$  DE;  $n = 1$  réplica de 3 experimentos independientes. Letras iguales indican que los tratamientos son estadísticamente equivalentes, mientras que letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



En general, la mayoría de los tratamientos (Figura 8) presentaron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la producción de etanol respecto al grupo control. La producción de etanol del grupo control fue de 26.3 g/L, el furfural en las tres concentraciones (Figura 8a) generaron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la producción de bioetanol.

La concentración de 0.1 % (v/v) indujo la producción de etanol a 3.1 g/L, el cual fue una reducción del 90 % respecto al control, mientras que la concentración de 0.2 % y 0.3 % (v/v) suscitaron la producción de etanol a 3.7 y 4.3 g/L respectivamente, la cual fue una disminución del 86 % y 84 %.

Para el caso del ácido acético (Figura 8b), la concentración de 0.1% (v/v) indujo la producción de 2.9 g/L, lo cual fue una disminución del 89% respecto al control, y la concentración de 0.2 % (v/v) produjo 5 g/L, por lo que disminuyó el 81 % comparado con el tratamiento sin la presencia de inhibidores. Entre ambas concentraciones, no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Por último, la mezcla de inhibidores (Figura 8c) a 0.1 % (v/v) provocó que la producción de etanol sea de 3.1 g/L, lo que disminuyó un 88 % comparado con el grupo control.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Cinéticas de crecimiento de *S. cerevisiae*

En el contexto de las cinéticas de crecimiento con *S. cerevisiae*, resultó interesante constatar que la cepa utilizada no logró crecer en ninguno de los tratamientos empleados. En estudios con *S. cerevisiae* se ha observado que la capacidad para poder crecer ante el furfural depende totalmente del tipo de cepa que se esté utilizando, generalmente las cepas industriales suelen tener más resistencia que las cepas comerciales o las de laboratorio (De-Almeida y col., 2007).

En un medio químico definido con distintas concentraciones de furfural e hidroximetilfurfural (HMF), Flores-Cosío y col. (2018), realizaron pruebas con *Kluyveromyces marxianus* y *S. cerevisiae*, para el caso del furfural observaron que 3 g L<sup>-1</sup>, causaron un incremento en la fase de latencia y que el crecimiento de la cepa se redujo un 35 % respecto al control sin inhibidor. Comparando las concentraciones que se utilizaron en el presente trabajo, la concentración mínima empleada de furfural fue de 0.1 % (v/v), la cual equivale a 1.16 g L<sup>-1</sup>, siendo una concentración menor a la de estos autores, demostrando que la cepa no tuvo la capacidad para sobrevivir al furfural.

En un trabajo donde se experimentó con varias cepas de *S. cerevisiae* se encontró que la concentración de 5.76 g L<sup>-1</sup> de furfural generó inhibición completa de la levadura (Hawkins y Doran-Peterson, 2011). Lo anterior confirma que la cepa utilizada no posee tolerancia hacia al furfural.

Adicionalmente, se ha reportado que *S. cerevisiae* al crecer frente a la presencia de furfural, si se reduce la concentración del inhibidor en el medio, dicha cepa es capaz de crecer y producir bioetanol (Divate y col., 2022). Por lo cual, determinar las concentraciones a las que una cepa puede crecer frente al furfural permitiría crear estrategias de destoxificación para reducir la presencia de inhibidores en el medio y posteriormente alcanzar mayor producción de etanol.

Se ha reportado que para *S. cerevisiae* los ácidos débiles son sus principales inhibidores, donde el ácido acético a  $6 \text{ g L}^{-1}$  resulta ser una concentración crítica para inhibir a la cepa (Huang y col., 2011).

Se ha descrito que el ácido acético cuando genera inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae*, es por alteración en las funciones metabólicas debido a la acidificación intracelular, además de que el estrés oxidativo que generan las especies reactivas de oxígeno contribuye a la inhibición de la cepa (Zhang y col., 2019).

En medios con una cantidad mínima de glucosa y con la presencia de ácido acético  $42 \text{ mM}$ , se ha demostrado que *S. cerevisiae* genera un desvío de energía para mantener la homeostasis del pH intracelular, ya que es evidente el aumento de la ATPasa de la membrana plasmática para bombear afuera los protones y así mantener el pH (Narendranath y col., 2001).

Con lo anterior, las concentraciones empleadas tanto de los inhibidores en forma individual como en mezcla demostraron tener niveles tóxicos muy fuertes a tal grado, de inhibir completamente a la levadura.

Los resultados nos permiten afirmar de manera concluyente que, *S. cerevisiae* no es una cepa con capacidad de crecimiento en presencia de los inhibidores utilizados en el presente estudio. El efecto global de dichos inhibidores fue ejercer una inhibición completa sobre el crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* utilizada. Por lo que estudiar tanto los parámetros fermentativos como bioenergéticos en dicha cepa se descarta por completo, ya que no fue capaz de crecer dentro del rango de concentraciones empleadas.

### 7.2 Cinética de crecimiento de *S. stipitis*

Con las cinéticas de *S. stipitis*, se observó que la aplicación de los inhibidores generó un aumento significativo en la fase de latencia de la cepa. Esto implicó que las células necesitaran más tiempo para iniciar la fase de crecimiento exponencial en comparación con el grupo de control sin inhibidores. La fase de latencia se caracteriza porque es la etapa donde el microorganismo sufre cambios fisiológicos y moleculares. Es un estado activo, donde el microorganismo genera vías de señalización o cambios transcripcionales necesarios para poder proceder al crecimiento exponencial (Hamill y col., 2020).

En la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, el furfural es uno de los principales compuestos producidos, el cual resulta ser un problema en la fermentación de las levaduras, ya que genera daños en las enzimas clave en su metabolismo. Además, también provoca la acumulación de ROS, lo que consecuentemente altera el equilibrio redox intracelular (Liu y col., 2020).

Cuando se trata de estrés, los microorganismos pueden responder de distintas formas, dentro de ellos se incluyen sistemas de transporte, ajuste de expresión génica, regulación redox y de energía, entre otras (Li y col., 2022). El hecho de que *S. stipitis* lograra crecer en las tres concentraciones evaluadas de furfural nos sugiere que dicha cepa posee los suficientes mecanismos para poder superar el estrés generado.

En un estudio de fermentación de xilosa con *S. stipitis*, se llevaron a cabo análisis cinéticos para evaluar el modelo Luong y determinar las concentraciones de furfural y ácido acético que podrían inhibir el crecimiento de la cepa. Según las predicciones, se pronosticó que una concentración de 84.4 mg L<sup>-1</sup> de furfural y 2921.93 mg L<sup>-1</sup> de ácido acético puede tener un efecto inhibitorio sobre la levadura (Banuvalli y col., 2022).

En un experimento donde se evaluó la capacidad de *S. stipitis* y *Candida tropicalis* para fermentar bioetanol en un medio sintético con mezcla de azúcares y en presencia de inhibidores; observaron que dichas cepas pueden crecer frente a la

máxima concentración empleada, la cual fue de 1.0 g L<sup>-1</sup> de furfural (Nandal y col., 2020).

En el presente trabajo, las curvas de crecimiento frente a las tres concentraciones de furfural sugiere que dichas concentraciones no generan daño significativo a la cepa. Con los artículos mencionados previamente, observamos que la cepa de *S. stipitis* utilizada tuvo mayor tolerancia a la concentración más alta empleada de furfural, aún así, dicha concentración generó un daño significativo en la célula, aun así, fue capaz de crecer.

Una de las razones por la que se observa tolerancia de *S. stipitis* frente al furfural es porque se ha descrito que la levadura cuenta con la alcohol deshidrogenasa. Esta enzima tiene la capacidad de reducir el furfural a compuestos menos tóxicos, por lo que le permite resistir el estrés generado por el furfural (Wang y col., 2016).

El ácido acético es un compuesto que es tóxico para los microorganismos; para el caso de la levadura, es un compuesto que altera la integridad de la membrana, afecta la homeostasis del pH, metabolismo y vías de señalización (Guaragnella y Bettiga, 2021). La acidificación intracelular causada por el ácido acético también provoca que se reprima el uso de nutrientes y de energía; al mismo tiempo genera daño oxidativo por las ROS (Zhang y col., 2019).

En la fermentación de 75 g L<sup>-1</sup> de xilosa en un medio definido con *S. stipitis*, se observó que la inhibición con ácido acético es significativamente mayor a medida que la concentración de dicho inhibidor aumenta de 5 a 15 g L<sup>-1</sup>. También se describe que dicha inhibición es mayor cuando la cepa se inoculó con glucosa (Slininger y col., 2015).

En las concentraciones empleadas, *S. stipitis* logró crecer en las concentraciones de 0.1 % y 0.2 % (v/v) de ácido acético. A 0.1 % (v/v) la curva de crecimiento fue similar al control y al concluir las 48 h de la cinética la DO<sub>600</sub> fue cercana a la del control, por lo que dicha concentración se puede considerar que no generó daño a la cepa.

La concentración 0.3 % (v/v) que equivale a 3.147 g L<sup>-1</sup>, generó la ausencia de crecimiento de la cepa. Comparando con los estudios previamente mencionados con el ácido acético, la inhibición de la cepa se generó en una concentración menor que la observada por Slininger y col. (2015), y, por otro lado, el modelo de Luong empleado por Banuvalli y col. (2022), para estimar la concentración en la que el ácido acético inhibe a *S. stipitis* es cercana a la empleada en el presente estudio. Por lo tanto, el ácido acético al 0.3 % (v/v) generó el estrés suficiente para provocar la inhibición completa de la cepa.

Lo anterior indica que, para el ácido acético, la concentración de 0.2 % (v/v) representa el límite para que la cepa pueda crecer sin sufrir una inhibición completa, lo que sugiere que el ácido acético ejerce más daño que el furfural.

Para la mezcla de inhibidores, la concentración de 0.1 % (v/v) no generó inhibición en el crecimiento de la cepa, incluso al concluir las 48 h de la cinética, se obtuvo una  $DO_{600}$  similar al control, esto sugiere que dicha concentración representa el límite en el cual la cepa puede crecer frente al tratamiento sin experimentar una inhibición significativa.

Con *S. stipitis* se ha realizado una fermentación de xiliosa como fuente de carbono con una mezcla de inhibidores de furfural, hidroximetilfurfural y ácido acético. Se encontró que a concentraciones de 2.25, 3.25 y 0.05 g L<sup>-1</sup>, no hubo crecimiento de la cepa (De-Souza-Abud y col., 2017). Las concentraciones empleadas de 0.2 % y 0.3 % (v/v) inhibieron el crecimiento de *S. stipitis*. La concentración de 0.2 % (v/v) de furfural equivale a 2.32 g L<sup>-1</sup> y de ácido acético corresponde a 2.098 g L<sup>-1</sup>, lo anterior demuestra una acción sinérgica de los componentes de la mezcla para evitar el crecimiento del microorganismo.

El término sinérgico significa que ambas sustancias producen un efecto mayor del que pueden producir los componentes de forma individual (Pezzani y col., 2019). En este caso el efecto sinérgico es perjudicial, debido a que la presencia simultánea del furfural y el ácido acético dificultaron el crecimiento de *S. stipitis*.

Los resultados de las cinéticas nos permiten tener una idea de la tolerancia de la cepa ante la presencia de los inhibidores, ya sea en forma individual y en mezcla. Se demostró que tanto el furfural como el ácido acético tienen un efecto en el que la



dosis afecta directamente sobre el crecimiento celular y que al mismo tiempo se establecen concentraciones críticas que definen si puede crecer o afectar negativamente.

### 7.3 Velocidad específica de crecimiento de *S. stipitis*

La velocidad específica de crecimiento se utiliza para medir la capacidad de un microorganismo para crecer bajo condiciones específicas, es un parámetro que indica la rapidez en la que la población de un microorganismo se reproduce y aumenta su biomasa (Zahari y col., 2022).

Como se observó en las cinéticas, en la mayoría de tratamientos, *S. stipitis* fue capaz de crecer, por lo que, con el cálculo de las velocidades específicas de crecimiento observamos que, a pesar de que hubo crecimiento, los inhibidores generaron una disminución en el valor de  $\mu$ . En este caso al obtener valores bajos frente a la presencia de los inhibidores nos indica que, la velocidad a la que la cepa crece en el medio es baja, por lo tanto, los inhibidores afectan en su capacidad para multiplicarse y consecuentemente aumentar el número de células con respecto al tiempo.

En una fermentación con *S. carlsbergensis* con glucosa como fuente de carbono, se demostró una disminución del 53 % en el valor de  $\mu$  respecto al valor obtenido con el control, cuando la cepa se encontraba en un medio con 4 g L<sup>-1</sup> de furfural (Da-Silva y col., 2016). En el presente trabajo las tres concentraciones empleadas generaron una disminución del 80 % respecto al control, por lo que al ser concentraciones

inferiores a las de  $4 \text{ g L}^{-1}$ , se evidencia que el efecto de reducción en la velocidad específica de crecimiento fue más pronunciado a concentraciones más bajas de furfural en la cepa estudiada.

Con *S. cerevisiae* en fermentaciones con distintos inhibidores, López y col. (2021), observaron que cuando se usó ácido acético a  $3 \text{ g L}^{-1}$ , la  $\mu$  obtenida fue de  $0.72 \text{ h}^{-1}$ , la cual no mostró cambio respecto al grupo control sin inhibidores. Comparar el artículo mencionado con los resultados obtenidos es importante, porque en el presente trabajo, la concentración más baja de  $0.1 \text{ \% (v/v)}$  con ácido acético se obtuvo un valor de  $0.05 \text{ h}^{-1}$ , disminuyendo a  $0.02 \text{ h}^{-1}$  conforme la concentración del inhibidor aumentaba. La diferencia de los valores obtenidos en el experimento respecto a los valores de los autores mencionados es mayor, ya que el valor de  $\mu$  en el grupo control de *S. stipitis* fue de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ , siendo un  $86 \text{ \%}$  menor que *S. cerevisiae*, lo que demuestra que el efecto de los inhibidores también depende de la capacidad de supervivencia de la cepa.

El hecho de que en ácido acético al  $0.3 \text{ \% (v/v)}$  se registre un valor de  $0.02 \text{ h}^{-1}$  y que *S. stipitis* no haya logrado crecer, no significa que en las primeras etapas de la cinética estuvieran completamente inactivas. Es posible que estuvieran experimentando cambios en su fisiología, pero al no lograr adaptarse, el inhibidor afectó directamente su capacidad para crecer en dicho medio.

En estudios con *S. stipitis* empleando xilitol como fuente de carbono, el valor de  $\mu$  añadiendo furfural, mostró mayor inhibición que usando ácido acético (Banuvalli y col., 2022). Es un resultado importante a considerar, ya que, en el presente estudio, donde la cepa esta frente a una alta concentración de glucosa como sustrato, la velocidad específica de crecimiento fue en su mayoría similar entre el furfural y el ácido acético.

En *S. cerevisiae* se ha estudiado el efecto de la mezcla de los inhibidores sobre los parámetros de crecimiento para identificar cepas que tengan mayor capacidad de tolerar los inhibidores; con lo anterior Unrean y col. (2018), encontraron que la mezcla de ácido acético a  $10 \text{ g L}^{-1}$  con furfural a  $2 \text{ g L}^{-1}$  el valor de  $\mu$  disminuyó a  $0.07 \text{ h}^{-1}$ , un 63 % menor al control sin inhibidores. En el presente trabajo, la cepa solo fue capaz de crecer en la concentración de 0.1 % (v/v), con un valor  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , siendo una reducción del 80 % respecto al control y comparando con el artículo previamente mencionado, la velocidad específica de crecimiento de *S. stipitis* disminuyó en mayor medida a una menor concentración de mezcla de inhibidores.

Es importante aclarar que las cinéticas de crecimiento nos dan una idea de cómo se comporta un microorganismo frente a las condiciones en las que se pone a crecer, considerando que, aun así, entender el crecimiento de un microorganismo es un proceso dinámico y complejo (Panikov, 2019).

#### 7.4 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas reactivas y altamente oxidantes, conocidas por sus siglas en inglés (ROS), son subproducto del metabolismo de las células, y más cuando se da en condiciones aeróbicas; dentro de estas especies se incluyen el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ion superóxido ( $O_2^-$ ) y el radical hidroxilo (OH) (Juan y col., 2021). Las especies de ROS pueden jugar dos papeles, ya que puede ser constructivos o destructivos. Dichas especies tienen un fuerte impacto sobre la señalización de la célula a través de su regulación de proteínas sensibles a redox, por lo que tienen un impacto crucial en el crecimiento, diferenciación y supervivencia de la cepa (Tauffenberger y Magistretti, 2021).

Una de las formas en la que las especies ROS pueden influir negativamente en el crecimiento de las cepas es por el estrés oxidativo. Dicho estrés es provocado por una alta producción de ROS, lo que conlleva que la célula tenga menos capacidad para poder reducir o eliminar dichas especies por medio de las enzimas antioxidantes (Vona y col., 2021). Cuando la célula se encuentra bajo un estrés oxidativo se producen cambios irreversibles en las macromoléculas de la célula, de las que se incluyen los lípidos, los carbohidratos y las proteínas; además de que altera los mecanismos de señalización celular (Sharifi-Rad y col., 2020).

Las ROS se pueden producir en distintas partes de la célula, pero dentro de todas estas, en la mitocondria, específicamente en la cadena de transporte de electrones es donde más especies ROS se producen. Se estima que dicho componente genera

aproximadamente un 90 % de las especies ROS (Tirichen y col., 2021). La cadena de transporte de electrones se da en la membrana interna de las mitocondrias, donde se encuentran situados varios complejos proteicos. Su función es transferir los electrones de las moléculas NADH y FADH<sub>2</sub> los cuáles son donadores de electrones hasta el oxígeno, el cual es el aceptor final (Ahmad y col., 2022).

Conforme los electrones pasan del complejo I o complejo II al complejo III a través de la ubiquinona, algunos de los electrones se pueden escapar y posteriormente reaccionar con el oxígeno para formar el superóxido (Shields y col., 2021). El radical superóxido es altamente reactivo, lo que puede reaccionar con otro radical para producir el peróxido de hidrógeno el cual tiene la opción de reducirse a agua o al radical hidroxilo (Martemucci y col., 2022).

En un estudio donde se midió el efecto de las especies reactivas de oxígeno en *S. cerevisiae* por la presencia del furfural 25 mM y 50 mM, se efectuaron observaciones mediante el indicador de fluorescencia (Allen y col., 2010). Se reportó que el porcentaje de células que acumularon ROS aumentó un 31 % y 36 % respectivamente. Lo anterior muestra que el aumento en la concentración del inhibidor no conlleva a un aumento significativo en el porcentaje de células positivas con especies ROS. Sin embargo, se reportó que a 25 mM de furfural hubo daños en el citoesqueleto, las membranas de las vacuolas y mitocondria, mientras que a 50 mM se generó la inhibición de la cepa.

Comparando con el artículo anterior, la concentración de 0.1 % (v/v) es menor que 25mM y en este caso no generó una diferencia estadística respecto al control. Mientras que en la concentración 0.2 %, y 0.3 % (v/v), las cuáles son concentraciones cercanas a 25 mM y 50 Mm, entre ambas concentraciones se obtuvo un incremento en especies ROS con diferencia estadística ( $p < 0.05$ ), aunque en este caso se midió la intensidad de fluorescencia relativa (RFI) y no el porcentaje de células con indicador positivo de especies ROS.

El furfural en el presente trabajo generó un efecto más pronunciado en términos de estrés oxidativo, lo que puede tener implicaciones importantes en la fisiología celular y en el desarrollo del crecimiento microbiano. Se ha reportado que la acumulación de las especies reactivas de oxígeno es una respuesta de estrés universal que es inducida por el furfural, por lo que medir el contenido de dichas especies es un indicador para relacionar el estrés inducido por dicho inhibidor (Li y col., 2019).

Pan y col. (2018), reportaron que en medio YPD, utilizando *S. cerevisiae*, en concentraciones de 1 a 5.5 g L<sup>-1</sup> de ácido acético, observaron que la acumulación de ROS intracelular está asociada con el ácido acético extracelular.

En el presente trabajo, el ácido acético a 0.1 % y 0.2 % (v/v) generó una RFI de 0.65, la cual es un incremento del 124 % respecto al control, estos resultados indican que el efecto oxidativo del ácido acético se mantuvo constante en ambas

concentraciones, caso contrario en lo observado con el estudio previamente mencionado.

Por último, la concentración de 0.3 % (v/v) de ácido acético no hubo lectura de especies reactivas de oxígeno debido a la completa inhibición de la cepa, en este parámetro estudiado se esperaría que la acumulación fuese mayor, por lo que el estrés oxidativo generado pudo ser una posible causa de la ausencia de supervivencia celular.

Es importante señalar que, a la concentración de 0.1 % (v/v), el ácido acético generó una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno a comparación que el furfural. Mientras que en la concentración de 0.2 % (v/v), tanto el furfural como el ácido acético generaron la misma acumulación de especies reactivas de oxígeno. Este hallazgo indica que, a dicha concentración, ambos inhibidores de forma individual tuvieron un efecto similar en términos de estrés oxidativo en la célula.

El hallazgo más destacado en este parámetro es el efecto de la mezcla de inhibidores a la concentración de 0.1 % (v/v). En dicha concentración, se observó un aumento en la RFI a 1.9, lo que es un 559 % mayor que el control en la acumulación de especies reactivas de oxígeno, superando a los demás tratamiento evaluados. Es relevante destacar que, a pesar del aumento en la RFI a 1.09 con el furfural a concentración de 0.3 %; la acumulación de especies reactivas de oxígeno generado fue menor que el observado en la mezcla de inhibidores a una concentración de 0.1

%.

Esto resalta la importancia del efecto sinérgico de la combinación de inhibidores para generar una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno en *S. stipitis*.

*S. stipitis* cuenta con diversas enzimas antioxidantes como mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo, las cuáles eliminan el exceso de especies ROS para reducir el daño, algunas de las enzimas que dicha cepa posee son superóxido dismutasa, peroxidasa y reductasa (Chu y col., 2022).

El hecho de que *S. stipitis* cuente con enzimas antioxidantes, le da una mayor posibilidad de adaptarse a la acumulación de las especies ROS generadas por la presencia de los inhibidores.

#### 7.5 Tasa de acidificación extracelular (ECAR)

La prueba de ECAR nos permite evaluar si los tratamientos de inhibidores empleados en el presente estudio afectan el proceso metabólico de glucólisis de las levaduras, por ser una medida indirecta donde se relaciona la acidificación del medio a nivel del piruvato de la vía glucolítica (Olivares-Marín y col., 2018).

El furfural a 0.1 % (v/v) aumentó el flujo glucolítico en *S. stipitis*, para tolerar el estrés del furfural. Lo anterior puede estar relacionado con una mayor demanda de energía, como se observó anteriormente en las cinéticas, la cepa es capaz de crecer a dicha concentración, pero a través de la tasa de acidificación extracelular se logra observar que el furfural es capaz de alterar su metabolismo.



Para la concentración de 0.2 % (v/v), el estrés generado fue de manera más pronunciada, ya que se observó una disminución en la tasa de acidificación extracelular a 0.17 mpH/min\*mg, esto sugiere que ejerció un efecto más fuerte sobre la glucólisis, posiblemente el crecimiento de la cepa se pudo lograr tomando rutas alternas que le permitieron sobrevivir a la concentración empleada.

Por otro lado, a la concentración de 0.3 % (v/v) no se observó lectura de la tasa de acidificación extracelular; es un resultado intrigante debido a que en las cinéticas se observó crecimiento de la cepa. Con lo anterior, hay dos posibilidades, la primera opción es que dicho tratamiento inhibió significativamente la glucólisis, por lo que el crecimiento de la cepa pudo haber sido complementado por más rutas para lidiar con el estrés. La segunda opción puede estar relacionado con los límites de detección, es posible que la liberación de ácidos es muy baja en comparación al control, lo que pudo haber dificultado su detección a través de la técnica empleada.

Con respecto al furfural, se ha reportado que es un inhibidor cuyos mecanismos tóxicos son complejos, pero aun así se estima que es un compuesto que inhibe la glucólisis (López y col., 2021). Otro de los efectos descritos del furfural es provocar la acumulación de intermediarios de la glucólisis como fructosa 1,6-bisfosfato, por lo que la aglomeración de dicho compuesto se relaciona directamente con la disminución del flujo de la glucólisis (Sannelli y col., 2022).

Los estudios mencionados nos permiten respaldar que, a medida que aumenta la concentración del furfural, el flujo glucolítico disminuye, por lo que la adaptación y supervivencia de la cepa puede estar vinculada con el uso de rutas metabólicas alternas. Con lo anterior, Heer y col. (2009), reportaron que *S. cerevisiae* en medio mínimo con glucosa a  $5 \text{ g L}^{-1}$ , a medida que aumentó la concentración del furfural, la cepa incrementó el flujo de la vía de las pentosa fosfato para poder proporcionar NADPH, principalmente para enzimas oxirreductasas dependientes de dicho cofactor, con lo anterior destacan que es una respuesta particular de las levaduras ante la presencia del furfural.

Respecto al tratamiento con ácido acético, en las dos concentraciones en las que logró crecer (0.1 % y 0.2 %), los resultados obtenidos demostraron que ninguna de estas dos concentraciones generó cambios significativos en comparación con el grupo control en la tasa de acidificación extracelular. La ausencia de cambios sugiere que en esas dos concentraciones es capaz de mantener los niveles normales de glucólisis.

En el estudio realizado por Zhao y col. (2008) se reportó que el ácido acético ejerce un efecto tóxico sobre *S. cerevisiae* al inhibir las enzimas presentes en la cascada de reacciones de la glucólisis. Con los resultados obtenidos, se observó que *S. stipitis*, frente al ácido acético, no sufrió cambios en la tasa de acidificación extracelular, por lo que demuestra que el flujo glucolítico se mantuvo normal, lo que sugiere que no hubo daño enzimático.

Para el tratamiento con la mezcla de inhibidores, a pesar de que la mezcla permitió el crecimiento de la cepa en una única concentración, no se identificaron cambios significativos respecto al grupo de control, lo que indica que no se observó un efecto sinérgico para alterar cambios en la tasa de acidificación extracelular. Hasta este punto, con los parámetros estudiados podemos suponer que el furfural y el ácido acético actúan de forma diferente sobre los parámetros bioenergéticos.

#### 7.6 Potencial de membrana mitocondrial (PMM)

Se midió la PMM para evaluar el efecto del furfural y el ácido acético sobre la función mitocondrial de *S. stipitis*. Como se ha comentado anteriormente, la mitocondria es un organelo importante para las células eucariotas, ya que es donde se da la producción de energía en forma de ATP, además de que participa en la regulación del metabolismo y se encuentra relacionada con la apoptosis (Javadov y col., 2020).

Es importante recordar que al momento que se metaboliza la glucosa, este pasa por la glucólisis para producir piruvato, el cuál ingresará a la mitocondria para pasar al ciclo de Krebs, donde se liberarán electrones y protones, los cuales serán transportados por el NADH y el FADH<sub>2</sub> para entregar dichos electrones a la cadena transportada de electrones (Miller, 2020). El movimiento de los electrones a lo largo de dicha cadena genera energía, la cual es utilizada para transportar protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, esto hace que se genere un gradiente electroquímico de protones en la membrana mitocondrial interna, dicho gradiente es el que se utiliza para la síntesis de ATP (Sánchez y Arboleda, 2008).

El potencial de membrana mitocondrial es una herramienta para evaluar la actividad mitocondrial con la cuantificación del gradiente electroquímico originado por el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa para la generación de ATP. Lo anterior es un resultado de las reacciones redox que se encuentran intrínsecamente vinculadas con el ciclo de Krebs, actuando como un intermediario en la retención de energía que posteriormente es canalizada por la ATP sintasa (Zorova y col., 2018; Yi-Xuan y col., 2019).

Para la prueba de potencial de membrana mitocondrial se utilizó el kit que contiene el JC-10, el cuál es un indicador fluorescente que nos permite evaluar la integridad de la mitocondria. Cuando la mitocondria está sana, tienen un potencial de membrana mitocondrial alto, por lo que el JC-10 se acumula en el interior formando agregados lo cual emite una fluorescencia roja, en caso de que se encuentre dañada el JC-10 permanece en el citoplasma en su forma monomérica lo cual conduce a una fluorescencia verde. Por lo que al final se calcula la relación entre ambas fluorescencias para obtener la medida cuantitativa del potencial de membrana mitocondrial y determinar el grado de daño ocasionado por los tratamientos empleados en el presente estudio.

Una disminución en el potencial de membrana mitocondrial hace que se agote el ATP, ya que dicho potencial es necesario para un óptimo funcionamiento de la cadena de transporte de electrones y una síntesis eficiente de ATP; por lo que al

haber menos energía disponible afecta directamente en las actividades celulares, por lo que su funcionamiento no va a ser normal (Kalvelyté y col., 2017).

En el presente estudio, el efecto del furfural en las tres concentraciones empleadas (0.1 %, 0.2 % y 0.3 %) sobre el potencial de membrana mitocondrial de la cepa, mostraron que el furfural indujo una disminución de aproximadamente un 70 % en todas las concentraciones evaluadas, en comparación con el grupo de control sin inhibidores.

Se ha demostrado que en cepas como *S. cerevisiae*, el furfural daña las membranas tanto de las vacuolas como las mitocondrias (Allen y col., 2010). Para la proliferación de la levadura, el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial es esencial, la pérdida de dicho parámetro desencadena vías para eliminar las mitocondrias dañadas o incluso provocar la muerte celular (Vasan y col., 2022).

A pesar de la clara reducción en el potencial de membrana mitocondrial en todas las concentraciones de furfural, es importante destacar que no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las tres concentraciones. Esto sugiere que el furfural, dentro del rango de concentración empleado, ejerció un efecto inhibitorio similar en el PMM, independientemente de la concentración utilizada.

Por otro lado, el ácido acético, en las dos concentraciones en las que logró crecimiento (0.1 % y 0.2 %), también disminuyó el potencial de membrana

mitocondrial aproximadamente un 70 % en comparación con el control. Es interesante destacar que, al igual que en el caso del furfural, no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las dos concentraciones de ácido acético respecto a su efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial. Ambas concentraciones mostraron una disminución similar, lo que sugiere que el ácido acético ejerce un daño en la mitocondria constante en función de la concentración del inhibidor dentro del rango estudiado.

Para el caso del ácido acético, se ha demostrado que dicho inhibidor provoca la permeabilización de la mitocondria, lo que puede provocar la posible liberación de factores letales como el citocromo C (Pereira y col., 2010). Cuando disminuye el potencial de membrana mitocondrial, la cadena de electrones se ve afectada, y cuando esto sucede, se ha demostrado que se puede dar la liberación de proteínas preapoptóticas, como el citocromo C, el cual se une al factor de activación apoptótica 1 para formar el complejo apoptosoma y posteriormente activar la caspasa-9 para llevar una cascada que conduce a la apoptosis (Kalpage y col., 2020). Posteriormente a su liberación, el citocromo C es degradado, por lo que la mitocondria no volverá a funcionar adecuadamente (Guaragnella y Bettiga, 2021).

En el caso de la mezcla de inhibidores, se evaluó la concentración de 0.1 % y se observó que generó una disminución del potencial de membrana mitocondrial de aproximadamente un 70 % respecto al grupo de control sin inhibidores. Es importante destacar que dicho tratamiento fue el que generó mayor acumulación de especies

ROS, pero aun así se obtuvieron valores similares a los tratamientos que se emplearon de forma individual en el PMM.

Por lo tanto, con los tratamientos empleados se observó que, independientemente de la concentración de los inhibidores y de la forma en la que se encuentren (individual o en mezcla), mientras la cepa sea capaz de crecer, se observó una consistencia en el efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial.

El estrés generado por los inhibidores induce la rápida despolarización del potencial de la membrana mitocondrial interna, lo que consecuentemente ocasionará el malfuncionamiento de la fosforilación oxidativa (Park y col., 2011). Por lo tanto, al observar que todos los tratamientos generaron una disminución en el potencial de membrana mitocondrial se puede sugerir que los inhibidores empleados hacen que la célula cuente con menos ATP.

## 7.7 Fermentación

En la fermentación de glucosa con *S. cerevisiae* frente al furfural en concentraciones de 0.1, 0.5, 2, 4, 6, 8 y 10 g L<sup>-1</sup> desarrollada por Erkan (2020), observó que, la concentración de 0.5 g L<sup>-1</sup> duplicó la cantidad de biomasa comparada con el control, sin embargo, a medida que la concentración aumentaba, la producción de biomasa disminuyó a partir de los 6 g L<sup>-1</sup>, produciendo 0.19 g L<sup>-1</sup> de biomasa. En el artículo previamente mencionado, la disminución de biomasa se generó a partir de 6 g L<sup>-1</sup>, mientras que, en el presente estudio, la disminución de biomasa se generó

únicamente en la concentración de 0.3 % (v/v) de furfural, que equivale a 3.14 g L<sup>-1</sup>, obteniendo valores de 3.6 g L<sup>-1</sup> de biomasa, una disminución del 65 % en comparación con el control.

Las concentraciones de furfural 0.1 y 0.2 % (v/v) no son estadísticamente diferentes entre ellos y el control. La razón por la que no hubo cambios significativos en este parámetro se puede relacionar a los aspectos discutidos en las cinéticas. Donde la posible tolerancia de la cepa a dichas concentraciones puede estar relacionadas con las enzimas antioxidantes que ayudan a neutralizar al furfural.

Por lo tanto, la forma de adaptación de las levaduras frente al furfural es redirigir su metabolismo para que le permita reducir los niveles tóxicos del furfural, oxidándolo o reduciéndolo a alcoholes o ácidos como el alcohol furfurílico, 2,5-bis-hidroximetilfurano, ácido furoico y ácido 2,5-furanodicarboxílico (Mota y col., 2022). La concentración de 0.3 % (v/v) tuvo mayor impacto para reducir la generación de biomasa, por lo que mecanismos oxidantes o reductores de *S. stipitis* sobre el furfural para disminuir su toxicidad posiblemente no fue eficiente, lo que implicó que su crecimiento y replicación fuese menor.

Otro motivo por el que la concentración más alta pudo afectar negativamente en la generación de biomasa, es la interacción tóxica del furfural hacia el ADN, ya que se ha demostrado daños frente a su exposición, reaccionando directamente con la adenina para formar kinetina, la cual promueve el desajuste de las bases



nitrogenadas (Willson, 2022). Con lo anterior, el furfural puede afectar la capacidad de la levadura para sintetizar nuevas proteínas y a la vez replicar su ADN, lo que implica una menor generación de biomasa.

Respecto al ácido acético, dicho inhibidor se ha demostrado que afecta el pH intracelular en *S. cerevisiae*, donde el efecto depende más de la forma no disociada del ácido, no del contenido del ácido acético total en el medio, ya que, el cambio en el pH intracelular conduce a la inhibición de las enzimas responsables del metabolismo de los carbohidratos (Pielech-Przybylska y col., 2019). Con lo anterior, el ácido acético pudo generar cambio en el pH interno de célula, interfiriendo en la homeostasis de la levadura, lo que afecta directamente en la generación de biomasa, por lo que desde concentraciones bajas de ácido acético afectó negativamente el crecimiento de *S. stiptis*.

Frente al estrés causado por el ácido acético, la levadura pudo haber implementado una reducción de las actividades relacionadas con procesos de alto gasto energético como la proliferación celular, síntesis de proteínas, las vías anabólicas; por lo que se enfoca en actividades relacionadas con la protección y reparación del daño que sufren el ADN, proteínas y lípidos (Sousa y col., 2012).

Bellido y col. (2011), reportaron que, *S. stiptis* en la fermentación de glucosa y xilosa en condiciones anaerobias con ácido acético y furfural de forma individual; a medida que aumentaba la concentración del ácido acético, el consumo de glucosa disminuía,

demostrando que en el control se logra consumir toda la glucosa ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ), mientras que el rendimiento del etanol disminuía conforme aumentaba la concentración, llegando a completa inhibición a  $3.5 \text{ g L}^{-1}$ ; por otro lado, el furfural a  $0.1$ ,  $1$  y  $2 \text{ g L}^{-1}$ , toda la glucosa fue consumida, y para la producción de etanol, la disminución en la producción de etanol no fue mayor al  $10 \%$  respecto a los  $22.8 \text{ g L}^{-1}$  producidos en el control, indicando que el efecto inhibitorio se reflejó principalmente en la velocidad de producción de etanol.

Las concentraciones empleadas de  $1$  y  $2 \text{ g L}^{-1}$  por Bellido y col. (2011), mostraron un comportamiento similar con el furfural a concentraciones de  $0.1$  y  $0.2 \%$  (v/v) del trabajo desarrollado, ya que toda la glucosa fue consumida dentro de las 48 horas de la fermentación, la diferencia radica que, en las tres concentraciones empleadas, la reducción en la producción de etanol fue mayor del  $80 \%$ , mientras que, en la producción de etanol reportada por Bellido y col. (2011), la disminución en la producción de etanol fue menor del  $10 \%$ .

Erkan y col. (2020), reportaron que la fermentación de *S. cerevisiae* en un medio con  $100 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa frente a distintas concentraciones de furfural por 48 horas; a  $6 \text{ g L}^{-1}$  de furfural el consumo de glucosa fue mayor que el control, consumiendo  $83.63 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa, mientras que la concentración de  $8 \text{ g L}^{-1}$  de furfural disminuyó drásticamente el consumo de glucosa a  $5.03 \text{ g L}^{-1}$ . En la fermentación desarrollada, el furfural a  $0.3 \%$  (v/v) provocó que el consumo de glucosa fuese de  $37.8 \text{ g L}^{-1}$ , siendo una reducción del  $58 \%$  respecto el control.

Las levaduras, como los demás organismos son capaces de adaptarse a condiciones que les causen estrés, en este caso los inhibidores, por lo que, dependiendo de la condición, las levaduras pueden modificar sus estrategias de crecimiento para sintetizar componentes o reducir el daño celular (Eardley y Timson, 2020). Lo anterior nos ayuda a determinar que la adaptación a las primeras dos concentraciones de furfural, los ajustes metabólicos empleados por *S. stipitis* no alteraron su capacidad para consumir glucosa.

La disminución del 58 % en el consumo de glucosa generada por el furfural a 0.3 % (v/v) nos demuestra que a pesar que en las cinéticas observamos crecimiento, fisiológicamente no es capaz de consumir la misma cantidad de glucosa del grupo control. Ask y col. (2013), demostraron que la adición de furfural disminuyó la absorción tanto para la glucosa y xilosa, debido a que dicho compuesto es capaz de inhibir la hexoquinasa, enzima que cataliza la primera reacción de la vía glucolítica, lo que puede hacer que se desencadene una disminución en el consumo de los carbohidratos.

Narendranath y col. (2001), reportaron que *S. cerevisiae* en un medio mínimo, con una fermentación de 24 horas frente el ácido acético a una concentración de 0.1 % (w/v) generó una disminución en la tasa de consumo de glucosa, aunque dicho valor disminuyó, al final de la fermentación toda la glucosa era consumida. En el presente trabajo con *S. stipitis*, en las 48 horas de fermentación, el ácido acético a 0.2 % (v/v) disminuyó el consumo de glucosa a  $76.17 \text{ g L}^{-1}$ , el cual es una reducción del 15 %

respecto al control, mientras que a 0.1 % (v/v) la cepa fue capaz de consumir toda la glucosa disponible.

Casey y col. (2010), desarrollaron un estudio empleando una levadura genéticamente modificada de *S. cerevisiae* para fermentar xilosa y glucosa en medio YPD, reportando que el ácido acético disminuyó la tasa de consumo de glucosa y al mismo tiempo observaron que aumentando el pH del medio, se redujo el efecto inhibitorio del ácido acético. Con lo anterior, podemos destacar que el cambio de pH generado por el ácido acético es el factor que hace que el consumo de glucosa sea menor para la cepa de *S. stipitis*, ya que el pH intracelular en la célula evita que la glucosa sea metabolizada. Además, se ha reportado que los ácidos débiles como el ácido acético inhibe enzimas clave de la vía de la glucólisis (Pampulha y Loureiro-Dias, 1990).

Las tres concentraciones de furfural generaron una reducción significativa en la producción de etanol en comparación con el control, lo que indica que las concentraciones empleadas tuvieron un efecto inhibitorio en dicho parámetro. El furfural es un inhibidor que provoca estrés oxidativo por la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que consecuentemente daña los componentes celulares, lo que resulta en una menor producción de etanol, dado al mal funcionamiento de la célula (De-Fátima-Alves y col., 2023).

Además de provocar estrés oxidativo se ha demostrado que el furfural es un inhibidor que daña enzimas que están involucradas en procesos metabólicos como la glucólisis y el ciclo de Krebs, por lo que reduce directamente la viabilidad de la célula y a la vez la productividad para producir bioetanol. (Unrean y col., 2018).

La detoxificación del furfural como mecanismo de adaptación de las levaduras es a través de la reducción del furfural a furfuryl alcohol, se ha demostrado que cuando dicho compuesto se encuentra en bajas concentraciones la producción de etanol puede incrementar (Thygesen y col., 2012). Con lo que se ha discutido anteriormente, las levaduras tienen una tolerancia intrínseca para poder metabolizar y reducir la toxicidad del furfural, dicha capacidad no permitió a la cepa poder producir cantidades significativas de bioetanol, por lo que posiblemente ante estos tratamientos la cepa este priorizando su supervivencia en vez de producir bioetanol.

Con lo anterior, para complementar el estudio sería interesante realizar medición de la detoxificación del furfural ante las concentraciones empleadas para considerar si la cepa empleada está realizando la detoxificación. Al analizar las tres concentraciones de furfural empleadas, se evidencia un patrón en el cual, la concentración de 0.3 % (v/v) produjo 4.3 g L<sup>-1</sup> de etanol, el cual fue mayor a comparación de lo obtenido a 0.1 % (v/v). Ante este contexto, es interesante explorar concentraciones superiores, para evaluar si a una concentración mayor se pueda atenuar los efectos de producción de etanol o que esté presente la posibilidad de la completa inhibición de la cepa.

Por lo tanto, a pesar de que la cepa utilizada demostró tolerancia ante el furfural, no le permitió mantener niveles estables de producción de etanol frente a la presencia del inhibidor. No obstante, hay que tener presente que la adaptación en ambientes fermentativos involucra mecanismos de adaptación y eventos genéticos que son complejos, por lo que existen más factores que se deben tener presentes para tener un entendimiento más completo (Giannakou y col., 2020).

Lo anterior juega un papel interesante como una propuesta para seguir buscando alternativas para ofrecer mayores cantidades de producción con la cepa *S. stipitis*, ya que hay varios factores que nos permitan generar una mayor producción de bioetanol. Las propuestas más actuales para producir cepas que generen mayor producción de etanol están relacionadas con la ingeniería genética, un acercamiento es la de modificar la expresión de genes relacionados con los cofactores que juegan un gran papel para el equilibrio redox para poder otorgar mayor tolerancia y a su vez mayor producción de etanol (Liu y col., 2020).

Sin embargo, también se han encontrado cepas de levaduras no modificadas que pueden tener mayor tolerancia natural hacia el furfural. Field y col. (2015), encontraron cuatro cepas de *S. cerevisiae* con una gran tolerancia hacia el furfural, dentro de esas cuatro, se observó un incremento notable en la producción de bioetanol.

Wang y col. (2020), utilizaron levadura alcohólica en un medio de fermentación modelo con glucosa, adicionando concentraciones de 1.0 a 10.0 g L<sup>-1</sup> de ácido acético; encontraron que a partir de 3 g L<sup>-1</sup>, la producción de etanol disminuyó considerablemente, produciendo aproximadamente 15 g L<sup>-1</sup> de etanol, mientras que la concentración de 10 g L<sup>-1</sup> de ácido acético generó inhibición completa en la producción de etanol. Comparando con los tratamientos utilizados en el presente trabajo, la concentración más baja utilizada de ácido fue de 0.1 % (v/v) el cual corresponde a 1.049 g L<sup>-1</sup>, la cual generó 2.9 g L<sup>-1</sup> de etanol, comparado con los 26.3 g L<sup>-1</sup> obtenidos del control la reducción fue del 89 %. Por lo tanto, la cepa empleada de *S. stipitis* tiene menor capacidad para producir etanol frente al inhibidor respecto a la levadura alcohólica que utilizó Wang.

El ácido acético es uno de los principales inhibidores que se puede encontrar en los hidrolizados de la biomasa lignocelulósica, por lo que pueden terminar afectando negativamente los rendimientos y las tasas de producción de bioetanol (Shyam y col., 2018). Como se reporta en la fermentación, el ácido acético resultó ser un inhibidor que también generó un efecto negativo en la producción de etanol.

Se ha descrito que, frente al estrés del ácido acético, la metacaspasa YCA1 causa alteraciones significativas en el metabolismo, dentro de ellas es el cambio de vías glucolíticas a la vía de las pentosas fosfato (Guaragnella y Bettiga, 2021). La vía de las pentosas fosfato es una ruta que puede operar simultáneamente con la glucólisis para la degradación de la glucosa en la mayoría de las células. Es una vía con múltiples funciones, dentro de ellas la síntesis de NADPH (Bertels y col., 2021).

Lo anterior puede jugar un papel importante, ya que el NADPH es un cofactor que sirve para regenerar antioxidantes como glutatión, tioredoxinas y peroxirredoxinas, por lo que dichos antioxidantes ayudan a neutralizar a las especies ROS, lo que consecuentemente protege a la célula frente el estrés oxidativo (Yadav y col., 2020).

Otra de las formas adaptativas que pueden presentar las levaduras frente al estrés que ocasiona el ácido acético es a través de mecanismos que le ayuden a regular la acidificación intracelular que dicho inhibidor les genera. Un mecanismo es regular el pH intracelular por medio de la bomba de protones de la membrana plasmática Pma1 y la H-ATPasa vacuolar; las bombas de protones utilizan el ATP para expulsar iones de hidrógeno fuera de la célula con el fin de contrarrestar la acidificación provocada por el ácido acético (Deprez y col., 2021).

Otro mecanismo son los sistemas transportadores de iones, en este caso se enfoca al acetato, el cual es la forma disociada del ácido acético. En *S. cerevisiae*, los transportadores Tpo2 y Tpo3 son ejemplos que se encuentran en las levaduras y se han demostrado que les confiere resistencia a las levaduras, ya que reducen la concentración intracelular del acetato, expulsándolo de la célula (Zhang y col., 2022).

Para el caso de *S. stipitis*, la información sobre los transportadores de iones de acetato es limitado, en comparación de *S. cerevisiae*, ya que es la levadura más estudiada. Sin embargo, se puede esperar que *S. stipitis* tenga sistemas de transporte para el acetato, ya que es una cepa que puede crecer frente a la presencia



del ácido acético. Las condiciones experimentadas con ácido acético demostraron que *S. stipitis* es capaz de crecer, pero, no logró fermentar los mismos niveles de bioetanol comparado con el grupo control.

En las condiciones establecidas en la experimentación, la producción de etanol para *S. stipitis* bajo las condiciones de 250 rpm con glucosa a 0.5 M con oxígeno limitado, se ha demostrado que ocasiona la inhibición de la cadena de transporte de electrones, lo que consecuentemente hace que se incremente la producción de etanol (Granados-Arvizu y col., 2019). Dichas condiciones redirigen el metabolismo de la levadura hacia la fermentación para tener una vía alternativa de energía. Con lo observado en la experimentación, a pesar de usar las mismas concentraciones de glucosa y condiciones de oxígeno limitado, los inhibidores demostraron reducir la producción de bioetanol.

En cuanto a la mezcla de inhibidores, la concentración de 0.1 % (v/v) en la que logró crecer, el consumo de glucosa y la generación de biomasa no generó diferencia significativa respecto al control, mientras que en la producción de etanol produjo 3.1 g L<sup>-1</sup>, una disminución del 88 % (v/v). Con lo anterior, Bhavana y col. (2022) reportaron un efecto sinérgico de la mezcla del furfural, HMF y ácido acético en la reducción de la actividad de fermentación de la xilosa para producir xilitol.

El presente estudio con los tratamientos empleados proporciona una medida cuantitativa de la respuesta adaptativa en condiciones de estrés, en este caso, se

observó la inhibición en la producción de etanol. Continuar la línea de investigación para generar un entendimiento más profundo de lo que sucede en ambos tratamientos para producir más bioetanol es de gran interés. Por ejemplo, medir la relación ATP/ADP, realizar un análisis de expresión génica, estudiar los perfiles de metabolitos intracelulares o medir la actividad de enzimas clave podrían generar más entendimiento de lo que sucede frente al estrés originado por ambos inhibidores.

## 8. CONCLUSIONES

- La presencia de furfural y ácido acético a concentraciones de entre 0.1 y 0.3 % disminuyó significativamente la velocidad específica de crecimiento de *S. stipitis* e inhibió completamente el crecimiento en *S. cerevisiae*. Adicionalmente, en algunos tratamientos, se prolongó la fase de latencia en *S. stipitis*.
- Para *S. stipitis*, el decremento del potencial de membrana mitocondrial no fue influenciado por la concentración del inhibidor al evaluarse de forma separada, en contraste con la forma combinada. Por otro lado, la generación de ROS fue directamente proporcional a la concentración de furfural y sin diferencias en ácido acético, pero la mezcla incrementó sustancialmente la presencia de estas.
- Los resultados obtenidos muestran que levaduras Crabtree negativas como *S. stipitis* son capaces de crecer en medios en presencia de inhibidores, a pesar de presentar disfunciones mitocondriales.
- Es de suponer que tanto el furfural como el ácido acético afectan el funcionamiento mitocondrial, pero esto no implica que se estimule la fermentación para compensar el desbalance energético que pueda causar.

## 9. REFERENCIAS

**Ahmad**, M., Wolberg, A., y Kahwaji, C. I. (2022). Biochemistry, Electron Transport Chain. StatPearls Publishing.

**Allen**, S. A., Clark, W. G., McCaffery, J. M., Cai, Z., Lanctot, A. A., Slininger, P. J., Liu, Z. L., y Gorsich, S. W. (2010). Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology for Biofuels, 3(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-2>

**Al-Daccache**, M., Louka, N., Maroun, R.G., y Salameh, D. (2021). Culture condition changes for enhancing fermentation processes. En M. Koubaa, F. J. Barba, S. Roohinejad (Eds), Fermentation processes: emerging and conventional technologies (pp. 97-114). John Wiley & Sons.

**Andlar**, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., y Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. Engineering in Life Sciences, 18(11), 768–778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>

**Artifon**, W., Bonatto, C., Bordin, E. R., Bazoti, S. F., Dervanoski, A., Alves, S. L., y Treichel, H. (2018). Bioethanol Production from Hydrolyzed Lignocellulosic After Detoxification Via Adsorption with Activated Carbon and Dried Air Stripping. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 6, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00107>

**Ask**, M., Bettiga, M., Mapelli, V., y Olsson, L. (2013). The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology For Biofuels, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-22>

**Banuvalli**, B. K., Mudliar, S. N., Bokade, V. V., y Debnath, S. (2022). Evaluation of inhibition kinetics of furfural, 5-hydroxymethylfurfural and acetic acid on xylitol fermentation by *Pichia stipitis*. Authorea. <https://doi.org/10.22541/au.164864144.49249780/v1>

**Baruah**, J., Nath, B., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D., y Kalita, E. (2018). Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added

products. *Frontiers in Energy Research*, 6, 1-19.

<https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>

**Bellido**, C., Bolado, S., Coca, M., Lucas, S., Benito, G. G., y Cubero, M. T. G. (2011). Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, 102(23), 10868–10874.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.128>

**Bertels**, L. K., Murillo, L. F., y Heinisch, J. J. (2021). The pentose phosphate pathway in yeasts—more than a poor cousin of glycolysis. *Biomolecules*, 11(5), 1-20.

<https://doi.org/10.3390/biom11050725>

**Betts**, J. G., Young, K. A., Wise, J. A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D. H. (2022). *Anatomy and physiology* (2a ed.). Opestatx.

**Bhavana**, B. K., Mudliar, S. N., Bokade, V. V., y Debnath, S. (2022). Effect of furfural, acetic acid and 5-hydroxymethylfurfural on yeast growth and xylitol fermentation using *Pichia stipitis* NCIM 3497. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14, 4909-4923.

<https://doi.org/10.1007/s13399-022-02758-w>

**Borrero-López**, A. M., Valencia, C., y Franco, J. (2022). Lignocellulosic materials for the production of biofuels, biochemicals and biomaterials and Applications of Lignocellulose-Based polyurethanes: a review. *Polymers*, 14(5), 1-42.

<https://doi.org/10.3390/polym14050881>

**Broda**, M., Yelle, D. J., y Serwańska-Leja, K. (2022). Bioethanol Production from lignocellulosic biomass—challenges and solutions. *Molecules*, 27(24), 1-27.

<https://doi.org/10.3390/molecules27248717>

**Brodeur**, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J. M., Ramachandran, K., y Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Research*, 2011, 1–17. <https://doi.org/10.4061/2011/787532>

**Bušić**, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Šantek, M. I., Komes, D., Novak, S., y Šantek, B. (2018). Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 1-23. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>

**Casey**, E., Sedlák, M., Ho, N. W. Y., y Mosier, N. S. (2010). Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically

engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Research*, 10(4), 385–393. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00623.x>

**Choudhary**, M., Joshi, N., Bhagyawant, S. S., y Srivastava, N. (2018). Advances in fermentation technology: principle and their relevant applications. En A. Kuila y V. Sharma (Eds), *Principles and applications of fermentation technology* (pp. 53-63). John Wiley & Sons.

**Chu**, L., Kang, X., Li, D., Song, X., y Zhao, X. (2022). Physiological responses of *Pichia stipitis* to imidazolium chloride ionic liquids with different carbon chain length. *Chemosphere*, 286, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131578>

**Clauser**, N. M., González, G., Mendieta, C. M., Kruyeniski, J., Área, M. C., y Vallejos, M. E. (2021). Biomass waste as sustainable raw material for energy and fuels. *Sustainability*, 13(2), 1-21. <https://doi.org/10.3390/su13020794>

**Cox**, S.E. (2013). Energy Metabolism. En B, Caballero, L. Allen, A. Prentice (Eds), *Encyclopedia of human nutrition* (3<sup>a</sup> ed., pp. 177-185). Elsevier.

**Dahman**, Y., Syed, K., Begum, S., Roy, P., y Mohtasebi, B. (2019). Biofuels: their characteristics and analysis. En D. Verma, E. Fortunati, S. Jain, X. Zhang (Eds.), *Biomass, biopolymer-based materials, and bioenergy* (pp. 277-325). Elsevier.

**Damayanti**, D., Supriyadi, D., Amelia, D., Saputri, D. R., Devi, Y. L. L., Auriyani, W. A., y Wu, H. (2021). Conversion of lignocellulose for bioethanol production, applied in Bio-Polyethylene terephthalate. *Polymers*, 13(17), 1-30. <https://doi.org/10.3390/polym13172886>

**Datta**, A., Hossain, A., y Roy, S. (2019). An overview on biofuels and their advantages and disadvantages. *Asian Journal of Chemistry*, 31(8), 1851–1858. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.22098>

**Da-Silva**, T. L., Santo, R., Reis, A., y Passarinho, P. C. (2016). Effect of furfural on *Saccharomyces carlsbergensis* growth, physiology and ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(2), 708–720. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2356-5>

**Deprez**, M., Maertens, J. M., Olsson, L., Bettiga, M., y Winderickx, J. (2021). The role of SCH9 and the V-ATPASE in the adaptation response to acetic acid and the

consequences for growth and chronological lifespan. *Microorganisms*, 9(9), 1-21.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091871>

**De-Almeida**, J. R. M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Lidén, G., y Gorwa-Grauslund, M. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82(4), 340–349. <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>

**De-Alteriis**, E., Carteni, F., Parascandola, P., Serpa, J., y Mazzoleni, S. (2018). Revisiting the Crabtree/Warburg effect in a dynamic perspective: a fitness advantage against sugar-induced cell death. *Cell Cycle*, 17(6), 688–701.  
<https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1442622>

**De-Fátima-Alves**, L., Bortolucci, J., Reginato, V., Guazzaroni, M., y Mussatto, S. I. (2023). Improving *Saccharomyces cerevisiae* acid and oxidative stress resistance using a prokaryotic gene identified by functional metagenomics. *Heliyon*, 9(4), 1-12.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14838>

**De-Souza-Abud**, A. K., De-Oliveira-Júnior, A. M., y De-Souza-Da-Silva, A. (2017). Effect of inhibitors on ethanol production by *Pichia stipitis* in a complex culture media. *Acta Scientiarum-technology*, 39(2), 1-7.  
<https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v39i2.29719>

**Divate**, N. R., Huang, P., Chen, G., y Chung, Y. (2022). Construction of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with ethanol and aldehydes tolerance via overexpression of aldehyde reductase. *Microorganisms*, 10(5), 1-12.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10050850>

**Eardley**, J., y Timson, D. J. (2020). Yeast Cellular Stress: Impacts on Bioethanol Production. *Fermentation*, 6(4), 1-19. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040109>

**Erkan**, S. B., Yatmaz, E., Germeç, M., y Turhan, İ. (2020). Effect of furfural concentration on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* in an immobilized cells stirred-tank bioreactor with glucose-based medium and mathematical modeling. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(8), 1-11.  
<https://doi.org/10.1111/jfpp.14635>

**Festucci-Buselli**, R. A., Otoni, W. C., y Joshi, C. P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202007000100001>

**Flores-Cosío**, G., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A. C., y Amaya-Delgado, L. (2018). Physiological response to furan derivatives stress by *Kluyveromyces marxianus* SLP1 in ethanol production. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 17(1), 189–202. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/flores>

**Field**, S. J., Ryden, P., Wilson, D. R., James, S. A., Roberts, I. N., Richardson, D. J., Waldron, K. W., y Clarke, T. A. (2015). Identification of furfural resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* from a collection of environmental and industrial isolates. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0217-z>

**Galbe**, M., y Wallberg, O. (2019). Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1-26. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1634-1>

**Giannakou**, K., Cotterrell, M., y Delneri, D. (2020). Genomic adaptation of *saccharomyces* species to industrial environments. *Frontiers in Genetics*, 11, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00916>

**Granados-Arvizu**, J. Á., Madrigal-Perez, L. A., Canizal-García, M., González-Hernández, J. C., García-Almendárez, B. E., y Regalado-González, C. (2019). Effect of cytochrome bc1 complex inhibition during fermentation and growth of *Scheffersomyces stipitis* using glucose, xylose or arabinose as carbon sources. *Fems Yeast Research*, 19(2), 1-8. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy126>

**Guaragnella**, N., y Bettiga, M. (2021). Acetic acid stress in budding yeast: From molecular mechanisms to applications. *Yeast*, 38(7), 391–400. <https://doi.org/10.1002/yea.3651>

**Hamill**, P. G., Stevenson, A., McMullan, P. E., Williams, J. P., Lewis, A. D. R., Sudharsan, S., Stevenson, K. E., Farnsworth, K. D., Khroustalyova, G., Takemoto, J. Y., Quinn, J. P., Rapoport, A., y Hallsworth, J. E. (2020). Microbial lag phase can be



indicative of, or independent from, cellular stress. *Scientific Reports*, 10(1), 1-20. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4>

**Hashem**, M., Alamri, S., Asseri, T. A. Y., Mostafa, Y. S., Lyberatos, G., y Ντρίκου, I. (2021). On the optimization of fermentation conditions for enhanced bioethanol yields from starchy biowaste via yeast Co-Cultures. *Sustainability*, 13(4), 1-13. <https://doi.org/10.3390/su13041890>

**Hawkins**, G. M., y Doran-Peterson, J. (2011). A strain of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for fermentation of lignocellulosic biomass displays improved growth and fermentative ability in high solids concentrations and in the presence of inhibitory compounds. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-49>

**Heer**, D., Heine, D., y Sauer, U. (2009). Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-Dependent reduction by at least two oxireductases. *Applied And Environmental Microbiology*, 75(24), 7631-7638. <https://doi.org/10.1128/aem.01649-09>

**Hernández-Beltrán**, J. U., Lira, I. O. H., Cruz-Santos, M. M., Saucedo-Luevanos, A., Hernández-Terán, F., y Balagurusamy, N. (2019). Insight into pretreatment methods of lignocellulosic biomass to increase biogas yield: current state, challenges, and opportunities. *Applied Sciences*, 9(18), 1-29. <https://doi.org/10.3390/app9183721>

**Hernández-Cervantes**, A., Znaidi, S., Van Wijlick, L., Denega, I., Basso, V., Ropars, J., Sertour, N., Sullivan, D. J., Moran, G. P., Basmacıyan, L., Bon, F., Dalle, F., Bougnoux, M., Boekhout, T., Yang, Y., Li, Z., Bachellier-Bassi, S., y D'Enfert, C. (2020). A conserved regulator controls asexual sporulation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Nature Communications*, 11(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20010-9>

**Holechek**, J. L., Geli, H. M. E., Sawalhah, M. N., y Valdez, R. (2022). A global assessment: Can renewable energy replace fossil fuels by 2050? *Sustainability*, 14(8), 1-22. <https://doi.org/10.3390/su14084792>

**Horton**, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., Rawn, J. D. (2008). *Principios de bioquímica* (4ª ed.). Pearson Educación.

- Huang**, H., Xin-Yan, G., Li, D., Liu, M., Wu, J., y Ren, H. (2011). Identification of crucial yeast inhibitors in bio-ethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids. *Bioresource Technology*, 102(16), 7486–7493. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.008>
- Jain**, J. L., Jain, S., Jaime, N. (2004). *Fundamentals of biochemistry*. Chand Publishing.
- Javadov**, S., Kozlov, A. V., y Camara, A. K. (2020). Mitochondria in health and diseases. *Cells*, 9(5), 1-9. <https://doi.org/10.3390/cells9051177>
- Jędrzejczyk**, M., Soszka, E., Czapnik, M., Ruppert, A.M., y Grams, J. (2019). Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. En A. Basile y F. Dalena (Eds.), *Second and third generation of feedstocks the evolution of biofuels* (pp. 143-196). Elsevier.
- Jeffries**, T. W., y Van-Vleet, J. R. H. (2009). *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *Fems Yeast Research*, 9(6), 793-807. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00525.x>
- Juan**, C. A., De La Lastra, J. M. P., Plou, F. J., y Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 1-21. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Kalpage**, H. A., Wan, J., Morse, P. T., Zurek, M. P., Turner, A. A., Khobeir, A., Yazdi, N., Hakim, L., Liu, J., Vaishnav, A., Sanderson, T. H., Recanati, M., Grossman, L. I., Lee, I., Edwards, B. F., y Hüttemann, M. (2020). Cytochrome c phosphorylation: Control of mitochondrial electron transport chain flux and apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 121, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105704>
- Kalvelytė**, A.V., Imbrasaitė, A., Krestnikova, N., y Stulpinas, A. (2017). Adult stem cells and anticancer therapy. En Fishbein y Heilman (Eds.), *Advances in Molecular Toxicology* (pp. 103-202). Elsevier.
- Korla**, K., y Mitra, C. K. (2013). Modelling the Krebs cycle and oxidative phosphorylation. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 32(2), 242–256. <https://doi.org/10.1080/07391102.2012.762723>

- Krishnan, S.,** Din, M. F. M., Taib, S. M., Ling, Y. E., Aminuddin, E., Chelliapan, S., Mishra, P., Rana, S., Nasrullah, M., Sakinah, M., Wahid, Z. A., y Singh, L. (2018). Utilization of micro–algal biomass residues (MABRS) for bio–hythane production– a perspective. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 5(3), 1-4. <https://doi.org/10.15406/jabb.2018.05.00133>
- Kumar, P.S.,** Saravanan, A., Jayasree, R., Jeevanantham, S. (2020). Food industry waste biorefineries. En R. P. Kumar, E. Gnansounou, J. K. Raman, G. Baskar (Eds.), *Refining biomass residues for sustainable energy and bioproducts: technology, advances, life cycle* (pp. 407-426). Elsevier.
- Laca, A.,** Laca, A., Díaz, M. (2019). Hydrolysis: from cellulose and hemicellulose to simple sugars. En A. Basile y F. Dalena (Eds.), *Second and third generation of feedstocks* (pp. 213-240). Elsevier.
- Laussel, C.,** y **Léon, S.** (2020). Cellular toxicity of the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose and associated resistance mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 182, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114213>
- Li, B.,** Liu, N., y Zhao, X. (2022). Response mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* to the stress factors present in lignocellulose hydrolysate and strategies for constructing robust strains. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02127-9>
- Li, K.,** Xia, J., Mehmood, M. A., Zhao, X., Liu, C., y Bai, F. (2019). Extracellular redox potential regulation improves yeast tolerance to furfural. *Chemical Engineering Science*, 196, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.11.059>
- Limayem, A.,** y Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 449–467. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>
- Liu, C.,** Li, K., Li, K., Sakdaronnarong, C., Mehmood, M. A., Zhao, X., y Bai, F. (2020). Intracellular redox perturbation in *Saccharomyces cerevisiae* improved furfural tolerance and enhanced cellulosic bioethanol production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00615>

**López, P. C., Peng, C., Arneborg, N., Junicke, H., y Gernaey, K. V. (2021).** Analysis of the response of the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae* during the detoxification of common lignocellulosic inhibitors. *Scientific Reports*, 11(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86135-z>

**Luo, X., Zeng, B., Zhong, Y., y Chen, J. (2022).** Production and detoxification of inhibitors during the destruction of lignocellulose spatial structure. *Bioresources*, 17(1), 1939–1961. <https://doi.org/10.15376/biores.17.1.luo>

**Magalhães, A. I., De-Carvalho, J. C., De-Melo P. G. V., Karp, S. G., Câmara, M. C., Medina, J. D. C., y Soccol, C. R. (2019).** Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(6), 1505–1519. <https://doi.org/10.1002/bbb.2048>

**Malecki, M., Bitton, D. A., Rodríguez-López, M., Rallis, C., Calavia, N. G., Smith, G. C., y Bähler, J. (2016).** Functional and regulatory profiling of energy metabolism in fission yeast. *Genome Biology*, 17(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1101-2>

**Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D’Andrea, L., Napolitano, P., y D’Alessandro, A. G. (2022).** Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48-78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>

**Martínez-Reyes, I., y Chandel, N. S. (2020).** Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*, 11, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>

**Maślanka, R., y Zdraż-Tęcza, R. (2020).** Reproductive potential of yeast cells depends on overall action of interconnected changes in central carbon metabolism, cellular biosynthetic capacity, and proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1-24. <https://doi.org/10.3390/ijms21197313>

**Mikulski, D., y Kłosowski, G. (2020).** Microwave-assisted dilute acid pretreatment in bioethanol production from wheat and rye stillages. *Biomass and Bioenergy*, 136, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105528>

**Miller, C. (2020).** *Human Biology, Human Anatomy and Physiology*. Thompson Rivers University.

**Mota**, M. N., Múgica, P., y Correia, I. S. (2022). Exploring yeast diversity to produce Lipid-Based biofuels from Agro-Forestry and industrial organic residues. *Journal of Fungi*, 8(7), 1-46. <https://doi.org/10.3390/jof8070687>

**Musa**, Y., y Bwatanglang, I. B. (2020). Current role and future developments of biopolymers in green and sustainable chemistry and catalysis. En: F. Mohammad, H.A. Al-Lohedan, M. Jawaid (Eds.), *Sustainable nanocellulose and nanohydrogels from natural sources* (pp. 131-154). Elsevier.

**Mutton**, M. J. R., Ferrari, F. C., De-Freita, L. A., De-Freita, C. M., Da-Graça S. A. M., y Andrietta, S. R. (2019). Interaction between the production of ethanol and glycerol in fed-batch bioreactors. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(2), 389–394. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00051-z>

**Nanda**, S., Rana, R., Sarangi, P. K., Dalai, A. K., y Kozinski, J. A. (2018). Broad introduction to first-, second-, and third-generation biofuels. En: P. K. Sarangi, S. Nanda, P. Mohanty (Eds.), *Recent Advancements in Biofuels and Bioenergy Utilization* (pp. 1-25). Springer.

**Nandal**, P., Sharma, S., y Arora, A. (2020). Bioprospecting non-conventional yeasts for ethanol production from rice straw hydrolysate and their inhibitor tolerance. *Renewable Energy*, 147, 1694–1703. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.09.067>

**Narendranath**, N. V., Thomas, K. C., y Ingledew, W. M. (2001). Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces Cerevisiae* by different mechanisms. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59(4), 187–194. <https://doi.org/10.1094/asbcj-59-0187>

**Narendranath**, N. V., Thomas, K. C., y Ingledew, W. M. (2001). Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of industrial Microbiology & Biotechnology*, 26(3), 171–177. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000090>

**Niju**, S., Swathika, M., y Balajii, M. (2019). Pretreatment of lignocellulosic sugarcane leaves and tops for bioethanol production. En: A. Yousuf, F. Sannino, D. Pirozzi (Eds.), *Lignocellulosic biomass to liquid biofuels* (pp.301-324). Elsevier.

**Olivares-Marin**, I. K., Madrigal-Pérez, L. A., Canizal-García, M., García-Almendárez, B. E., González-Hernández, J. C., y Regalado-González, C. (2018). Interactions

between carbon and nitrogen sources depend on RIM15 and determine fermentative or respiratory growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 102(10), 4535–4548. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8951-3>

**Oriez, V.,** Peydecastaing, J., y Pontalier, P. (2019). Lignocellulosic biomass fractionation by mineral acids and resulting extract purification processes: conditions, yields, and purities. Molecules, 24(23), 1-21. <https://doi.org/10.3390/molecules24234273>

**Pampulha, M. E.,** y Loureiro-Dias, M. C. (1990) Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. Applied Microbiology and Biotechnology, 34(3), 375-380. <https://doi.org/10.1007/bf00170063>

**Pan, S.,** Jia, B., Liu, H., Wang, Z., Chai, M., Ding, M., Zhou, X. D., Li, X., Li, C., Li, B., y Yuan, Y. (2018). Endogenous lycopene improves ethanol production under acetic acid stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology for Biofuels, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1107-y>

**Panikov, N. S.** Microbial growth dynamics. (2019). En M. Moo-Young, S. Agathos, M. Butler, Z. Cui, B. Grodzinski, A. Moreira, et al (Eds.), Comprehensive Biotechnology (pp. 231-273). Elsevier.

**Park, J.,** Lee, J., y Choi, C. (2011). Mitochondrial network determines intracellular ROS dynamics and sensitivity to oxidative stress through switching Inter-Mitochondrial Messengers. PLOS ONE, 6(8), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023211>

**Pereira, C.,** Chaves, S. R., Alves, S., Salin, B., Camougrand, N., Manon, S., Sousa, M. J., y Côte-Real, M. (2010). Mitochondrial degradation in acetic acid-induced yeast apoptosis: The role of PEP4 and the ADP/ATP carrier. Molecular Microbiology, 76(6), 1398-1410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07122.x>

**Periyasamy, K.** (2018). Bioethanol production from lignocellulosic biomass using immobilized cellulolytic enzymes. Anna University.

**Pezzani, R.,** Salehi, B., Vitalini, S., Iriti, M., Zúñiga, F., Sharifi-Rad, J., Martorell, M., y Martins, N. (2019). Synergistic effects of plant derivatives and conventional chemotherapeutic agents: an update on the cancer perspective. Medicina-lithuania, 55(4), 1-16. <https://doi.org/10.3390/medicina55040110>

- Pfeiffer, T.**, y **Morley, A.** (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>
- Pielech-Przybylska, K.**, **Balcerek, M.**, **Ciepielowski, G.**, **Pacholczyk-Sienicka, B.**, **Albrecht, Ł.**, **Dziekońska-Kubczak, U.**, **Bonikowski, R.**, y **Patelski, P.** (2019). Effect of Co-Inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria on the content of propan-2-ol, acetaldehyde and weak acids in fermented distillery mashes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ijms20071659>
- Posas, F.**, y **Nebreda A. R.** (2008). *Stress-activated protein kinases*. Springer science & business media.
- Rafa, N.**, **Ahmed, S. F.**, **Badruddin, I. A.**, **Mofijur, M.**, y **Kamangar, S.** (2021). Strategies to produce cost-effective third-generation biofuel from microalgae. *Frontiers in Energy Research*, 9, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.749968>
- Rezania, S.**, **Oryani, B.**, **Cho, J.**, **Talaiekhosravi, A.**, **Sabbagh, F.**, **Hashemi, B.**, **Rupani, P. F.**, y **Mohammadi, A. A.** (2020). Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, 199, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>
- Robak, K.**, y **Balcerek, M.** (2020). Current state-of-the-art in ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Microbiological Research*, 240, 1-44. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126534>
- Rodrigues, F.**, **Ludovico, P.**, y **Leao, C.** (2006). Sugar metabolism in yeasts: An overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. En: C. Rosa, y G. Péter (Eds.), *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (pp.106-122). Springer.
- Ruan, R.**, **Zhang, Y.**, **Chen, P.**, **Liu, S.**, **Li, F.**, **Zhou, N.**, **Ding, K.**, **Peng, P.**, **Addy, M.**, **Cheng, Y.**, **Anderson, E.**, **Wang, Y.**, **Liu, Y.**, **Lei, H.**, y **Li, B.** (2019). Biofuels: Introduction. En A. Pandey, C. Larroche, C. Dussap, E. Gnansounou, S. Khanal, y S. Ricke (Eds.), *Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels* (pp. 3-43). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816856-1.00001-4>
- Ruchała, J.**, **Kurylenko, O.**, **Dmytruk, K. V.**, y **Sibirny, A. A.** (2020). Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces*



*cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 47(1), 109–132. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02242-x>

**Rusli**, N. D., Ghani, A. A. A., Mat, K., Yusof, M. T., Zamri-Saad, M., y Hassim, H. A. (2021). The Potential of pretreated oil palm frond in enhancing rumen degradability and growth performance: A review. Advances in Animal and Veterinary Sciences, 9(6), 1-12. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.6.811.822>

**Samakkarn**, W., Ratanakhanokchai, K., y Soontorngun, N. (2021). Reprogramming of the ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae* by the transcription factor Znf1 and its effect on the biosynthesis of glycerol and ethanol. Applied and Environmental Microbiology, 87(16), 1-26. <https://doi.org/10.1128/aem.00588-21>

**Sánchez**, R., y Arboleda, G. (2008). Mitochondria y muerte celular. NOVA-Publicación científica en ciencias biomédicas.

**Sannelli**, F., Gao, S., Jensen, P. R., y Meier, S. (2022). Glucose/Furfural substrate mixtures in non-engineered yeast: potential for massive rerouting of fermentation to C–C bond formation on furfural. ChemCatChem, 14(24), 1-8. <https://doi.org/10.1002/cctc.202200933>

**Selim**, K. A., El-Ghwas, D. E., Easa, S. M., y Hassan, M. I. A. (2018). Bioethanol a microbial biofuel metabolite; new insights of yeasts metabolic engineering. Fermentation, 4(1), 1-27. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010016>

**Sharifi-Rad**, M., Anil-Kumar N.V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh-Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash-Mishra, A., Nigam, M., El-Rayess, Y., Beyrouthy, M. E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., ...Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. Frontiers in Physiology, 11, 1-21. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>

**Shields**, H. J., Traa, A., y Van-Raamsdonk, J. M. (2021). Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: A comprehensive review of comparative and experimental studies. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9, 1-27. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628157>



**Shyam**, S., Jiayi, L., Engelberth, A. S., y Jen-Yi, H. (2018). Application of electro-membrane separation for recovery of acetic acid in lignocellulosic bioethanol production. En: E. Wilson, y S. Richardson (Eds.), Food and Bioproducts Processing (pp. 41-51). Elsevier.

**Silveira**, M. H. L., Morais, A. R. C., Da Costa-Lopes, A. M., Oleksyszzen, D. N., Bogel-Łukasik, R., Andreaus, J., y Ramos, L. P. (2015). Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. ChemSusChem, 8(20), 3366-3390. <https://doi.org/10.1002/cssc.201500282>

**Sindhu**, R., Binod, P., Pandey, A., Ankaram, S., Duan, Y., y Awasthi, M.K. (2019). Biofuel production from biomass: toward sustainable development. En: S. Kumar, R. Kumar, A. Pandey (Eds.), Current developments in biotechnology and bioengineering: waste treatment processes for energy generation (pp. 79-92). Elsevier.

**Sinha**, A., y Pick, E. (2020). Fluorescence detection of increased reactive oxygen species levels in *Saccharomyces cerevisiae* at the diauxic shift. En J. Espada (Ed.), Reactive oxygen species methods and protocols (pp. 81-91). Springer Protocols. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0896-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0896-8_7)

**Slininger**, P. J., Shea-Andersh, M. A., Thompson, S. R., Dien, B. S., Kurtzman, C. P., Balan, V., Da Costa Sousa, L., Uppugundla, N., Dale, B. E., y Cotta, M. A. (2015). Evolved strains of *Scheffersomyces stipitis* achieving high ethanol productivity on acid- and base-pretreated biomass hydrolyzate at high solids loading. Biotechnology for Biofuels, 8(1), 1-27. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0239-6>

**Sousa**, M. J., Ludovico, P., Rodrigues, F., Leo, C., y Crte-Real, M. (2012). Stress and cell death in yeast induced by acetic acid. InTech eBooks. <https://doi.org/10.5772/27726>

**Sutikno**, S., y Kismurtono, M. (2018). Pretreatment empty fruit bunch of oil palm tree for improving enzymatic saccharification. En: K. Biernat (Ed.), Biofuels: state of development (pp. 55-75). Books on Demand.

**Tauffenberger**, A., y Magistretti, P. J. (2021). Reactive oxygen species: beyond their reactive behavior. Neurochemical Research, 46(1), 77-87. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03208-7>

**Tenea**, G. N., y Veintimilla, F. (2021). Potential use of native yeasts to produce bioethanol and other byproducts from black sugarcane, an alternative to increment the subsistence farming in northern Ecuador. *Sustainability*, 13(19), 1-15. <https://doi.org/10.3390/su131910924>

**Thygesen**, A., Vahlgren, L., Frederiksen, J. H., Linnane, W., y Thomsen, M. H. (2012). SSF fermentation of rape straw and the effects of inhibitory stress on yeast. InTech eBooks. <https://doi.org/10.5772/24445>

**Tirichen**, H., Yaigoub, H., Xu, W., Wu, C., Li, R., y Li, Y. (2021). Mitochondrial reactive oxygen species and their contribution in chronic kidney disease progression through oxidative stress. *Frontiers in Physiology*, 12, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.627837>

**Tofalo**, R., y Suzzi, G. (2016). Yeasts. En: B. Caballero, P.M. Finglas, F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 593-599). Elsevier.

**Tsang**, C. K., Chen, M., Cheng, X., Qi, Y., Chen, Y., Das, I., Li, X., Vallat, B., Li, F., Qian, C. N., Wang, H. Y., White, E., Burley, S., y Zheng, X. (2018). SOD1 phosphorylation by MTORC1 couples nutrient sensing and redox regulation. *Molecular Cell*, 70(3), 502-515. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.029>

**Tudge**, S. J., Purvis, A., y De Palma, A. (2021). The Impacts of biofuel crops on local biodiversity: A global synthesis. *Biodiversity and Conservation*, 30(11), 2863-2883. <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02232-5>

**Tullio**, V. (2022). Yeast genomics and its applications in biotechnological processes: What is our present and near future? *Journal of Fungi*, 8(7), 1-16. <https://doi.org/10.3390/jof8070752>

**Tye**, Y. Y., Lee, K. T., Abdullah, W. N. W., y Leh, C. P. (2016). The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 60, 155-172. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.01.072>

**Unrean**, P., Gätgens, J., Klein, B., Noack, S., y Champreda, V. (2018). Elucidating cellular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* tolerant to combined

lignocellulosic-derived inhibitors using high-throughput phenotyping and multiomics analyses. *Fems Yeast Research*, 18(8), 1-10. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy106>

**Vasan**, K., Clutter, M., Dunne, S. F., George, M. D., Luan, C., Chandel, N. S., y Martínez-Reyes, I. (2022). Genes involved in maintaining mitochondrial membrane potential upon electron transport chain disruption. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.781558>

**Vasić**, K., Knez, Ž., y Leitgeb, M. (2021). Bioethanol production by enzymatic hydrolysis from different lignocellulosic sources. *Molecules*, 26(3), 1-23. <https://doi.org/10.3390/molecules26030753>

**Velmurugan**, B., Narra, M., Rudakiya, D. M., y Madamwar, D. (2020). Sweet sorghum: a potential resource for bioenergy production. En: R.P. Kumar, E. Gnansounou, J.K. Raman, G. Baskar (Eds.), *Refining biomass residues for sustainable energy and bioproducts: Technology, advances, life cycle* (pp. 2015-242). Elsevier.

**Vona**, R., Pallotta, L., Cappelletti, M., Severi, C., y Matarrese, P. (2021). The impact of oxidative stress in human pathology: Focus on gastrointestinal disorders. *Antioxidants*, 10(2), 1-26. <https://doi.org/10.3390/antiox10020201>

**Walker** G.M. (1998). *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons.

**Walker** G.M. *Yeasts*. (2011). En: M. Schaechter (Ed.), *Eukaryotic Microbes* (pp-1-17). Elsevier.

**Wang**, Y., Cai, L., y Ma, Y. (2020). Study on inhibitors from acid pretreatment of corn stalk on ethanol fermentation by alcohol yeast. *RSC Advances*, 10(63), 38409–38415. <https://doi.org/10.1039/d0ra04965d>

**Wang**, X., Ma, M., Liu, Z. L., Xiang, Q., Li, X., Liu, N., y Zhu, X. (2016). GRE2 from *Scheffersomyces stipitis* as an aldehyde reductase contributes tolerance to aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(15), 6671-6682. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7445-4>

**Wang**, X., Yao, B., y Su, X. (2018). Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ijms19113373>

**Willson**, B. J., Herman, R., Langer, S., y Thomas, G. H. (2022). Improved furfural tolerance in *Escherichia coli* mediated by heterologous NADH-dependent benzyl alcohol dehydrogenases. *Biochemical Journal*, 479(10), 1045-1058. <https://doi.org/10.1042/bcj20210811>

**Wood**, I. P., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I. N., y Waldron, K. W. (2012). Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*, 44, 117-121. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>

**Xia**, Z., Li, J., Zhang, J., Zhang, X., Zheng, X., y Zhang, J. (2020). Processing and valorization of cellulose, lignin and lignocellulose using ionic liquids. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 5(2), 79-95. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2020.04.001>

**Yadav**, S., Mody, T. A., Sharma, A., y Bachhawat, A.K. (2020). A genetic screen to identify genes influencing the secondary redox couple NADPH/NADP<sup>+</sup> in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda)*, 10(1), 371-378. [10.1534/g3.119.400606](https://doi.org/10.1534/g3.119.400606).

**Yadav**, V. K., Gupta, N., Kumar, P., Dashti, M. G., Tirth, V., Khan, S. H., Yadav, K. K., Islam, S., Choudhary, N., Algahtani, A., Bera, S. P., Kim, D., y Jeon, B. (2022). Recent advances in synthesis and degradation of lignin and lignin nanoparticles and their emerging applications in nanotechnology. *Materials*, 15(3), 953, 1-28. <https://doi.org/10.3390/ma15030953>

**Yi-Xuan**, L., Pei-Hsuan, L., Endah, R., Yun-Yi, M., Cindy, C., y Chii-Ruey, T. Mitochondria research in human reproduction. (2019). En: P. Leung, y E. Adashi (Eds.), *The Ovary* (3<sup>a</sup> Ed., pp. 327-335). Elsevier.

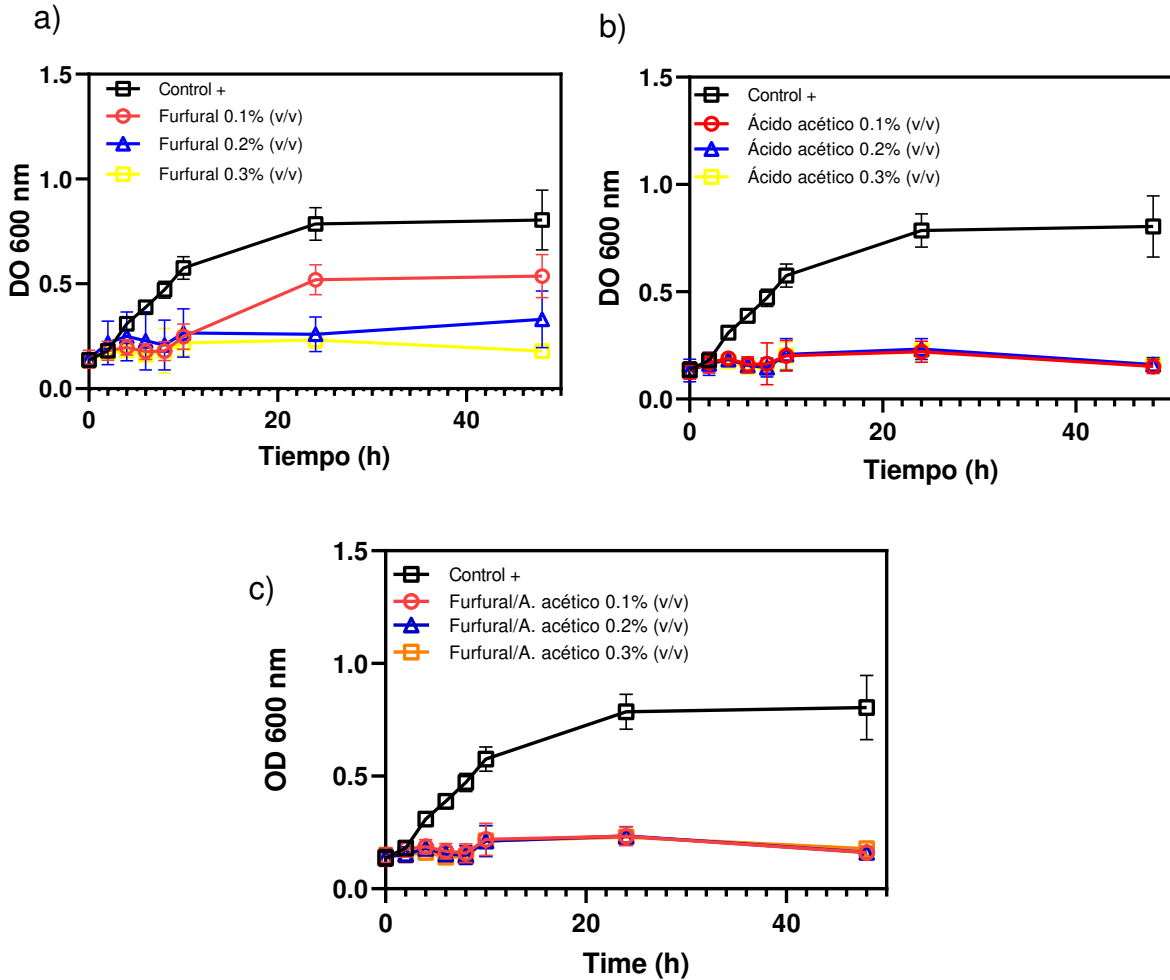
**Yousuf**, A., Pirozzi, D., y Sannino, F. (2019). Fundamentals of lignocellulosic biomass. En: A. Yousuf, F. Sannino, y D. Pirozzi (Eds.), *Lignocellulosic biomass to liquid biofuels* (pp. 1-15). Academic Press.

**Yuan**, Y., Jiang, B., Chen, H., Wu, W., Wu, S., Jin, Y., y Xiao, H. (2021). Recent advances in understanding the effects of lignin structural characteristics on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02054-1>

- Zahari**, N. Z., Tuah, P. M., Ali S. A. M., y Sabullah, M. K. (2022). Microbial growth rate and distribution of doubling time at different concentration of oil sludge medium. IOP Conference Series: Earth and environmental science, 1022(1), 1-9. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1022/1/012075>
- Zhang**, M., Xiong, L., Tang, Y., Mehmood, M. A., Zhao, Z. K., Bai, F., y Zhao, X. (2019). Enhanced acetic acid stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating expression of the de novo purine biosynthesis genes. Biotechnology for Biofuels, 12(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1456-1>
- Zhang**, X., Li, L., y Xu, F. (2022). Chemical characteristics of wood cell Wall with an emphasis on ultrastructure: A Mini-Review. Forests, 13(3), 1-22. <https://doi.org/10.3390/f13030439>
- Zhao**, J., Wang, Z., Wang, M., He, Q., y Zhang, H. (2008). The inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* cells by acetic acid quantified by electrochemistry and fluorescence. Bioelectrochemistry, 72(2), 117-121. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2007.11.015>
- Zheng**, B., Yu, S., Chen, Z., y Huo, Y. (2022). A consolidated review of commercial-scale high-value products from lignocellulosic biomass. Frontiers in Microbiology, 13, 1-21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.933882>
- Zhou**, S., Zhang, M., Zhu, L., Xiao-Ling, Z., Chen, J., Chen, W., y Chang, C. (2023). Hydrolysis of lignocellulose to succinic acid: A review of treatment methods and succinic acid applications. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 16(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02244-5>
- Zoghlami**, A., y Paës, G. (2019). Lignocellulosic biomass: Understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. Frontiers in Chemistry, 7, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>
- Zorova**, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., y Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. Analytical Biochemistry, 552, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>

## ANEXOS

Cinéticas de crecimiento de *S. cerevisiae* realizadas en medio YPD con 0.5 M de glucosa a 250 rpm por 48 horas con a) furfural, b) ácido acético, c) mezcla de Furfural y ácido acético al 0.1, 0.2 y 0.3 % (v/v).



Los resultados representan la media  $\pm$  SD; n = 5 réplicas de cinco experimentos independientes.