



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Estudios sobre el metabolismo de la glucosa, xilosa y arabinosa en *Scheffersomyces stipitis* ATCC28217 y su impacto en la producción de etanol usando hidrolizados lignocelulósicos**

**Tesis**

**Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de**

**Doctor en Ciencia de los Alimentos**

**PRESENTA**

**M en C. José Ángel Granados Arvizu**

**Dirigido por:**

**Dr. Carlos Regalado González**

**Querétaro, Qro, a 28 de Noviembre del 2019**



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencia de los alimentos

Estudios sobre el metabolismo de la glucosa, xilosa y arabinosa en  
*Scheffersomyces stipitis* ATCC28217 y su impacto en la producción de etanol  
usando hidrolizados lignocelulósicos

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Doctor en Ciencia de los Alimentos

**Presenta:**

M. en C. José Ángel Granados Arvizu

**Dirigido por:**

Dr. Carlos Regalado González

Dr. Carlos Regalado González  
Presidente

Dra. Blanca Estela García Almendárez  
Secretario

Dr. Aldo Amaro Reyes  
Vocal

Dr. Juan Carlos González Hernández  
Suplente

Dr. Rubén Salcedo Hernández  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro. México  
28 de Noviembre de 2019  
México

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE

Resumen .....	10
Abstract.....	11
1.0 Introducción .....	12
1.1 Antecedentes .....	13
1.1.1 <i>Scheffersomyces stipitis</i> .....	13
1.1.2 Biomasa lignocelulósica .....	14
<b>1.1.3 Fermentación de las pentosas</b> .....	15
1.1.4 Papel del oxígeno en la fermentación con <i>S. stipitis</i> .....	19
1.1.5 Estudios de la inhibición de complejos de la cadena respiratoria.....	20
1.1.6 La oxidasa alterna en hongos .....	21
1.1.7 Papel de los complejos de oxidación alterna (COA).....	22
2.0 Justificación .....	24
3.0 Hipótesis .....	25
4.0 Objetivo general.....	25
4.1 Objetivos específicos .....	25
5.0 Metodología.....	26
5.1 Cinéticas de crecimiento .....	26
5.2 Cinéticas empleando un inhibidor de la respiración.....	26
5.3 Cuantificación de variables bioenergéticas .....	27
5.3.1 Cuantificación de la respiración mitocondrial <i>in situ</i> .....	27
5.3.2 Cuantificación del flujo glucolítico a través de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) .....	27
5.3.3 Crecimiento y fermentación en matraz .....	29
5.4 Cinéticas de crecimiento empleando AA y SHAM en fuentes de carbono no fermentables .....	29

5.5 Cinéticas de crecimiento empleando AA y SHAM en fuentes de carbono fermentables .....	30
5.6 Cuantificación de variables bioenergéticas empleando dos inhibidores .....	30
5.6.1 Cuantificación de la respiración mitocondrial <i>in situ</i> empleando SHAM y AA .....	31
5.6.2 Cuantificación del flujo glucolítico a través de ECAR empleando SHAM y AA .....	31
5.6.3 Cuantificación del potencial de membrana <i>in situ</i> empleando SHAM y AA .....	31
5.6.4 Crecimiento y fermentación en matraz empleando SHAM y AA .....	32
5.8 Análisis estadístico.....	33
6.0 Resultados y discusión.....	34
6.1 Efecto de la inhibición de la respiración mediante AA en la respiración mitocondrial .....	36
6.2 Efecto de la inhibición de la CTE en flujo glucolítico de <i>S. stipitis</i> .....	38
6.3 Crecimiento de <i>S. stipitis</i> en matraz.....	40
6.4 Efecto del SHAM sobre el crecimiento de <i>S. stipitis</i> en fuentes no fermentables.....	42
6.5 Efecto del SHAM y la AA sobre el crecimiento y fermentación de <i>S. stipitis</i> en xilosa o glucosa .....	43
6.6 Crecimiento y fermentación en matraz usando SHAM y AA .....	49
7.0 Conclusiones.....	50
8.0 Perspectivas.....	51
9.0 Referencias bibliográficas .....	52
10.0 Material suplementario .....	60

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Rendimiento de fermentación para diversos sustratos empleando <i>S. stipitis</i> . Tomado de Agbogbo y Coward-Kelly (2008). .....	14
Cuadro 2. Últimos resultados sobre fermentación de hidrolizados usando diversos organismos recombinantes y nativos fermentadores de xilosa. Tomado de Hahn-Hägerdal <i>et al.</i> (2006). .....	18
Cuadro 4. Tratamientos para flujo glucolítico mediante ECAR. ....	28
Cuadro 5. Tratamientos seleccionados para medición de variables bioenergéticas .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Diagrama de flujo para la conversión de la biomasa a etanol. Tomado de Hahn-Hägerdal <i>et al.</i> (2006) .....	15
Figura 2. Vías metabólicas de las pentosas en levaduras modificadas. A. Procesos de conversión de xilosa a xilulosa mediante xilosa isomerasa por una etapa. B...	17
Figura 3. Esquema de los complejos mitocondriales y el transporte de electrones: Complejo I, NADH deshidrogenasa, Complejo II succinato deshidrogenasa, Complejo III, citocromo bc <sub>1</sub> , Complejo IV, citocromo oxidasa (COX), Complejos de oxidación alternos (COA), UQ ubiquinona, Ext. NADH deshidrogenasas externas, deshidrogenasas internas, SHAM, ácido salicilhidroxámico, TCA, ácido tricarbóxico.....	23
Figura 4. Cinéticas de crecimiento de <i>S. stipitis</i> a 250 rpm a 30 °C por 48 h con etanol (a), etanol con AA (b), glucosa (c), glucosa con AA (d), xilosa (e), xilosa con AA (f), arabinosa (g) y arabinosa con AA (h). Los resultados representan la media ± SE de cinco replicas técnicas. ....	35
Figura 5. Efecto de la AA en el metabolismo energético de <i>S. stipitis</i> usando glucosa como fuente de carbono. a) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) a 250, 125 y 0 rpm y 30 °C por 48 h con y sin AA; los resultados representan la media ± SE de cinco replicas técnicas. b) Comparación de respiración mitocondrial basal <i>in situ</i> en cultivos a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media ± SE de seis experimentos independientes. c) Comparación de respiración mitocondrial máxima <i>in situ</i> en cultivos a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media ± SE de seis experimentos independientes. d) Comparación del flujo glucolítico por ECAR de cultivos de <i>S. stipitis</i> a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media ± SE de seis experimentos independientes. e) etanol y f) biomasa en cultivos en matraz agitado de <i>S. stipitis</i> a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media ± SE de tres experimentos independientes. ....	37
Figura 6. Efecto de la AA en el metabolismo energético de <i>S. stipitis</i> usando xilosa como fuente de carbono. a) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) a 250, 125 y 0	

rpm y 30 °C por 48 h con y sin AA; los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas. b) Comparación de respiración mitocondrial basal *in situ* en cultivos a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes. c) Comparación de respiración mitocondrial máxima *in situ* en cultivos a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes. d) Comparación del flujo glucolítico por ECAR de cultivos de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes. e) etanol y f) biomasa en cultivos en matraz agitado de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes. ....39

Figura 7. Efecto de la AA en el metabolismo energético de *S. stipitis* usando arabinosa como fuente de carbono. a) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) a 250, 125 y 0 rpm y 30 °C por 48 h con y sin AA; los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas. b) Rendimiento de biomasa en cultivos en matraz agitado de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes. ....40

Figura 8. Cinéticas de crecimiento de *S. stipitis* a 250 rpm a 30 °C por 48 h probando un gradiente de concentración de SHAM al 0.01, 0.1 y 0.5 M y AA al 0.2 mM empleando a) etanol al 1% (v/v), b) xilitol al 2% (p/v), c) glucosa al 0.5 M y d) glicerol al 2% (p/v). Los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas. ....43

Figura 9. Cinéticas de crecimiento de *S. stipitis* a 250 rpm a 30 °C por 48 h empleando 0.2 mM de AA como inhibidor del complejo III y SHAM 0.1 M como inhibidor del COA, empleando como fuente de carbono a) glicerol, b) glucosa 0.5 M, c) glucosa 0.05 M, d) xilosa 0.5 M y e) xilosa 0.05 M. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas.....44

Figura 10. Cinéticas de crecimiento de *S. stipitis* sin agitación a 30 °C por 48 h empleando 0.2 mM de AA como inhibidor del complejo III y SHAM 0.1 M como inhibidor del COA, empleando como fuente de carbono a) glicerol, b) glucosa 0.5 M,



c) glucosa 0.05 M, d) xilosa 0.5 M y e) xilosa 0.05 M. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas.....46

Figura 11. Efecto de la AA y el SHAM en el metabolismo energético de *S. stipitis* usando glucosa como fuente de carbono. a) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) a 250 y 0 rpm y 30 °C por 48 h sin inhibidores, con SHAM y con AA y SHAM; los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas. b) glucosa consumida (%) y c) biomasa en cultivos en matraz agitado de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h a 250 y 0 rpm y 30 °C por 48 h sin inhibidores, con SHAM y con AA y SHAM. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes.47

Figura 12. Efecto de la AA y el SHAM en el metabolismo energético de *S. stipitis* usando xilosa como fuente de carbono. a) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) a 250 y 0 rpm y 30 °C por 48 h sin inhibidores, con SHAM y con AA y SHAM; los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas. b) glucosa consumida (%) y c) biomasa en cultivos en matraz agitado de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h a 250 y 0 rpm y 30 °C por 48 h sin inhibidores, con SHAM y con AA y SHAM. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes.48

## Resumen

*Scheffersomyces stipitis* destaca por su capacidad de consumir xilosa y arabinosa, siendo importante en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Entre sus desventajas está el metabolismo, requiriendo bajos niveles de agitación para inducir fermentación. El paso crítico es la conversión de xilosa en xilitol por D-xilosa reductasa, que emplea NADH como agente reductor. Dependiendo de la agitación, el xilitol puede transformarse en xilulosa mediante la D-xilitol deshidrogenasa, que emplea NAD<sup>+</sup>. Adicionalmente, la respiración alternativa (AOX) sensible al ácido salicilhidroxámico (SHAM) está activa en levaduras que metabolizan pentosas como *S. stipitis*. Por lo cual, el uso de inhibidores de la cadena respiratoria puede ayudar a entender el papel de los complejos de la CTE y de la AOX de *S. stipitis*. El objetivo fue evaluar la inhibición de la respiración sobre el crecimiento de *S. stipitis* NRRLY-7124. Las fuentes de carbono evaluadas fueron: glucosa (G), xilosa (X) y arabinosa (A) a 0.5, 0.05 y 0.005 M, agitación (250, 125 y 0 rpm), con y sin antimicina A (AA) (100 µL/mL), así como la inhibición de la AOX y sus efectos en el metabolismo de xilosa empleando glucosa como control. Se evaluó el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) mediante cinéticas de crecimiento (DO), producción de biomasa (g/L), consumo de la fuente de carbono (%), tasas de acidificación extracelular (mpH/min), respiración mitocondrial *in situ* y producción de etanol (g/L). Se diferenció el metabolismo respiratorio y fermentativo al emplear xilosa o arabinosa. El flujo glucolítico estuvo activo debido a que la levadura consumió la glucosa o xilosa para producir ATP, alcanzando rendimientos de etanol entre 17 y 33 g/L a partir de glucosa con AA y en experimentos con xilosa sin agitación se alcanzó una producción de 11 g/L. La combinación entre AA y SHAM incrementó la producción de etanol en tratamientos específicos, sugiriendo que la inhibición de la respiración afecta en diferentes formas a la levadura dependiendo de la fuente de carbono y la agitación.

**Palabras clave:** Bioetanol, xilosa, *Scheffersomyces stipitis*, fermentación y arabinosa.

## Abstract

*Scheffersomyces stipitis* stands out for its ability to metabolize xylose and arabinose, being important in ethanol production from lignocellulosic biomass. The strain has some disadvantages like metabolism, because required specific agitation conditions to carry out fermentation process. From this, the critical step is the conversion of xylose into xylitol by D-xylose reductase, which uses NADH as a reducing agent. Depending on the agitation, xylitol can be transformed into xylulose through D-xylitol dehydrogenase, which uses NAD<sup>+</sup>. Additionally, the alternative respiration system sensitive to salicylic hydroxamic acid (SHAM) (AOX) is active in yeasts that metabolize pentose, including *S. stipitis*. Therefore, the use of respiratory chain inhibitors can help to understand the role of electronic transport chain (ETC) and AOX complex in *S. stipitis*. The main of the work was to evaluate the inhibition of respiration on the growth of *S. stipitis* NRRLY-7124. The carbon sources evaluated were: glucose (G), xylose (X) and arabinose (A) at 0.5, 0.05 and 0.005 M, agitation (250, 125 and 0 rpm), with and without antimycin A (AA) (100 µL/mL), as well as the inhibition of AOX and its effects on xylose metabolism using glucose as control. Doubling time (td) was evaluated by growth kinetics (OD), biomass production (g/L), carbon source consumption (%), extracellular acidification rates (mpH/min), mitochondrial respiration *in situ* and ethanol production (g/L). The respiratory and fermentative metabolism was discriminated depending on carbon source; xylose or arabinose. The glycolytic flux was active because the yeast consumed glucose or xylose to produce ATP, reaching ethanol yields between 17 and 33 g/L from glucose with AA. In experiments using xylose as carbon source without stirring it was produced 11 g/L of ethanol. The combination between AA and SHAM increased ethanol production in specific treatments, suggesting that the inhibition of respiration affects yeast in different ways depending on carbon source and agitation.

**Keywords:** Bioethanol, xylose, *Scheffersomyces stipitis*, fermentation, arabinose.

## 1.0 Introducción

La fermentación de fuentes de carbono provenientes de diferentes alimentos es una de las tecnologías más antiguas de la humanidad. Hasta nuestros días, las levaduras son microorganismos esenciales para muchos procesos biotecnológicos, tales como la producción de alimento, el vino, la cerveza, los medicamentos y los biocombustibles. Entre los microorganismos empleados en la fermentación, la levadura más empleada es *S. cerevisiae*, debido a su habilidad para convertir los azúcares en etanol y dióxido de carbono en condición aerobia y anaerobia. Esta levadura presenta algunas desventajas, entre ellas que es incapaz de producir etanol a partir de xilosa, principal azúcar derivado de la biomasa lignocelulósica. Por lo cual, se han buscado cepas que tengan la capacidad de fermentar pentosas. *Scheffersomyces stipitis* es una levadura con la capacidad de fermentar pentosas que más ha destacado, siendo la levadura con la capacidad nativa más alta de fermentar pentosas y con rendimientos que superan los  $0.35 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Debido a esto, se ha estudiado en numerosos sustratos e hidrolizados agroindustriales y ha sido fuente de genes para la modificación y expresión del metabolismo de la xilosa en otras cepas. Una de las diferencias más importantes con respecto a *Saccharomyces cerevisiae* es que exhibe un metabolismo predominantemente respiratorio, por lo que la fermentación requiere de condiciones específicas y se da solo cuando el oxígeno se vuelve un factor limitante. Se han llevado a cabo numerosos estudios en *S. stipitis*, desde la secuenciación del genoma, el efecto de inhibidores presentes en los hidrolizados lignocelulósicos, transportadores de las pentosas, etc. Todo esto con el fin de incrementar los rendimientos de los metabolitos producto de la fermentación. Existen pocos estudios que se enfoquen en el estudio del papel de los complejos de la cadena respiratoria, por lo cual su comprensión puede ayudar a dilucidar estrategias que permitan incrementar los rendimientos de etanol y con ello aprovechar de una mejor manera los azúcares provenientes de la biomasa lignocelulósica.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 *Scheffersomyces stipitis*

*Scheffersomyces stipitis*, es una levadura hemiascomiceto haploide, homotálico (con capacidad de autofertilización) posee la capacidad nativa más alta para fermentar xilosa de todos los microorganismos conocidos. Tiene un tamaño de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, su forma habitual es esférica o elipsoidal aunque puede haber desviaciones y formar pseudomicelio (Bellido et al., 2011). Pertenece a un grupo de levaduras aisladas de madera en descomposición y de larvas de insectos que habitan la madera (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008). Crece en rangos de entre 25 y 37  $^{\circ}\text{C}$  y pH entre 5 y 6, siendo 30  $^{\circ}\text{C}$  su temperatura óptima (Jeffries et al., 2007). Es capaz de producir en cultivos por lote, cerca de 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de etanol a partir de xilosa, alcanzando rendimientos de 0.35 a 0.44  $\text{g}\cdot(\text{g xilosa})^{-1}$  con rendimientos teóricos máximos del 80 % (Jeffries et al., 2007). Es capaz de fermentar gran cantidad de azúcares además de xilosa, incluyendo glucosa, manosa, galactosa y celobiosa junto con los oligómeros manano y xilano (Silva et al., 2012). Sumado a menores requerimientos nutricionales, tolerancia a los inhibidores y su delgada pared celular, hacen de *S. stipitis* un microorganismo con potencial para el escalamiento de la producción de bioetanol (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008). Sin embargo, su baja tolerancia al etanol y a los azúcares, limita su uso a nivel industrial. Las características principales de una cepa de uso industrial son: eficiencia al emplear hexosas y pentosas, tasas de fermentación rápidas, alta producción de etanol y alta tolerancia al etanol, azúcares e inhibidores de la fermentación (Zhang y Geng, 2012). *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de producir etanol cuando la concentración de azúcares es relativamente baja, incluso bajo condiciones aeróbicas, este fenómeno es conocido como el efecto Crabtree (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008). A diferencia de *S. cerevisiae*, *S. stipitis* es una levadura aerobia, ya que no produce etanol bajo condiciones aerobias, incluso con un exceso de azúcares (Fiaux et al., 2003).

Cuadro 1. Rendimiento de fermentación para diversos sustratos empleando *S. stipitis*. Tomado de Agbogbo y Coward-Kelly (2008).

Sustrato	Tipo de pretratamiento	Tipo de reactor y tamaño	Etanol (g·L <sup>-1</sup> )	Rendimiento (g·g <sup>-1</sup> )	Aireación/Agitación	Azúcares consumidos (%)	Tiempo de fermentación (h)
Aserrín de álamo	SO <sub>2</sub>	Matraz de 250 mL	41.0	0.47	125 rpm	95	96
Aserrín de álamo (madera dura)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluido	Bioreactor continuo 3.4 L	9.2	0.45	40 rpm	88	5
Mazorca de maíz	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluido	Matraz de 250 mL	10.4	0.34	80 rpm	85	96
Paja de maíz	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluido	Matraz de 125 mL	25.0	0.42	150 rpm	92	72
Jarabe sulfitado de madera blanda	Licor de molienda de pulpa y papel	Bioreactor continuo 3.4 L	18.0	0.45	40 rpm	89	14
Mezcla de álamo y pino	Catálisis con SO <sub>2</sub>	Bioreactor continuo 3.4 L	10.3	0.47	40 rpm	90	4
Aserrín de pino	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluido	Bioreactor continuo 3.4 L	10.0	0.48	40 rpm	90	4
Aserrín de roble rojo	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluido (0.5 v·v <sup>-1</sup> )	Matraz de 250 mL	14.5	0.4	4.5 mmol O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> , 150 rpm	93.5	100
Paja de arroz	Explosión de vapor	Fermentador de 3 L	6.0	0.4	2vvm	100	20
Bagazo de caña	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluido	Biorreactor Mutigen F-2000 2L	15.0	0.38	100 mL/min	-	60
Pasto varilla	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluido	Matraz de 250 mL	14.0	0.36	300 rpm	-	36
Paja de trigo	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluido (0.5 v·v <sup>-1</sup> )	Fermentador Microferm 5 L	22.3	0.43	0.02 vvm	85.8	50

*S. stipitis* se ha empleado para fermentar diversos tipos de biomasa pretratada (Cuadro 1), logrado producir etanol en cantidades de 6 a 41 g·L<sup>-1</sup> y rendimientos de 0.34 a 0.48 gramos de etanol por gramo de azúcar consumido.

### 1.1.2 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica ha sido identificada como la primera fuente para producir fuentes de energía renovables tales como los biocombustibles (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), debido a su bajo costo, alta disponibilidad y

potencial para reducir los gases de efecto invernadero (Lynd *et al.*, 2005; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Somerville, 2006; Tilman *et al.*, 2009). Sin embargo, la conversión de los materiales lignocelulósicos a etanol es mucho más difícil que el uso de materiales ricos en azúcares o almidón (Cheng y Timilsina, 2011). Para superar las barreras que impiden la producción de bioetanol a partir de residuos, es necesaria mayor investigación en (1) Desarrollo de materias primas, (2) Tecnologías para el pretratamiento, (3) Reducción en el costo de las enzimas y (4) Cofermentación de glucosa y xilosa. Ha habido esfuerzos en crear microorganismos genéticamente modificados (levaduras y bacterias) que puedan convertir de manera eficiente la glucosa y xilosa a etanol, pero es necesaria más investigación en esta área (Cheng y Timilsina, 2011).

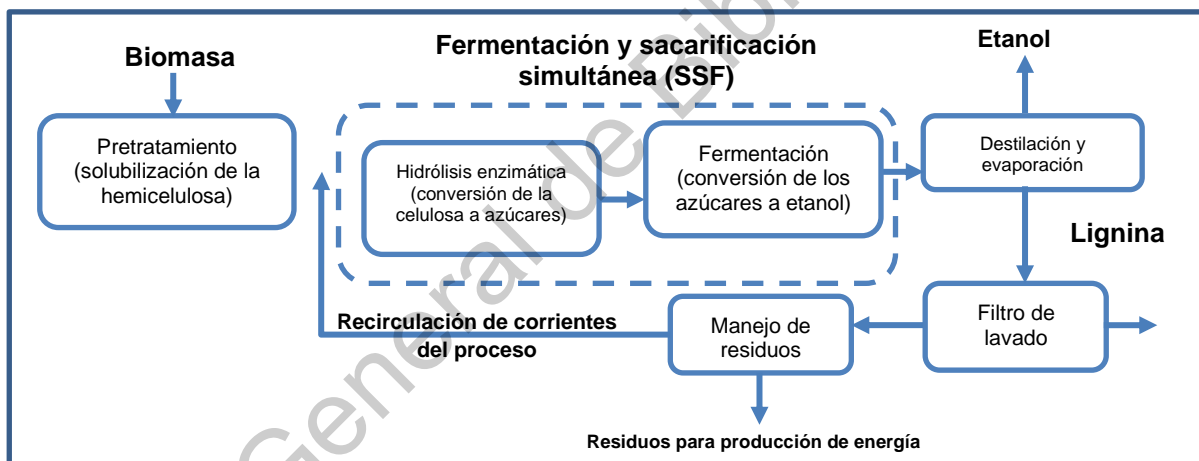


Figura 1. Diagrama de flujo para la conversión de la biomasa a etanol. Tomado de Hahn-Hägerdal *et al.* (2006)

### 1.1.3 Fermentación de las pentosas

El pretratamiento y la hidrólisis enzimática generan una mezcla de pentosas y hexosas, que pueden ser rápidamente fermentados a etanol por la mayoría de las levaduras, pero solo un pequeño número puede metabolizar pentosas (Kricka *et al.*, 2015). Las levaduras más prometedoras para metabolizar pentosas son *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolan tannophilus* (Bhatia *et al.*, 2012). A pesar de su potencial, estas especies presentan inconvenientes como

bajos rendimientos de etanol, poca tolerancia a altas concentraciones del mismo y una limitada caracterización genética (Kricka *et al.*, 2015). Se han llevado a cabo muchos esfuerzos en desarrollar una levadura con capacidades para fermentar xilosa de manera eficiente (Cuadro 2) (Zhang y Geng, 2012). Si bien, la ruta de la xilosa isomerasa ha mostrado ser la ideal para fermentar de manera eficiente la xilosa en *S. cerevisiae*, ya que puede superar a las cepas que llevan a cabo la vía oxidorreductasa en términos de rendimiento (Figura 2) (Lee *et al.*, 2014), la incorporación de estas rutas no ha mostrado ser suficiente, ya que las cepas presentan bajos rendimientos de etanol y baja productividad (Young *et al.*, 2010). La estrategia que se ha seguido ha sido la incorporación de genes requeridos para la síntesis de la xilosa isomerasa (XI) y la xilosa reductasa/xilosa deshidrogenasa (XR/XDH) en *S. cerevisiae*, provenientes de *S. stipitis* (Kricka *et al.*, 2015). También se ha buscado desarrollar cepas que presenten una sobreexpresión del gen XKS (codificante de la xilulosa cinasa) así como genes río abajo involucrados en la ruta de las pentosas fosfato (PPP) (Karhumaa *et al.*, 2005). El silenciamiento de los genes *gre3* (Träff *et al.*, 2001) o *pho13* (Van Vleet *et al.*, 2008) ha mostrado mejoras en la tasa de consumo de xilosa y una disminución en la formación de xilitol (Lee *et al.*, 2014). Muchos factores afectan la producción de etanol en *S. cerevisiae*, cuando se expresa la vía XR/XDH, siendo el desbalance de cofactores uno de los principales.





Esto debido a que la XR tiene mayor afinidad por el NADPH que por el NADH ( $K_m=3.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para NADPH y  $K_m=40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para NADH) además que el XDH solo emplea el  $\text{NAD}^+$  (Young *et al.*, 2010). En levaduras, hay una disparidad entre la cantidad y accesibilidad del NADPH y el NADH para la ruta metabólica de la xilosa (Jeffries y Jin, 2004; Moreira dos Santos *et al.*, 2004). Esta disparidad puede ser debido a una competencia por el  $\text{NAD}^+$  de parte de otras enzimas endógenas o por ineficiencia de las enzimas de la vía de la xilosa, resultando en alta producción de xilitol (Nevoigt, 2008).

Cuadro 2. Últimos resultados sobre fermentación de hidrolizados usando diversos organismos recombinantes y nativos fermentadores de xilosa. Tomado de Hahn-Hägerdal *et al.* (2006).

Organismo	Hidrolizado	Detoxificación	Tipo de fermentación	Rendimiento (g/g azúcares iniciales)	Tiempo de fermentación (h)	Productividad (g/ g células-h)
<i>Escherichia coli</i> KO11	Bagazo	+	n/a	0.49	n/a	0.37
	Hemicelulosa					
	Fibra de maíz	+	Batch	0.39-0.41	93-102	n/a
			Batch	0.30-0.38	29-68	
			Fed-batch	0.35-0.39	118	
<i>E. coli</i> FBR5	Rastrojo de maíz	+	n/a	0.46	n/a	0.214
	Cáscara de arroz	-	Batch	0.43	64	n/a
	Cáscara de arroz	+	Batch	0.40	39	n/a
<i>Zymomonas mobilis</i> 8b	Rastrojo de maíz	+	Batch	0.42	n/a	n/a
<i>Pichia stipitis</i>	Paja de trigo	+	n/a	0.41	n/a	0.44
<i>Pichia stipitis</i> CBS 5773	Licor de sulfito pasado	+	Continuo	0.35	-	0.05
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 424A (LNF-ST)	Fibra de maíz	+	Batch	0.36	48	0.072
			Batch	0.41	24	0.044
	Rastrojo de maíz	+	Batch	0.45	55	0.048
	Rastrojo de maíz	-				
<i>S. cerevisiae</i> TMB3006	Picea	-	Batch alimentado	0.37	n/a	0.66
<i>S. cerevisiae</i> TMB3400	Picea	-	Batch alimentado	0.43	n/a	0.25
	Rastrojo de maíz	-	SSF, Batch	0.33	96	0.036
			SSF, Batch alimentado	0.30	96	0.076

En la ruta de la xilosa isomerasa, la xilosa es transformada a xilulosa, cuya reacción es catalizada por la xilosa isomerasa codificada por el gen *XI* (Temer et al., 2014). Tiene la ventaja de evita el desbalance de cofactores, no se produce xilitol y el rendimiento de etanol es mucho mayor que por la ruta oxidoreductasa (Li et al., 2015). Sin embargo, las cepas que expresan la xilosa isomerasa tienen bajos consumos de xilosa y una baja tasa de crecimiento en condiciones anaerobias debido a una insuficiente actividad del heterólogo xilosa isomerasa (Nogué y Karhumaa, 2014). Debido a que recientemente se ha trabajado en la vía xilosa isomerasa en cepas modificadas de *S. cerevisiae*, todavía es necesario el desarrollo e investigación de cepas con capacidades óptimas (Young et al., 2010)

#### **1.1.4 Papel del oxígeno en la fermentación con *S. stipitis***

El oxígeno juega un papel muy importante dentro del crecimiento celular, potencial óxido reductor, funcionamiento de la mitocondria y generación de energía para el transporte de la xilosa en *S. stipitis*. En levaduras Crabtree positivas, como *S. cerevisiae*, concentraciones elevadas de glucosa inducen represión sobre el catabolismo del carbono, resultando en bajos niveles de transcripción de genes responsables de la respiración y el ciclo del ácido tricarboxílico. En contraste, *S. stipitis* siendo Crabtree negativa, exhibe un metabolismo netamente respiratorio incluso a altas concentraciones de glucosa (Fiaux et al., 2003). Por lo cual, la regulación de la fermentación depende de los niveles de oxígeno, ya que *S. stipitis* solo produce etanol cuando existe una condición limitante del mismo. Se identificaron los genes responsables de la producción del etanol en *S. stipitis*: *ADH1* y *ADH2*, que codifican el complejo alcohol deshidrogenasa (Papini et al., 2012). La actividad de este complejo es inducida por una reducción en la tensión de oxígeno. Este mismo patrón de inducción se reportó para genes del complejo piruvato descarboxilasa y aldehído deshidrogenasa. Debido a la diversidad de formas para medir directa o indirectamente, el oxígeno en las fermentaciones: revoluciones por minuto (rpm) en matraces agitados, volumen de aire/ [(volumen del fermentador)(min)] (vvm), Tasa de transferencia de oxígeno (OTR) y oxígeno

disuelto (DO) en fermentadores, se ha dificultado hacer comparaciones entre los datos de los diferentes sistemas (Agbogbo y Wenger, 2006).

A pesar del gran número de estudios relacionados con el efecto del oxígeno sobre el metabolismo de *S. stipitis*, se sabe poco acerca de las bases fisiológicas de la inducción del metabolismo fermentativo de *S. stipitis* (Klinner *et al.*, 2005). Es por esto que resulta importante conocer los niveles de oxígeno óptimos para alcanzar un proceso eficiente con alta conversión de azúcares y producción de etanol (Silva *et al.*, 2012).

#### **1.1.5 Estudios de la inhibición de complejos de la cadena respiratoria**

*S. stipitis* es una levadura del tipo Crabtree negativo que es conocida por su capacidad de fermentar xilosa y su alto rendimiento de etanol a partir de este azúcar (0.35 – 0.44 g/g) (Papini *et al.*, 2012). Como se mencionó previamente, el rendimiento de etanol y el suministro de oxígeno están altamente correlacionados, independientemente de la fuente de carbono o su concentración (Unrean y Nguyen, 2012). La cadena respiratoria de *S. stipitis* contiene, a diferencia de *S. cerevisiae*, complejo I NADH deshidrogenasa y adicionalmente, complejos de oxidación alterna, lo que le proveen de una alta capacidad oxidativa sobre el NADH (Shi *et al.*, 2002). Por lo que se han adoptado estrategias recientes buscando explorar la manipulación de cofactores a través del uso de inhibidores de la cadena transportadora de electrones. Esta ingeniería de cofactores podría ser una buena alternativa para eficientar la producción de sustancias químicas de interés y biocombustibles (Wang *et al.*, 2017). Existen pocos reportes donde se explore la manipulación de cofactores de *S. stipitis* mediante la inhibición de la cadena transportadora de electrones, esto pudiera ser una alternativa para promover la fermentación. Destaca lo reportado por Lighthelm *et al.* (1988) donde el crecimiento y producción de etanol de *S. stipitis* y *Pachysolen tannophilus* se incrementaron o inhibieron dependiendo del tipo de inhibidor respiratorio usado: rotenona, antimicina A, cianuro de potasio o azida de sodio, en tanto que usando *S. cerevisiae* no se tuvieron efectos significativos. Otra estrategia fue la de suprimir el gen responsable de la síntesis del complejo de oxidación alterno sensible al ácido salicilhidroxámico (SHAM) (PsSTOI). Shi *et al.*,

(2002) emplearon esta mutante para obtener un 20% más de etanol a partir de la xilosa en comparación con la cepa parental. Recientemente, se encontró que la inhibición del complejo I de la cadena transportadora mediante rotenona en *S. stipitis* bajo suministro limitado de oxígeno incrementó en 18% en el rendimiento de etanol (Acevedo et al., 2017).

#### **1.1.5.1 Antimicina A**

La antimicina a (AA) pertenece a un grupo de metabolitos secundarios producidos por las bacterias del género *Streptomyces* (Neft y Farley, 1972). El mecanismo de acción de la molécula se da mediante la inhibición de la transferencia de electrones del ubiquinol; o citocromo c oxidoreductasa (Complejo bc<sub>1</sub>) en la mayoría de los organismos fotosintéticos y respiratorios (Nicholls y Ferguson, 2013). Dada su alta especificidad y afinidad, la AA se ha usado ampliamente en el estudio de enzimas y sus funciones (Kim et al., 1999). Wang et al. (2015) emplearon AA en un medio para inhibir la fosforilación oxidativa en *Aspergillus niger* con el fin de evaluar la velocidad de germinación de las esporas, el crecimiento y la producción de ácido cítrico. Comercialmente, se ha usado ampliamente como mecanismo de control de peces y en acuicultura (Rieske, 1967).

#### **1.1.6 La oxidasa alterna en hongos**

La oxidasa alterna es un complejo que actúa de manera paralela al bc<sub>1</sub> en la oxidación del ubiquinol y también cataliza la reducción de cuatro electrones del oxígeno molecular al agua (Joseph-Horne et al., 2001). Se cree que esta ruta alterna usualmente esta desacoplada de la síntesis de ATP permitiendo que los electrones se muevan rápidamente por esta ruta y la energía proveniente del NADH se libere como calor en lugar de conservarse en los enlaces de ATP (Wayne, 2010). El transporte de electrones a través de la oxidasa alterna puede ser explicado como un corto circuito, ya que se da solo cuando la fosa de ubiquinona esta como completamente reducida por lo que solo se activa a una alta concentración de piruvato lo cual es una señal de un exceso de metabolitos (Heldt y Piechulla, 2011).

Por otro lado, si bien se sabe que existen similitudes estructurales entre las oxidasas alternas de plantas y hongos, existen diferencias en relación a regulación y función, ya que la actividad de la oxidasa alterna en hongos no se influenciada por la concentración de piruvato (Röhr y Stahl, 2003). Por lo cual, el conocimiento que se tiene acerca de la función de la oxidasa alterna en hongos y levaduras es poco y confuso.

#### **1.1.7 Papel de los complejos de oxidación alterna (COA)**

El cianuro (CN) es una sustancia que actúa como inhibidor de la respiración de muchos organismos, sin embargo, algunos organismos tales como hongos, bacterias, levaduras, plantas superiores y algunos protozoos son resistentes al CN y continúan respirando incluso en altas concentraciones del mismo (Ogura *et al.*, 1985). Estos organismos poseen una cadena transportadora de electrones ramificada que incluye complejos de oxidación alternativos (COA) adicionales a los encontrados en la cadena respiratoria de los animales (Joseph-Horne *et al.*, 2001). Estos COA están ubicados en el sitio de entrada de Sitio I y el Sitio IV de la cadena respiratoria. En particular, *S. stipitis* cuenta con un COA que es sensible al ácido salicilhidroxámico (SHAM) sumado al complejo citocromo *c* oxidasa (Cox) (Vanlerberghe y McIntosh, 1997). Hay pocos estudios sobre su estructura y papel fisiológico en levaduras y hongos, pero se sabe que estructuralmente, la ruta donde participa el COA se ramifica desde el citocromo al nivel de la ubiquinona justo antes del citocromo *b*, donde son donados al COA, reduciendo el oxígeno a agua (Shi *et al.*, 2002) (Figura 3).

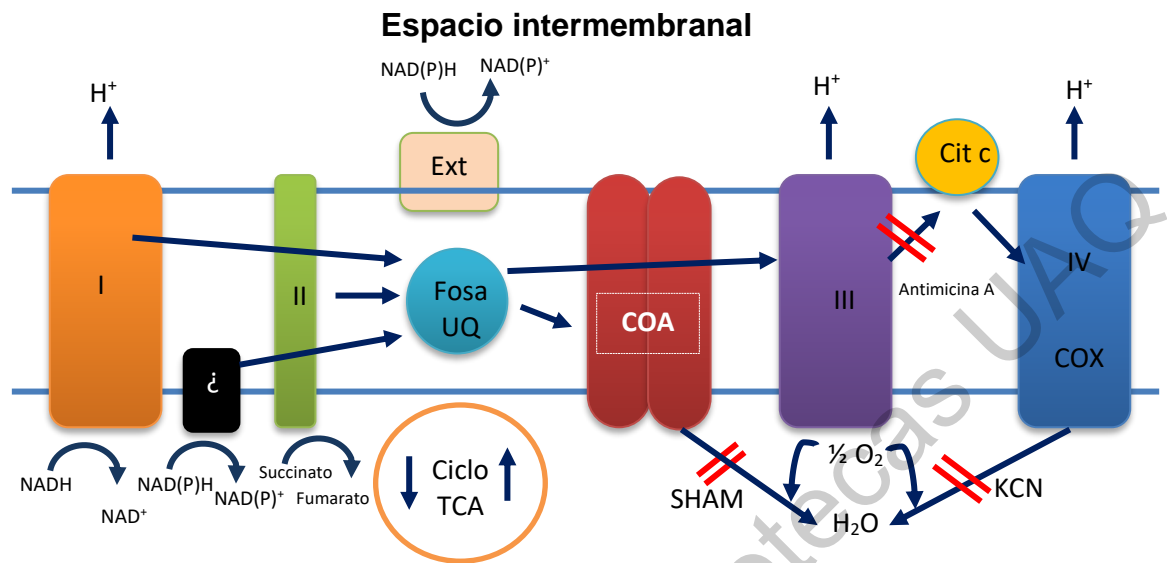


Figura 3. Esquema de los complejos mitocondriales y el transporte de electrones: Complejo I, NADH deshidrogenasa, Complejo II succinato deshidrogenasa, Complejo III, citocromo bc<sub>1</sub>, Complejo IV, citocromo oxidasa (COX), Complejos de oxidación alternos (COA), UQ ubiquinona, Ext. NADH deshidrogenasas externas, deshidrogenasas internas, SHAM, ácido salicilhidroxámico, TCA, ácido tricarbóxico.

*S. stipitis* es una levadura del topo Crabtree-negativa y cuenta con el complejo citocromo c y el COA en su mitocondria (Shi *et al.*, 2000), pero el rol fisiológico del COA en el metabolismo de la xilosa no ha sido dilucidado. En lo reportado por la literatura, Jeppsson *et al.* (1995) encontraron que el metabolismo respiratorio sensible a SHAM se activa en el metabolismo de la xilosa, mientras que Shi *et al.*, (2002) encontraron que *S. stipitis* cuenta con una intrincada estructura entre los complejos I y II, lo cual refleja la complejidad del metabolismo respiratorio en las levaduras Crabtree-negativas y en los hongos. En experimentos recientes, se estudió el efecto de la inhibición de los COA empleando SHAM en combinación con KCN y azida de sodio para inhibir la citocromo oxidasa. En todos los casos hubo una disminución del 25 % (SHAM) al 50 % (KCN y azida de sodio) del rendimiento de etanol (Acevedo *et al.*, 2017).

## 2.0 Justificación

Las preocupaciones por el incremento de los gases de efecto invernadero, así como la incertidumbre que guardan los precios del petróleo han incentivado el desarrollo de fuentes alternativas de energía. La biomasa lignocelulósica, que comprende pastos, maderas, residuos agroindustriales y municipales, entre otros, ha adquirido gran relevancia frente a las fuentes convencionales para producir etanol. Entre los componentes de la biomasa proveniente de los residuos agroindustriales, la xilosa destaca por ser el segundo azúcar fermentable más abundante en los hidrolizados. Esto conlleva un reto importante en la fermentación de los azúcares producto de la hidrólisis de la biomasa, ya que la levadura más comúnmente empleada para la producción de etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, no fermenta xilosa. Por lo cual, para desarrollar un proceso de conversión eficiente, es necesario contar con una levadura capaz de emplear glucosa y xilosa. *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus* son capaces de producir etanol a partir de xilosa. *S. stipitis* presenta rendimientos prometedores ( $\sim 50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y posee la capacidad para fermentar glucosa, manosa, galactosa, celobiosa y los oligómeros xilano y manano. Estas características, junto con menores requerimientos nutricionales y gran resistencia a inhibidores convierten a *S. stipitis* en una levadura con mucho potencial para ser empleada a nivel industrial.



### **3.0 Hipótesis**

El empleo de inhibidores de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria de *S. stipitis* NRRLY-7124 induce el crecimiento fermentativo al emplear azúcares característicos de los hidrolizados lignocelulósicos y puede ayudar a dilucidar el mecanismo por el cual se regula el metabolismo de éstos.

### **4.0 Objetivo general**

Estudiar el metabolismo energético *S. stipitis* NRRLY-7124 usando como fuente de carbono glucosa, xilosa y arabinosa, azúcares comúnmente presentes en los hidrolizados lignocelulósicos de residuos agroindustriales.

### **4.1 Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de la inhibición del complejo III sobre el crecimiento de *S. stipitis* en 3 fuentes de carbono distintas (glucosa, xilosa y arabinosa) con diferentes intensidades de agitación empleando Antimicina A.
- Cuantificar los metabolitos producto de la fermentación con *S. stipitis* en condiciones sin inhibición y con inhibición de la respiración.
- Evaluar el papel fisiológico del complejo de oxidación alterna en condiciones de inhibición del complejo III de *S. stipitis* empleando glucosa o xilosa como fuentes de carbono bajo diferentes intensidades de agitación.
- Cuantificar los metabolitos producto de la fermentación con *S. stipitis* en condiciones sin inhibición y con inhibición de la respiración.

## 5.0 Metodología

### 5.1 Cinéticas de crecimiento

Se empleó *S. stipitis* NRRLY-7124, propagada en placas de agar compuesto por (g·L<sup>-1</sup>): extracto de levadura, 10; peptona, 20; agar, 20 y glucosa, 20 a pH 5.0. El crecimiento de *S. stipitis* se evaluó en un medio con (g·L<sup>-1</sup>): extracto de levadura, 10; y peptona, 20; a pH 5.0. Se probaron tres fuentes de carbono: glucosa, xilosa y arabinosa. Se evaluaron tres concentraciones (0.5, 0.05 y 0.005 M) y tres regímenes de agitación (250 rpm, 150 rpm y sin agitación), incubando a 30 °C por 48 h en un lector Bioscreen C MBR midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm cada 30 min. Se empleó etanol (0.1 % y 1.0 %) como control respiratorio. Se estimaron las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempos de duplicación ( $t_d$ ) para cada uno de los tratamientos empleando la siguiente fórmula:

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

Donde  $X_0$  es la población inicial de células,  $X_f$  es la población final,  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento y  $t$  es el tiempo (h). Para el cálculo de los tiempos de duplicación, se empleó la siguiente ecuación:

$$dt = \ln 2 / \mu \quad (2)$$

### 5.2 Cinéticas empleando un inhibidor de la respiración

Se empleó antimicina A para inhibir el complejo III de la mitocondria de la *S. stipitis* (Nicholls and Ferguson, 2013). Estos ensayos se llevaron en placas de 99 pozos donde se emplearon 139  $\mu$ L de medio YP (variando la concentración y tipo de fuente de carbono, previamente mencionadas) y usando etanol como control de la respiración (0.1 y 1.0 % v/v). Los pozos se inocularon con 5  $\mu$ L de pre-inoculo de *S. stipitis* crecida en medio YPD por 12 h a 30 °C y 200 rpm de agitación, añadiendo 6  $\mu$ L de Antimicina A (AA) 0.2 mM al tiempo 0. Se tomaron lecturas de la densidad óptica a 600 nm cada 30 minutos por 48 h probando los tres regímenes de agitación previamente mencionados.

### **5.3 Cuantificación de variables bioenergéticas**

A partir de los resultados observados en las cinéticas de crecimiento y el efecto de la inhibición de la respiración por la AA en *S. stipitis*, se midió la respiración mitocondrial *in situ* y la tasa de acidificación extracelular. Para seleccionar los tratamientos, se tomó como criterio para discriminar los tratamientos, la velocidad específica de crecimiento de *S. stipitis* usando 1% de etanol como fuente de carbono, AA (0.2 mM) y 250 rpm ya que bajo esta condición se asumió que el etanol sería una fuente de carbono netamente respirable.

#### **5.3.1 Cuantificación de la respiración mitocondrial *in situ***

La respiración mitocondrial *in situ* se midió de acuerdo a lo reportado por (Madrigal-Perez *et al.*, 2016). El consumo de oxígeno se midió polarográficamente a 28 °C empleando un detector tipo Clark (YSI, modelo 5300, Yellow Spring, OH, USA). Los ensayos se llevaron a cabo empleando 125 mg de células cosechadas en la fase media del crecimiento exponencial ( $OD_{600} \sim 0.6$ ). Las células fueron re suspendidas en 5 mL de amortiguador ácido 4-morfolinetanosulfoxido (MES-TEA, Sigma-Aldrich), ajustado a pH 6 con trietanolamina (Sigma-Aldrich) en una cámara cerrada con agitación constante. Se midió la respiración basal mediante la adición de un sustrato oxidable, el cual en este caso fue glucosa o xilosa, ambos a una concentración final de 0.5 o 0.05 M, monitoreando el consumo de oxígeno por 3 minutos. La máxima capacidad respiratoria se midió mediante la adición de 10  $\mu$ M del agente desacoplante cianuro 3- clorofenil hidrazona (CCCP). El consumo de oxígeno no mitocondrial se diferenció cuando se añadió 10  $\mu$ M de AA al final de cada determinación. El consumo de oxígeno se expresó en nano átomos de oxígeno·min<sup>-1</sup>·mg células<sup>-1</sup>.

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

El ECAR se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por (Olivares-Marin *et al.*, 2018) seleccionando los tratamientos donde la  $\mu$  fuera más alta que la línea base resultante en el tratamiento de *S. stipitis* crecida en etanol al 1 % v/v con AA y 250

rpm. Se comenzó con 50 mL de medio empleando glucosa o xilosa como fuente de carbono probando 0.5 o 0.05 M, suplementado con 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de peptona, los cuales fueron inoculados con 1.8 mL de *S. stipitis* crecida por 12 h a 30 °C y 200 rpm en medio YPD al 2%. Los tratamientos seleccionados para esta prueba fueron (Cuadro 3):

Cuadro 3. Tratamientos para flujo glucolítico mediante ECAR.

<b>Fuente de carbono</b>	<b>Concentración</b>	<b>Agitación</b>
Glucosa	0.5	250
Glucosa	0.5	125
Glucosa	0.5	0
Glucosa	0.05	250
Glucosa	0.05	0
Xilosa	0.5	250
Xilosa	0.5	125
Xilosa	0.05	250
Xilosa	0.05	125

Se tomaron muestras cuando se alcanzó la media de la fase exponencial probando dos condiciones, sin AA y con 0.4 mL de AA 0.2 mM. Después de coleccionar las células, se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min y se lavaron 3 veces con 5 mL de agua destilada. Posteriormente, las células fueron suspendidas en agua destilada estéril para alcanzar una DO de 0.18. Para llevar a cabo la medición, se emplearon 25 mL de la suspensión de células (DO=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 añadió 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, la cual se reportó como la disminución del pH en mili unidades por min por mg de células.

### 5.3.3 Crecimiento y fermentación en matraz

Para llevar a cabo los experimentos en matraz se emplearon las condiciones experimentales previamente mencionadas en las cinéticas de crecimiento y los tratamientos mencionados en la medición de ECAR. Para el crecimiento y fermentación de *S. stipitis* en matraz sin AA, se emplearon 9.7 mL de medio inoculado con 0.3 mL de levadura activada (medio YPD al 2% a 30 °C y 200 rpm por 12 h) en matraces de 50 mL y se incubó por 48 h a 30 °C. Para los tratamientos con AA se emplearon 9.3 mL de medio, 0.4 mL de AA (0.2 mM) y 0.3 mL de inóculo y se creció a las mismas condiciones que los tratamientos sin AA. Para el caso de arabinosa, debido a que se observó una inhibición completa del crecimiento cuando se empleó AA, se descartó para esta prueba y solo se midió etanol sin el inhibidor. Se midió la biomasa gravimétricamente usando células previamente secadas a 60 °C por 24 h y azúcares consumidos por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Wood et al., 2012). Se midió etanol por cromatografía de líquidos empleando un HPLC Infinity (Agilent Tech, CA, USA) acoplado a un detector de índice de refracción, empleando una columna MetaCarb H plus (300x7.8 mm) (Agilent Tech) a 55 °C. Se empleó ácido sulfúrico 0.05 M como fase móvil a un flujo de 0.35 mL/min y un tiempo de corrida de 35 min. La temperatura del horno fue de 75 °C y la temperatura del detector fue de 55 °C con una inyección de muestra de 20 µL. El etanol y biomasa fueron reportados en g/L de medio.

### 5.4 Cinéticas de crecimiento empleando AA y SHAM en fuentes de carbono no fermentables

Para evaluar el papel que tiene el complejo de oxidación alterna en el crecimiento de *S. stipitis*, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento empleando un medio con (g·L<sup>-1</sup>): extracto de levadura, 10; y peptona, 20; con AA 0.2 mM a pH 5.0. Se probaron cuatro fuentes de carbono diferentes, etanol al 1 % (v/v), glicerol al 2 % (v/v), xilitol al 2 % (p/v) y glucosa al 0.5 M y 3 concentraciones de SHAM; 0.01, 0.1 y 0.5 M en placas de 96 pozos a un volumen final de 150 µL. Para este experimento solo se probaron dos condiciones de agitación, 250 rpm y 0 rpm, incubando a 30 °C

por 48 h en un agitador orbital midiendo la DO a 600 nm a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 h. Posteriormente, se estimaron las  $\mu$  para cada tratamiento siguiendo las formulas previamente mencionadas.

### **5.5 Cinéticas de crecimiento empleando AA y SHAM en fuentes de carbono fermentables**

Para evaluar el papel que tiene el complejo de oxidación alterna en el crecimiento de *S. stipitis* empleando fuentes de carbono fermentables, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento empleando un medio con ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): extracto de levadura, 10; y peptona, 20; con AA 0.2 mM a pH 5.0. Se probaron dos fuentes de carbono diferentes, glucosa (0.5 y 0.05 M) y xilosa (0.5 y 0.05 M) y glicerol al 2% (v/v) como control respiratorio. Al momento de la inoculación se añadió AA al 0.2 mM y SHAM 0.1 M. Para este experimento solo se probaron dos condiciones de agitación, 250 rpm y 0 rpm, incubando a 30 °C por 48 h en un agitador orbital midiendo la DO a 600 nm a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 h. Posteriormente, se estimaron las  $\mu$  para cada tratamiento siguiendo las formulas previamente mencionadas.

### **5.6 Cuantificación de variables bioenergéticas empleando dos inhibidores**

De acuerdo a los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento y las  $\mu$  obtenidas, se seleccionaron los siguientes tratamientos para llevar a cabo la cuantificación de las variables bioenergéticas (Cuadro 4):

Cuadro 4. Tratamientos seleccionados para medición de variables bioenergéticas.

Tratamiento	Fuente de carbono	Concentración de la fuente de carbono (Moles)	Agitación (rpm)	Inhibidor empleado
1	Glucosa	0.5	250	SHAM, AA
2	Glucosa	0.05	250	SHAM, AA
3	Glucosa	0.5	0	SHAM, AA
4	Glucosa	0.05	0	SHAM, AA
5	Xilosa	0.5	250	SHAM, AA
6	Xilosa	0.05	250	SHAM, AA
7	Xilosa	0.5	0	SHAM
8	Xilosa	0.05	0	SHAM

#### 5.6.1 Cuantificación de la respiración mitocondrial *in situ* empleando SHAM y AA

La respiración mitocondrial *in situ* se midió de acuerdo a lo reportado por (Madrigal-Perez *et al.*, 2016). Se siguió la metodología previamente descrita empleando AA y SHAM como inhibidores en los tratamientos descritos anteriormente. Los tratamientos fueron los mencionados en el Cuadro 3.

#### 5.6.2 Cuantificación del flujo glucolítico a través de ECAR empleando SHAM y AA

La cuantificación de ECAR se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por (Olivares-Marin *et al.*, 2018) en los tratamientos mencionados en el Cuadro 4.

#### 5.6.3 Cuantificación del potencial de membrana *in situ* empleando SHAM y AA

Un medidor importante de la fosforilación oxidativa es el potencial de membrana mitocondrial (Ramos-Gomez *et al.*, 2017), por lo cual esta medición podría

proporcionar información valiosa para entender el efecto que tiene la inhibición de la CTE a través de la AA y el efecto que pudiera tener la inhibición del COA de *S. stipitis*. Por lo cual, se determinó el potencial de membrana siguiendo la metodología reportada por Ramos-Gomez *et al.* (2017). Para la determinación, se cultivaron células de *S. stipitis* siguiendo los tratamientos mencionados en el Cuadro 4 y se cosecharon las células en la fase media exponencial (mid-log) mediante centrifugación a 5000 x g por 5 min a 28 °C. Posteriormente, se suspendieron en 2 mL de solución amortiguadora de ácido cítrico – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ajustando el pH a 7 añadiendo 100 nM de DiSC<sub>3</sub>, 20 mM de glucosa y 200 μM de CaCl<sub>2</sub>. Después, las células se transfirieron a una placa negra de 96 pozos a una densidad de 3 x 10<sup>6</sup> células/pozo. Se midió la señal de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 572 nm y a una emisión de 582 nm en un lector de microplaca (Varioskan flash, Thermo-Scientific). Se midió la señal de fondo por 50 s y posteriormente se añadió CCCP para alcanzar una concentración final de 10 μM en cada pozo y se incubó en oscuridad a 28 °C por 30 min con agitación constante.

#### **5.6.4 Crecimiento y fermentación en matraz empleando SHAM y AA**

Para evaluar el efecto de la inhibición de la respiración y la inhibición de COA se llevaron a cabo crecimientos en matraz de los tratamientos mencionados en el Cuadro 4. Para ello se siguieron las condiciones mencionadas anteriormente, se emplearon 9.7 mL de medio inoculado con 0.3 mL de levadura activada (medio YPD al 2% a 30 °C y 200 rpm por 12 h) en matraces de 50 mL y se incubaron por 48 h a 30 °C, estos tratamientos se denominaron controles. Para los tratamientos con SHAM y SHAM + AA se emplearon 9 mL de medio, 0.3 mL de SHAM (0.1 M), 0.4 mL de AA (0.2 mM) y 0.3 mL de inóculo, empleando las mismas condiciones de crecimiento que en los controles. Se midieron los azúcares consumidos y la biomasa, etanol, glicerol y xilitol producidos siguiendo las metodologías previamente mencionadas.



### **5.8 Análisis estadístico**

Todos los resultados están representados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SE). Se hicieron análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones de medias por el método de Tukey para la velocidad específica de crecimiento, capacidad respiratoria basal y máxima, flujo glucolítico por ECAR y los rendimientos de biomasa y etanol. El análisis estadístico se efectuó usando el programa GraphPad Prism v.5 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA).

## 6.0 Resultados y discusión

La AA se empleó inicialmente para discriminar el uso de la cadena transportadora de electrones (CTE) en el metabolismo de la xilosa. Se empleó glucosa como control porque bajo una condición sin agitación se induce un metabolismo completamente respiratorio en *S. stipitis*, mientras que en agitación, se da un metabolismo respiratorio. Dado que el etanol es únicamente metabolizado mediante respiración mitocondrial, se empleó como control positivo del crecimiento respiratorio, por lo cual, se probaron 3 condiciones de agitación, 0, 125 y 250 rpm. Como se esperaba, en los tratamientos sin AA y a 250 rpm, *S. stipitis* fue capaz de crecer en etanol (Figura 4a), pero fue incapaz de crecer cuando el medio fue suplementado con AA (Figura 4b). Esto confirma que la AA es capaz de inhibir el crecimiento respiratorio en *S. stipitis*, por lo tanto, la  $\mu$  obtenida de este tratamiento ( $0.011 \text{ h}^{-1}$ ) se empleó como referencia para discriminar el crecimiento a través del metabolismo respiratorio. En relación a la glucosa como fuente de carbono, *S. stipitis* creció en las 3 condiciones de agitación probadas sin AA, 250 rpm (Figura 4c), 125 rpm (Figura suplementaria 1S) y 0 rpm (Fig. s 2S). En los tratamientos donde se empleó AA, el crecimiento disminuyó en todas las condiciones de agitación (250 rpm, Figura 4d, d, f, h, 125 rpm, Fig. Sup. 3S, 0 rpm, Fig. Sup. 4S), pero no se observó inhibición en el crecimiento. Es necesario destacar que *S. stipitis* mostró escaso crecimiento en los tratamientos en donde se añadió AA (Figura 4f) en comparación con los tratamientos sin AA (Figura 4e) a 250 rpm, observando el mismo patrón a 125 y 0 rpm (Fig. sup. 5S y 6S) comparado con la condición con AA (Fig. sup. 7S y 8S). Estos datos sugieren que *S. stipitis* necesita una CTE funcional para crecer empleando xilosa, mientras que con arabinosa, la levadura fue incapaz de crecer cuando se inhibió la CTE (Figura 4h) comparado con los tratamientos sin AA (Figura 4g) a 250 rpm. Cuando disminuía la agitación, el crecimiento de *S. stipitis* decayó significativamente ( $p < 0.05$ ), reduciéndose incluso en una condición de baja velocidad de agitación (Fig. sup. 9S y 10S).

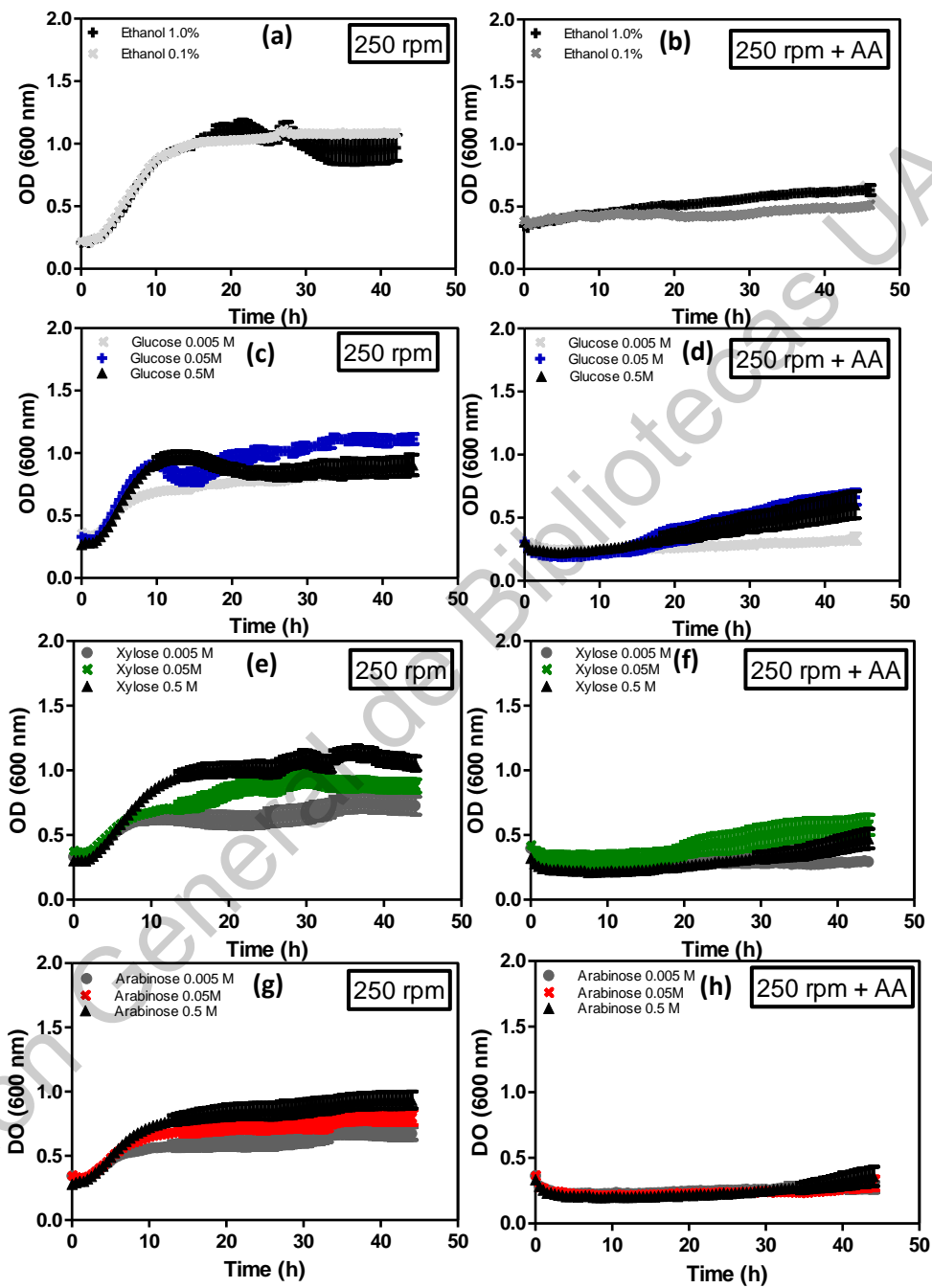


Figura 4. Cinéticas de crecimiento de *S. stipitis* a 250 rpm a 30 °C por 48 h con etanol (a), etanol con AA (b), glucosa (c), glucosa con AA (d), xilosa (e), xilosa con AA (f), arabinosa (g) y arabinosa con AA (h). Los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas.

En una condición de inhibición de la CTE, el crecimiento fue totalmente inhibido (Fig. sup. 11S y 12S), por lo cual, estos datos sugieren que *S. stipitis* necesita una CTE completamente funcional para metabolizar la arabinosa. El efecto de la inhibición de la respiración en la velocidad específica de crecimiento empleando glucosa como fuente de carbono se muestra en la Figura 5a. Se puede observar que en los tratamientos donde la CTE, las tasas de crecimiento fueron más bajas comparadas con los tratamientos donde no se empleó el inhibidor, especialmente a 0.005 M de glucosa, donde se inhibió totalmente el crecimiento. Adicionalmente, se observó que *S. stipitis* fue capaz de crecer en altas concentraciones de glucosa. Se ha reportado que en *Kluyveromyces lactis*, al añadir 5  $\mu\text{M}$  de AA, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.15 h (Merico *et al.*, 2009), mucho más alta que los valores observados en este estudio, empleando 0.11 M de glucosa y una condición limitada de oxígeno. Por otro lado, la inhibición de la CTE de *S. stipitis* empleando xilosa como fuente de carbono, mostró tener un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la velocidad específica de crecimiento en todos los tratamientos (Figura 5a) con valores de  $\mu$  por debajo de  $0.05 \text{ h}^{-1}$ . El análisis de arabinosa se hizo debido a que es el segundo azúcar de cinco carbonos mayoritario presente en los hidrolizados de la biomasa lignocelulósica (Subtil y Boles, 2011). En los tratamientos donde se empleó esta fuente de carbono, se observó una inhibición total en todas las condiciones probadas (Figura 7a). Por lo cual, los datos indican que la arabinosa es una fuente de carbono completamente respirable, confirmado por experimentos adicionales donde la levadura fue incapaz de crecer incluso sin la inhibición de la CTE en una condición de nula agitación. Esto indica que, adicional a requerir una CTE funcional, *S. stipitis* muestra una alta dependencia de oxígeno para metabolizar este azúcar (Figura 7b).

### **6.1 Efecto de la inhibición de la respiración mediante AA en la respiración mitocondrial**

Para corroborar el empleo de la CTE en *S. stipitis* durante el metabolismo de la xilosa, se midió la respiración mitocondrial *in situ* de la levadura.

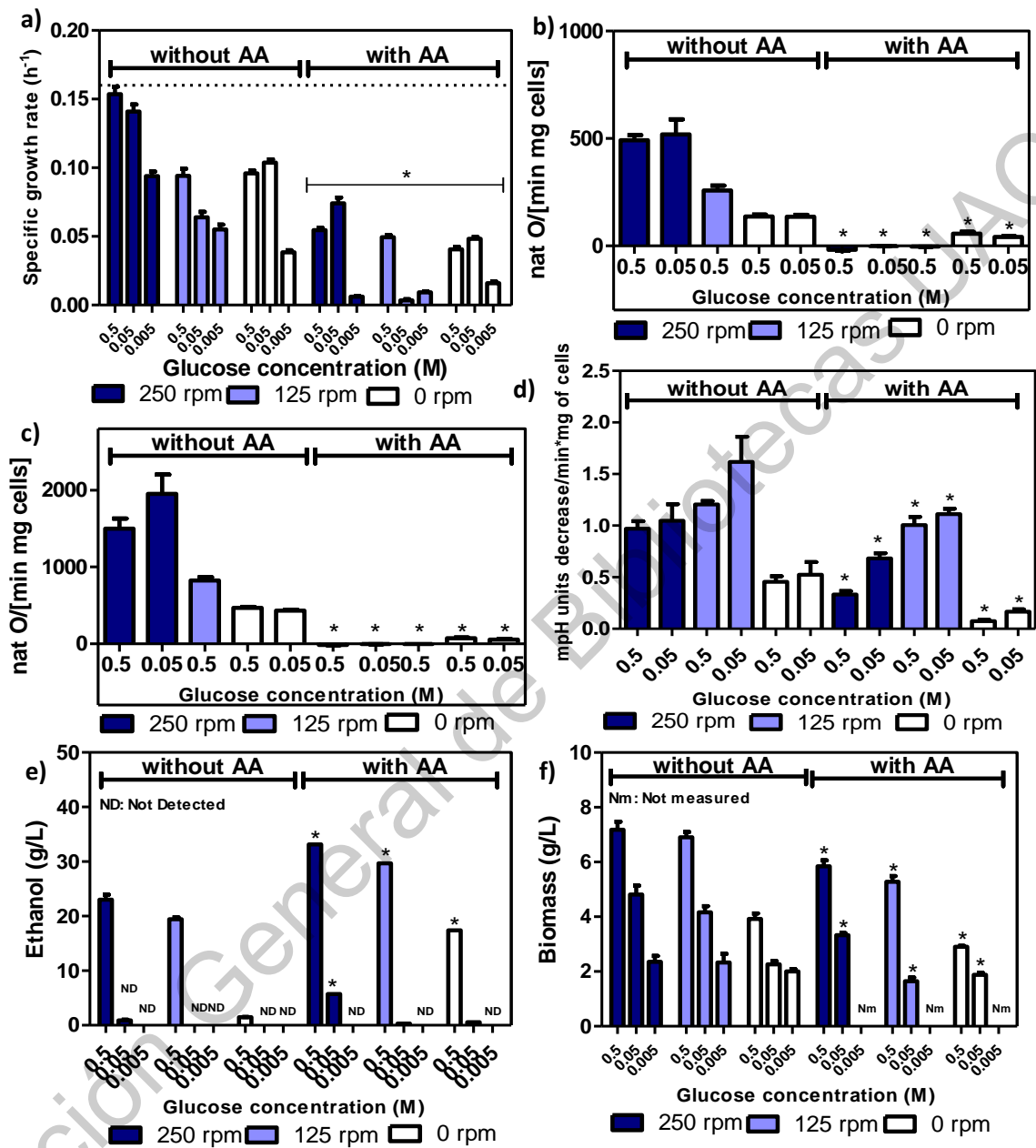


Figura 5. Efecto de la AA en el metabolismo energético de *S. stipitis* usando glucosa como fuente de carbono. a) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) a 250, 125 y 0 rpm y 30 °C por 48 h con y sin AA; los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas. b) Comparación de respiración mitocondrial basal *in situ* en cultivos a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes. c) Comparación de respiración mitocondrial máxima *in situ* en cultivos a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes. d) Comparación del flujo glucolítico por ECAR de cultivos de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes. e) etanol y f) biomasa en cultivos en matraz agitado de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes.

En base a los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento, se descartaron los tratamientos donde se empleaba xilosa 0.005 M y 0 rpm. Como era de esperarse, la AA inhibió por completo la respiración basal (Figura 6b) y la capacidad máxima respiratoria (Figura 6c) de la levadura al emplear xilosa como fuente de carbono en las dos concentraciones probadas. También se corroboró que a 125 y 250 rpm sin AA se da un alto consumo de oxígeno durante el metabolismo de la xilosa, especialmente a bajas concentraciones. Estos datos corroboran que durante el metabolismo de la xilosa, el funcionamiento de la CTE es esencial para el crecimiento de *S. stipitis*. Adicionalmente, se decidió investigar el papel de la CTE en el metabolismo de la glucosa considerando que con la adición de la AA en condiciones sin agitación, tiene un efecto negativo sobre el crecimiento. Curiosamente, sin agitación y en presencia del inhibidor, las células continúan consumiendo oxígeno en las mediciones de respiración basal (Figura 5b) y respiración máxima (Figura 5c). Estos resultados explican la importancia de la CTE en el metabolismo de la glucosa por parte de *S. stipitis*.

## **6.2 Efecto de la inhibición de la CTE en flujo glucolítico de *S. stipitis***

Como resultado de las cinéticas de crecimiento y el efecto de la inhibición, se seleccionaron seis tratamientos para glucosa y cuatro para xilosa ya que los valores de  $\mu$  de estos tratamientos estuvieron por encima del límite del metabolismo respiratorio previamente establecido ( $0.011 \text{ h}^{-1}$ ). Como resultado de las mediciones, se observó que la inhibición de la respiración provocó una disminución del flujo glucolítico en glucosa (Figura 5d) y xilosa (Figura 6d). Sin embargo, *S. stipitis* es capaz de mantener el crecimiento en presencia de la glucosa o xilosa, lo cual puede ser explicado a través de la generación de ATP a nivel sustrato por la vía metabólica de la glucólisis, respaldada por los resultados observados en los ensayos de inhibición de la respiración mitocondrial y los ensayos de acidificación extracelular.

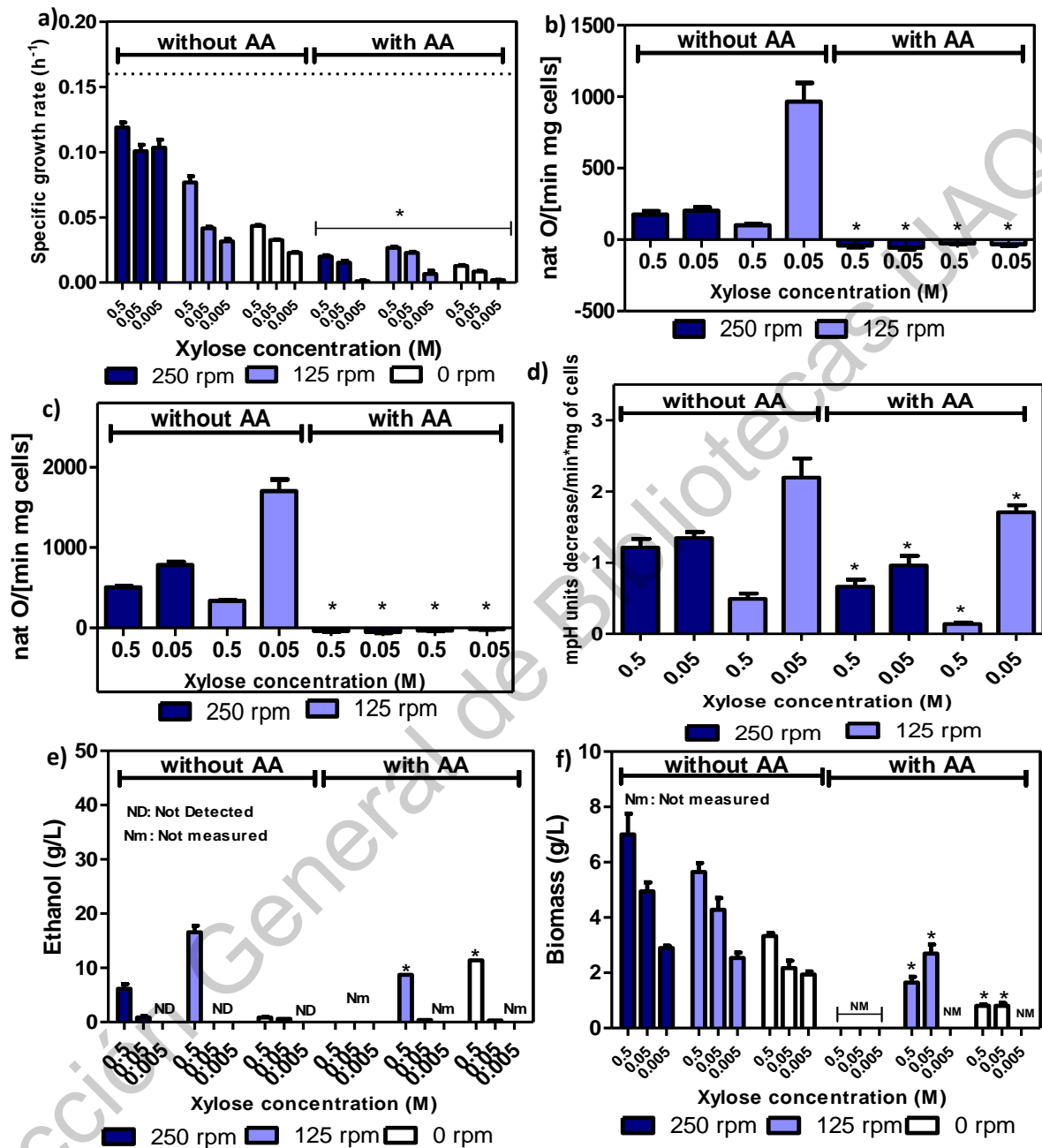


Figura 6. Efecto de la AA en el metabolismo energético de *S. stipitis* usando xilosa como fuente de carbono. a) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) a 250, 125 y 0 rpm y 30 °C por 48 h con y sin AA; los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas. b) Comparación de respiración mitocondrial basal *in situ* en cultivos a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes. c) Comparación de respiración mitocondrial máxima *in situ* en cultivos a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes. d) Comparación del flujo glucolítico por ECAR de cultivos de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de seis experimentos independientes. e) etanol y f) biomasa en cultivos en matraz agitado de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes.

Además, se observó que el flujo glucolítico en todos los tratamientos fue mayor en bajas concentraciones de la fuente de carbono. Esto puede ser explicado debido al sistema de transportadores de baja afinidad de *S. stipitis* es expresado en altas concentraciones de azúcares, mientras que el sistema de transportadores de alta afinidad, se expresa en condiciones de baja concentraciones de fuente de carbono (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008). Por lo tanto, un incremento de la expresión de los transportadores de alta afinidad podría contribuir a aumentar los rendimientos de etanol en altas concentraciones de glucosa, pero es necesario estudios posteriores para confirmar esto. Este patrón también se observó en los ensayos de acidificación extracelular incluso en condiciones donde la respiración mitocondrial fue inhibida.

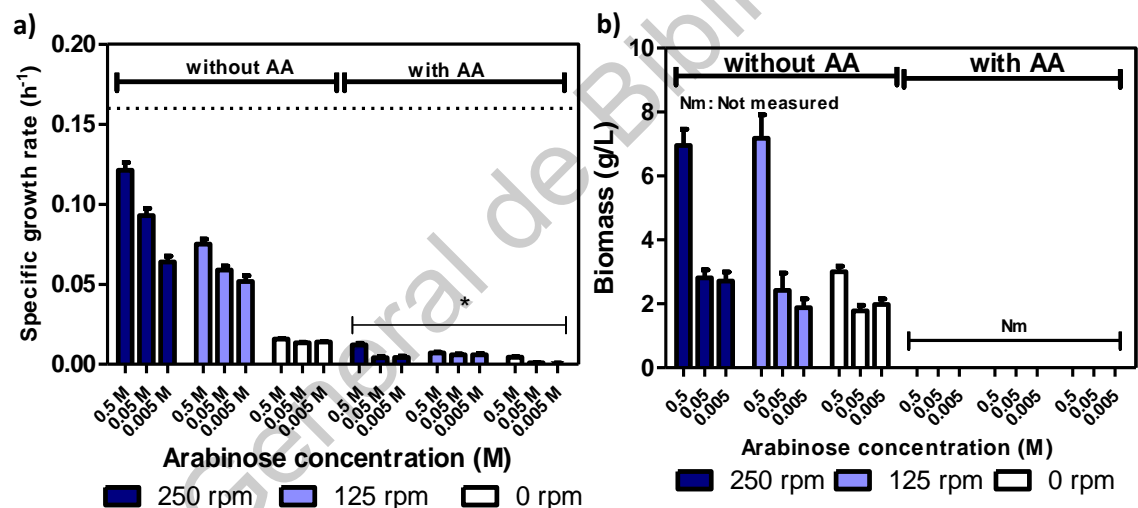


Figura 7. Efecto de la AA en el metabolismo energético de *S. stipitis* usando arabinosa como fuente de carbono. a) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) a 250, 125 y 0 rpm y 30 °C por 48 h con y sin AA; los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas. b) Rendimiento de biomasa en cultivos en matraz agitado de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes.

### 6.3 Crecimiento de *S. stipitis* en matraz

Para evaluar el efecto de la inhibición de la CTE en la producción de etanol y biomasa empleando xilosa o glucosa como fuentes de carbono, se llevaron a cabo fermentaciones en matraces agitados. La inhibición de la CTE tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la producción de etanol, incrementado su producción en tratamientos donde se empleó glucosa (Figura 5e). Bajo una concentración de 0.5



M de glucosa, la inhibición de la respiración incrementó el etanol de 10 a 16 g/L, dependiendo de la intensidad de agitación, mientras que a 0.05 M de glucosa el incremento pasó de 2 a 5.7 g/L, pero solo en condiciones de agitación alta. Mientras que la producción de biomasa se vio afectada significativamente ( $p < 0.05$ ) por la inhibición de la CTE en rangos de 0.4 a 2.5 g/L, en comparación a los tratamientos sin AA (Figura 5f). El crecimiento disminuyó de manera similar en ambas concentraciones (0.5 y 0.05 M). Cuando se usaron concentraciones de 0.5 M de xilosa, a diferencia de la glucosa, la producción de etanol disminuyó en casi 8 g/L a 125 rpm pero se incrementó a 11 g/L sin agitación (Figura 6e). Estos resultados son similares a lo reportado por (Acevedo et al., 2017), donde probaron diferentes inhibidores de la cadena respiratoria en *S. stipitis* empleando xilosa y condiciones limitadas de oxígeno. Donde observaron una disminución del rendimiento de etanol en rangos de 25 a 50 %, dependiendo del inhibidor empleado, en particular la inhibición del complejo I mediante rotenona se incrementó el rendimiento en 13%. Lee et al. (2000) reportaron que el empleo de rotenona en la fase exponencial incrementó la concentración de etanol en 10 %, mientras que para este trabajo, la producción de etanol se incrementó 4.4 veces más a 0.5 M de xilosa. Lighthelm et al. (1988) reportaron que la AA estimuló fuertemente la producción en *P. tannophilus* pero no en *S. stipitis*. En la producción de biomasa empleando xilosa, la inhibición de la CTE causó una disminución significativa en todos los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en los tratamientos sin agitación, se dio una producción de biomasa mínima (Figura 6f). El empleo de arabinosa se descartó debido a que los valores de  $\mu$  estuvieron por debajo del límite de metabolismo respiratorio establecido en un principio en condiciones de inhibición (Figura 7). En los tratamientos donde se empleó arabinosa sin AA, se observó una alta dependencia entre la producción de biomasa, la agitación y concentración de la fuente de carbono (Figura 7b). A pesar de que la levadura fue capaz de crecer, no se detectó etanol en ninguno de los tratamientos. Por lo cual, la arabinosa se puede considerar como una fuente no fermentable por *S. stipitis*, en línea con lo reportado por Shi et al. (2000). Adicionalmente, los resultados confirman que *S. stipitis* requiere de una CTE

funcional para metabolizar la xilosa y la arabinosa, mientras que este efecto no fue observado en presencia de glucosa. Acevedo *et al.* (2017) menciona que la inhibición de la respiración se pudiera considerar como una estrategia complementaria al control de la aireación para incrementar los rendimientos de etanol de *S. stipitis* empleando xilosa. Por lo cual, es necesario comprender los mecanismos que ocurren cuando se emplean diferentes inhibidores de la CTE, aunado al control del oxígeno. Como producto de este objetivo, se publicó un artículo que se muestra como parte del material suplementario.

#### **6.4 Efecto del SHAM sobre el crecimiento de *S. stipitis* en fuentes no fermentables**

Se estudió el efecto del SHAM sobre 3 fuentes de carbono no fermentables a través de cinéticas de crecimiento. Debido a que se desconocía la concentración a la que pudiera tener un efecto, se probaron 3 concentraciones, 0.01, 0.1 y 0.5 M y se comparó con las curvas de crecimiento sin inhibidores añadidos o en presencia de AA, los resultados se muestran en la Figura 8. Se observa que en etanol (Figura 8a), xilitol (Figura 8b) y glicerol (Figura 8d), se inhibió por completo el crecimiento en las tres concentraciones de SHAM probadas, a diferencia del tratamiento con glucosa 0.5 M, donde la condición con 0.5 M de SHAM y 0.2 mM de AA fue la única donde se inhibió el crecimiento, mientras que a 0.1 y 0.01 M de SHAM, *S. stipitis* fue capaz de crecer. Por lo tanto, para futuros experimentos, se decidió trabajar con 0.1 M de SHAM.

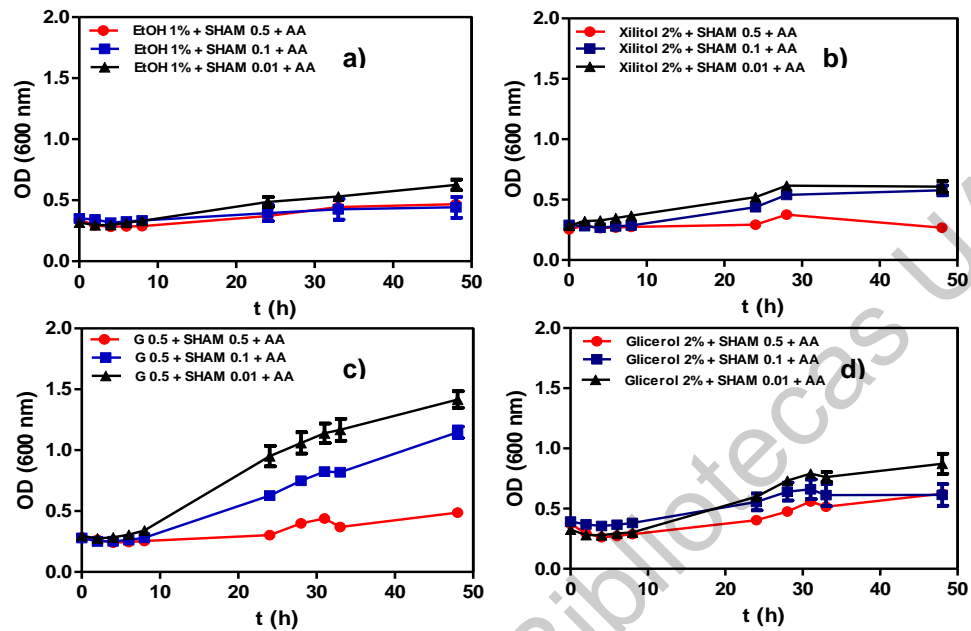


Figura 8. Cinéticas de crecimiento de *S. stipitis* a 250 rpm a 30 °C por 48 h probando un gradiente de concentración de SHAM al 0.01, 0.1 y 0.5 M y AA al 0.2 mM empleando a) etanol al 1% (v/v), b) xilitol al 2% (p/v), c) glucosa al 0.5 M y d) glicerol al 2% (p/v). Los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas.

### 6.5 Efecto del SHAM y la AA sobre el crecimiento y fermentación de *S. stipitis* en xilosa o glucosa

El SHAM se empleó para inhibir el complejo de oxidación alterna de *S. stipitis* en presencia de AA empleando xilosa como fuente de carbono y glucosa como fuente de carbono preferente a 250 rpm y sin agitación.

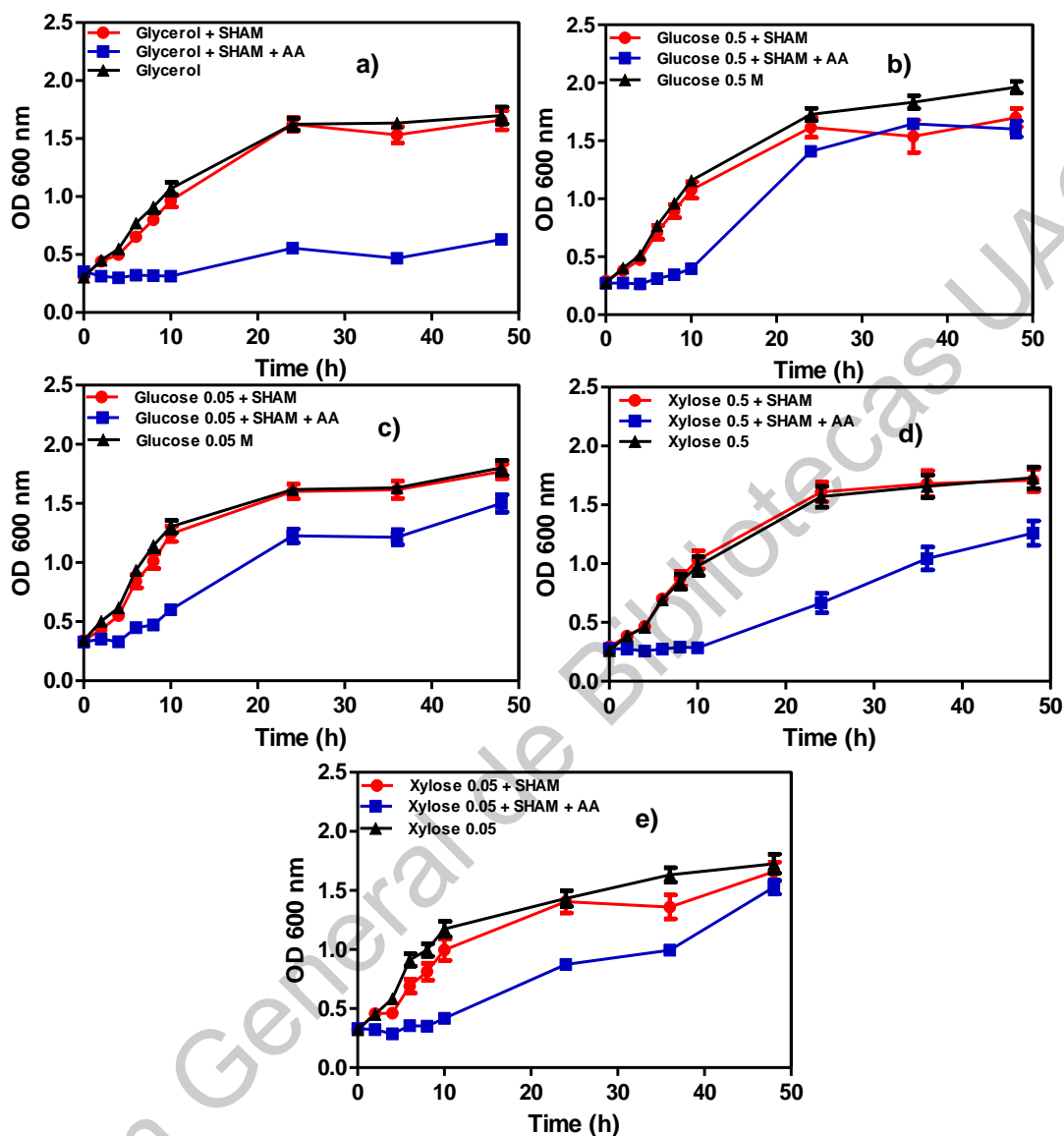


Figura 9. Cinéticas de crecimiento de *S. stipitis* a 250 rpm a 30 °C por 48 h empleando 0.2 mM de AA como inhibidor del complejo III y SHAM 0.1 M como inhibidor del COA, empleando como fuente de carbono a) glicerol, b) glucosa 0.5 M, c) glucosa 0.05 M, d) xilosa 0.5 M y e) xilosa 0.05 M. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas.

Para estos experimentos se empleó glicerol debido a que es un metabolito no fermentable. La Figura 9 muestra los resultados, se puede ver que en glicerol, se ve completamente inhibido el crecimiento en presencia de SHAM y AA, pero el crecimiento en el control y el tratamiento con SHAM no fue afectado (Figura 9a). A diferencia de los tratamientos con glucosa (Figura 9b y Figura 9c) y xilosa (Figura

9d y Figura 9e), donde en presencia de AA + SHAM se inhibió el crecimiento en las primeras 10 h, pero después la levadura alcanzó valores cercanos a los tratamientos sin inhibidores y con SHAM. Curiosamente, al igual que con el glicerol, el SHAM no afectó de manera significativa el crecimiento de *S. stipitis* en glucosa o xilosa. Este comportamiento puede ser explicado parcialmente por lo reportado por Vanlerberghe y McIntosh (1997), ya que la expresión del complejo de oxidación alterna es influenciado por estímulos de estrés tales como frío, estrés oxidativo, ataque de patógenos o por factores relacionados a una restricción en el flujo de electrones en la cadena respiratoria. En tanto que, para los experimentos donde no se empleó agitación, disminuyó el crecimiento en todos los tratamientos (Figura 10). En los tratamientos con glicerol (Figura 10a), las cinéticas fueron similares a la condición con agitación, presentando inhibición completa en presencia de SHAM y AA y un efecto nulo del SHAM. Pero se encontraron diferencias en los patrones de crecimiento entre glucosa y xilosa. Cuando se empleó glucosa (Figura 10b y Figura 10c) las curvas de crecimiento fueron muy similares en los tres tratamientos en ambas concentraciones, mientras que con xilosa si se inhibió el crecimiento casi por completo en 0.5 M y AA + SHAM (Figura 10d y Figura 10e). En general, se puede afirmar que la adición de SHAM en el medio no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de *S. stipitis* en glucosa o xilosa. A diferencia de los tratamientos donde se empleó AA y SHAM, donde se inhibió parcialmente el crecimiento. Estas diferencias se pueden observar de manera más clara mediante la comparación de los valores de  $\mu$ , mostrados en las Figura 11a y Figura 12a. Cuando se probó 0.5 M de glucosa como fuente de carbono, el crecimiento de *S. stipitis* pasó de 0.183 a 0.156 h<sup>-1</sup> con SHAM, cayendo hasta 0.081 h<sup>-1</sup> en presencia de SHAM + AA.

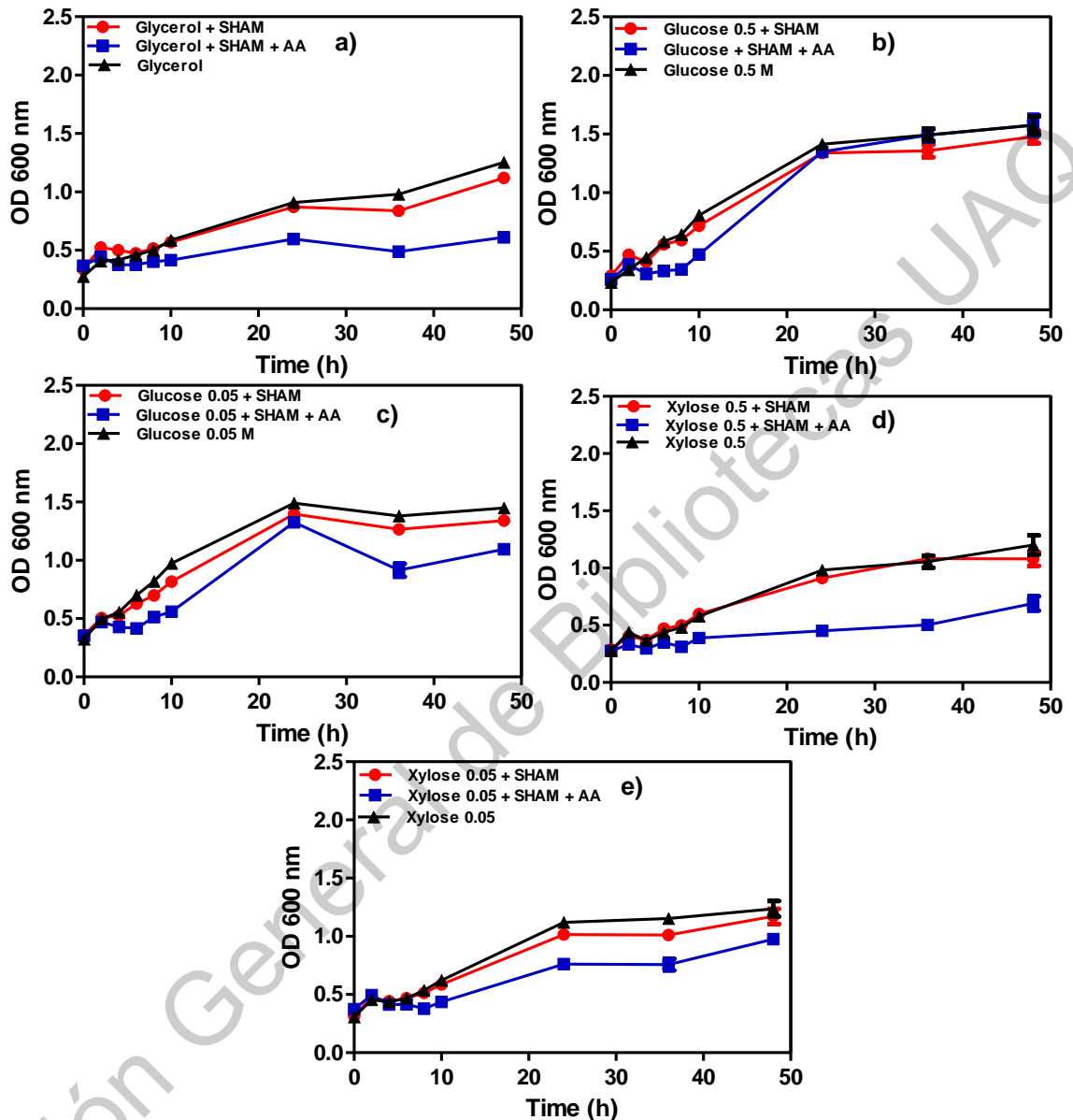


Figura 10. Cinéticas de crecimiento de *S. stipitis* sin agitación a 30 °C por 48 h empleando 0.2 mM de AA como inhibidor del complejo III y SHAM 0.1 M como inhibidor del COA, empleando como fuente de carbono a) glicerol, b) glucosa 0.5 M, c) glucosa 0.05 M, d) xilosa 0.5 M y e) xilosa 0.05 M. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas.

Este patrón de caída se repitió en glucosa 0.05 M, pasando de 0.16 y 0.152 a 0.067  $\text{h}^{-1}$  en los tratamientos control, SHAM y SHAM + AA en agitación. Mientras que sin agitación, la disminución del crecimiento no es tan drástica entre tratamientos, ya que disminuye de manera similar en ambas concentraciones.

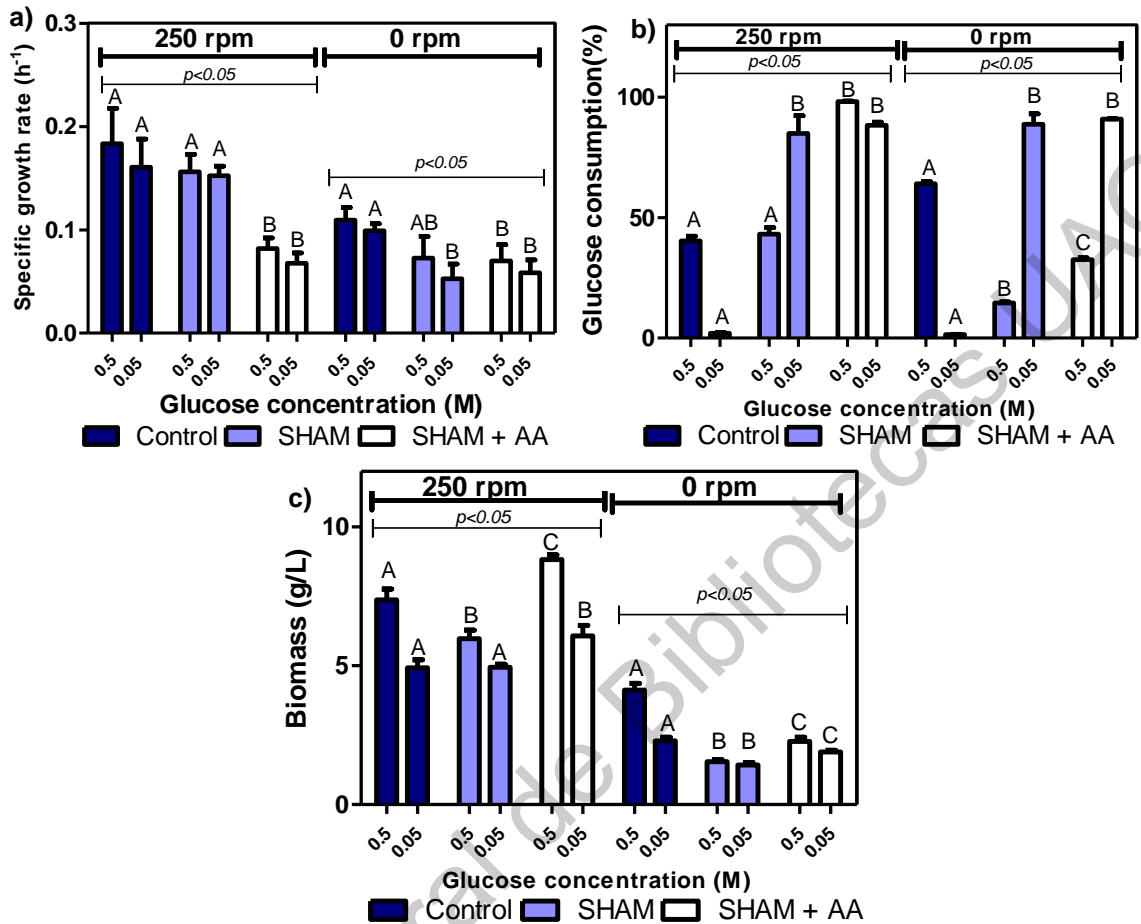


Figura 11. Efecto de la AA y el SHAM en el metabolismo energético de *S. stipitis* usando glucosa como fuente de carbono. a) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) a 250 y 0 rpm y 30 °C por 48 h sin inhibidores, con SHAM y con AA y SHAM; los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas. b) glucosa consumida (%) y c) biomasa en cultivos en matraz agitado de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h a 250 y 0 rpm y 30 °C por 48 h sin inhibidores, con SHAM y con AA y SHAM. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes.

Los valores de  $\mu$  obtenidos para xilosa 0.5 M se muestran en la Figura 12a, el crecimiento se ve afectado solo cuando se agrega SHAM y AA de manera conjunta a 250 rpm, pasando de 0.172 y 0.181  $h^{-1}$  para el control y para SHAM a 0.042  $h^{-1}$  con SHAM + AA. Cuando se usa xilosa 0.05 M, la disminución del crecimiento cuando se agrega SHAM + AA es mucho mayor, pasando de 0.132 y 0.14  $h^{-1}$  a 0.034  $h^{-1}$

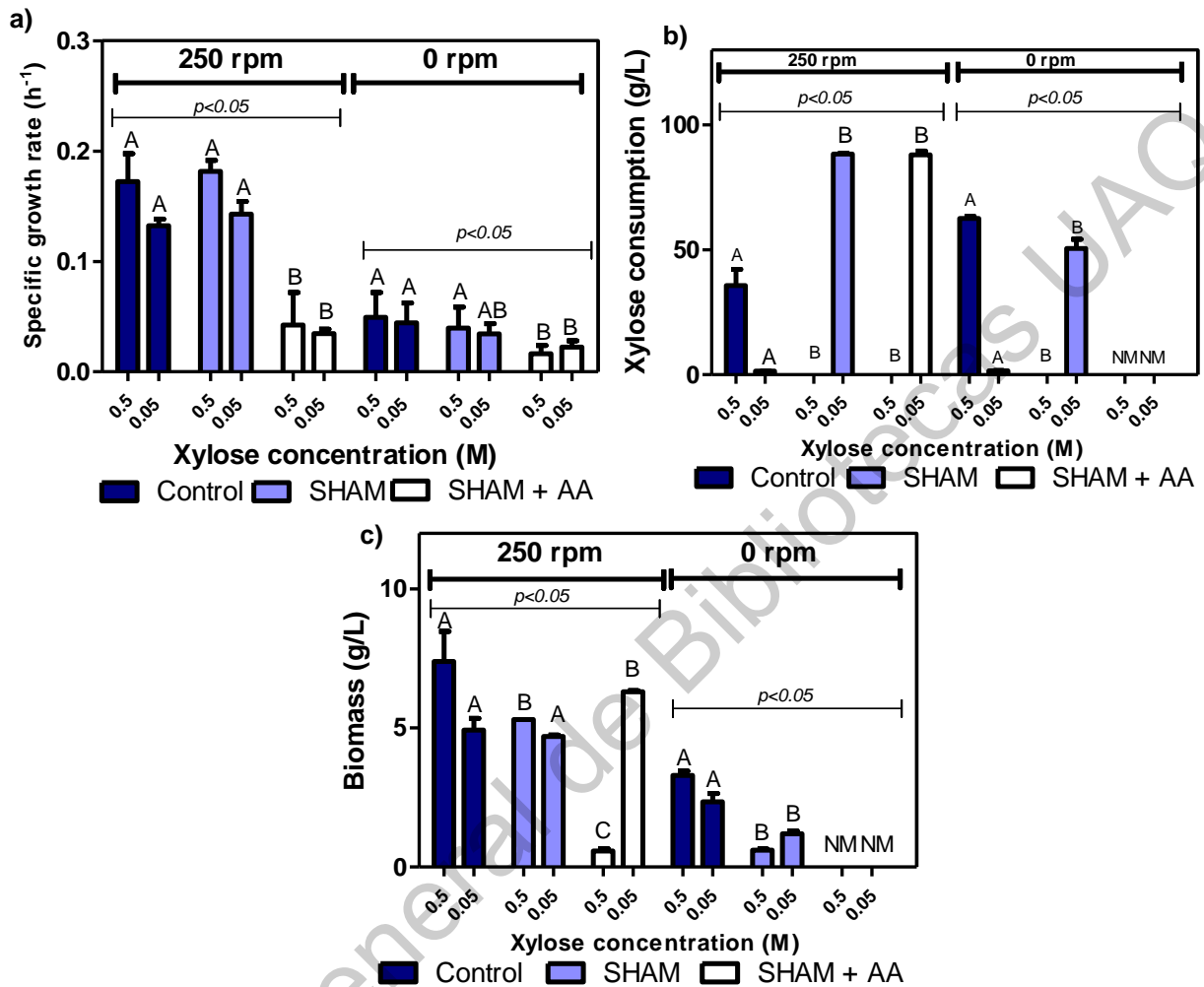


Figura 12. Efecto de la AA y el SHAM en el metabolismo energético de *S. stipitis* usando xilosa como fuente de carbono. a) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) a 250 y 0 rpm y 30 °C por 48 h sin inhibidores, con SHAM y con AA y SHAM; los resultados representan la media  $\pm$  SE de cinco replicas técnicas. b) glucosa consumida (%) y c) biomasa en cultivos en matraz agitado de *S. stipitis* a 30 °C por 48 h a 250 y 0 rpm y 30 °C por 48 h sin inhibidores, con SHAM y con AA y SHAM. Los resultados representan la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes.

En los tratamientos sin agitación, el crecimiento está por debajo de  $0.05 h^{-1}$  en todos los tratamientos, y no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos sin inhibidores y cuando se añadió SHAM. Pero al agregar SHAM + AA, el crecimiento pasó a  $0.02 h^{-1}$ .



## 6.6 Crecimiento y fermentación en matraz usando SHAM y AA

Para evaluar el efecto de la inhibición del complejo de oxidación alterna en la fermentación de *S. stipitis* en glucosa o xilosa, se llevaron a cabo experimentos en matraz. Cuando se probó la glucosa (Figura 11a) a 0.5 M no tuvo efecto la adición de SHAM, pero al combinarlo con AA, el consumo se incrementó pasando de 50 a poco más de 90%, mientras que en concentraciones bajas de glucosa, el SHAM si tuvo efecto, incrementando el consumo de glucosa en los tratamientos con SHAM y SHAM + AA. Mientras que sin agitación este mismo comportamiento se repitió, en ambas concentraciones, a excepción de 0.5 M, donde el SHAM disminuyó el consumo de glucosa de 70 % a un 30 %, pero en el tratamiento con SHAM + AA supero el 90 %. En cuanto a la producción de biomasa, si bien se observaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ), los rangos de producción estuvieron entre 5 y 10 g/L con glucosa 0.5 y 0.05 M (Figura 11c). Para los tratamientos con xilosa (Figura 12), el efecto fue inverso, ya que en xilosa 0.5 M a 250 rpm, el consumo se vio inhibido en los tratamientos con SHAM y SHAM + AA, mientras que con xilosa 0.05 M el consumo se promovió, por lo cual, hay una interacción entre la presencia de los inhibidores y la concentración de xilosa. Este patrón fue similar en los tratamientos sin agitación. En el caso de la biomasa producida (Figura 12c), en agitación estuvo en rangos de 5 a 10 g/L y no hubo diferencias entre el tratamiento con SHAM y SHAM + AA. Cuando no se agitaron los cultivos, se presentó diferencia entre los cultivos sin SHAM y con SHAM, pasando de 3.3 a menos 1 g/L. Shi *et al.* (2002) probó la cepa *sto1* -  $\Delta$  sin el complejo de oxidación alterno en dos fuentes de carbono, 84 g/L de xilosa o 94 g/L de glucosa, no encontrando diferencias entre la cepa mutante y la cepa parental, esto es similar a los resultados encontrados hasta ahora. En otros reportes se señala que la respiración sensible a SHAM está activa durante el metabolismo de xilosa y por lo tanto, contribuye a la respiración total de *S. stipitis* (Jeppsson *et al.*, 1995), por lo cual la supresión o inhibición de los componentes del complejo de oxidación alterna en *S. stipitis* deberían reducir la respiración y conducir a un incremento la producción de etanol (Shi *et al.*, 2002).

## 7.0 Conclusiones

La inhibición de la cadena transportadora de electrones con AA en *S. stipitis* tuvo efectos diferentes de acuerdo a la fuente de carbono:

- *S. stipitis* requiere de una cadena transportadora de electrones funcional para metabolizar la xilosa y arabinosa.
- La arabinosa es un sustrato no fermentable.
- La inhibición del complejo III de la cadena respiratoria de *S. stipitis* incrementó el rendimiento de etanol en concentraciones altas de glucosa.
- La inhibición del complejo III en *S. stipitis* dio resultados contrastantes cuando se empleó xilosa como fuente de carbono.
- La inhibición del complejo de oxidación alterna de *S. stipitis* no tuvo efecto sobre el crecimiento de *S. stipitis*, pero en combinación con inhibidores de la cadena transportadora se incrementó el consumo de la fuente de carbono.
- Es necesario llevar a cabo experimentos adicionales para medir el efecto de la inhibición del complejo de oxidación alterna sobre la producción de etanol, glicerol y xilitol.

## 8.0 Perspectivas

Es necesario explorar que otros efectos tiene la adición de los inhibidores de la cadena transportadora de electrones y la vía de oxidación alterna presentes en *S. stipitis*. Entre los experimentos que pueden llevarse a cabo son los siguientes:

- Estudiar el efecto de los inhibidores en el potencial de membrana en las células.
- Medir la posible generación de especies reactivas de oxígeno y su efecto en los parámetros de fermentación y crecimiento.
- Explorar el papel de la vía de oxidación alterna empleando arabinosa como fuente de carbono
- Explorar el efecto de la inhibición de otros complejos de la cadena transportadora sobre el crecimiento y fermentación.

## 9.0 Referencias bibliográficas

Acevedo, A., R. Conejeros, and G. Aroca. 2017. Ethanol production improvement driven by genome-scale metabolic modeling and sensitivity analysis in *Scheffersomyces stipitis*. PLoS ONE. 12. doi:10.1371/journal.pone.0180074. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5489217/>

Agbogbo, F. K., and G. Coward-Kelly. 2008. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. Biotechnol. Lett. 30:1515–1524. doi:10.1007/s10529-008-9728-z.

Agbogbo, F. K., and K. S. Wenger. 2006. Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. Biotechnol. Lett. 28:2065–2069. doi:10.1007/s10529-006-9192-6.

Bellido, C., S. Bolado, M. Coca, S. Lucas, G. González-Benito, and M. T. García-Cubero. 2011. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. Bioresour. Technol. 102:10868–10874. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.128.

Bhatia, L., S. Johri, and R. Ahmad. 2012. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. AMB Express. 2:65. doi:10.1186/2191-0855-2-65.

Cheng, J. J., and G. R. Timilsina. 2011. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. Renew. Energy. 36:3541–3549. doi:10.1016/j.renene.2011.04.031.

Fiaux, J., Z. P. Çakar, M. Sonderegger, K. Wüthrich, T. Szyperski, and U. Sauer. 2003. Metabolic-Flux Profiling of the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. Eukaryot. Cell. 2:170–180. doi:10.1128/EC.2.1.170-180.2003.

Hahn-Hägerdal, B., M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén, and G. Zacchi. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 24:549–556. doi:10.1016/j.tibtech.2006.10.004.

Heldt, H.-W., and B. Piechulla. 2011. 5 - Mitochondria are the power station of the cell. In: H.-W. Heldt and B. Piechulla, editors. *Plant Biochemistry (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego. p. 133–161. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849861000053>

Jeffries, T. W., I. V. Grigoriev, J. Grimwood, J. M. Laplaza, A. Aerts, A. Salamov, J. Schmutz, E. Lindquist, P. Dehal, H. Shapiro, Y.-S. Jin, V. Passoth, and P. M. Richardson. 2007. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat. Biotechnol.* 25:319–326. doi:10.1038/nbt1290.

Jeffries, T. W., and Y.-S. Jin. 2004. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:495–509. doi:10.1007/s00253-003-1450-0.

Jeppsson, H., N. J. Alexander, and B. Hahn-Hägerdal. 1995. Existence of Cyanide-Insensitive Respiration in the Yeast *Pichia stipitis* and Its Possible Influence on Product Formation during Xylose Utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2596–2600.

Joseph-Horne, T., D. W. Hollomon, and P. M. Wood. 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta.* 1504:179–195.

Karhumaa, K., B. Hahn-Hägerdal, and M.-F. Gorwa-Grauslund. 2005. Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. *Yeast Chichester Engl.* 22:359–368. doi:10.1002/yea.1216.

Kim, H., L. Esser, M. B. Hossain, D. Xia, C.-A. Yu, J. Rizo, D. van der Helm, and J. Deisenhofer. 1999. Structure of Antimycin A1, a Specific Electron Transfer Inhibitor of Ubiquinol–Cytochrome c Oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.* 121:4902–4903. doi:10.1021/ja990190h.

Klinner, U., S. Fluthgraf, S. Freese, and V. Passoth. 2005. Aerobic induction of respiro-fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:247–253. doi:10.1007/s00253-004-1746-8.

Kricka, W., J. Fitzpatrick, and U. Bond. 2015. Chapter Three - Challenges for the Production of Bioethanol from Biomass Using Recombinant Yeasts. In: S. S. and G. M. Gadd, editor. *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 92. Academic Press. p. 89–125. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216415000040>

Lee, S.-M., T. Jellison, and H. S. Alper. 2014. Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. *Biotechnol. Biofuels.* 7:122. doi:10.1186/s13068-014-0122-x.

Lee, T.-Y., M.-D. Kim, K.-Y. Kim, K. Park, Y.-W. Ryu, and J.-H. Seo. 2000. A parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5:27–31. doi:10.1007/BF02932349.

Li, P., H. Sun, Z. Chen, Y. Li, and T. Zhu. 2015. Construction of efficient xylose utilizing *Pichia pastoris* for industrial enzyme production. *Microb. Cell Factories.* 14:22. doi:10.1186/s12934-015-0206-8.

Lighthelm, M. E., B. A. Prior, and J. C. du Preez. The effect of respiratory inhibitors on the fermentative ability of *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* and

*Saccharomyces cerevisiae* under various conditions of aerobiosis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29:67–71. doi:10.1007/BF00258353.

Lynd, L. R., W. H. van Zyl, J. E. McBride, and M. Laser. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. Curr. Opin. Biotechnol. 16:577–583. doi:10.1016/j.copbio.2005.08.009.

Madrigal-Perez, L. A., M. Canizal-Garcia, J. C. González-Hernández, R. Reynoso-Camacho, G. M. Nava, and M. Ramos-Gomez. 2016. Energy-dependent effects of resveratrol in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 33:227–234. doi:10.1002/yea.3158.

Merico, A., S. Galafassi, J. Piškur, and C. Compagno. 2009. The oxygen level determines the fermentation pattern in *Kluyveromyces lactis*. FEMS Yeast Res. 9:749–756. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00528.x.

Moreira dos Santos, M., V. Raghevendran, P. Kötter, L. Olsson, and J. Nielsen. 2004. Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments. Metab. Eng. 6:352–363. doi:10.1016/j.ymben.2004.06.002.

Neft, N., and T. M. Farley. 1972. Conditions Influencing Antimycin Production by a *Streptomyces* Species Grown in Chemically Defined Medium. Antimicrob. Agents Chemother. 1:274–276.

Nevoigt, E. 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR. 72:379–412. doi:10.1128/MMBR.00025-07.

Nicholls, D. G., and S. J. Ferguson. 2013. 5 - Respiratory Chains. In: Bioenergetics (Fourth Edition). Academic Press, Boston. p. 91–157. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123884251000051>

Nogué, V. S., and K. Karhumaa. 2014. Xylose fermentation as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. *Biotechnol. Lett.* 37:761–772. doi:10.1007/s10529-014-1756-2.

Ogura, T., T. Irie, and I. Usuki. 1985. Respiratory inhibition by cyanide and salicylhydroxamic acid on the three species of *Paramecium* in stationary growth phase. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 80:167–171. doi:10.1016/0300-9629(85)90535-3.

Olivares-Marin, I. K., L. A. Madrigal-Perez, M. Canizal-García, B. E. García-Almendárez, J. C. González-Hernández, and C. Regalado-Gonzalez. 2018. Interactions between carbon and nitrogen sources depend on RIM15 and determine fermentative or respiratory growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi:10.1007/s00253-018-8951-3.

Papini, M., I. Nookaew, M. Uhlén, and J. Nielsen. 2012. *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Factories.* 11:136. doi:10.1186/1475-2859-11-136.

Ramos-Gomez, M., I. K. Olivares-Marin, M. Canizal-García, J. C. González-Hernández, G. M. Nava, and L. A. Madrigal-Perez. 2017. Resveratrol induces mitochondrial dysfunction and decreases chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* in a glucose-dependent manner. *J. Bioenerg. Biomembr.* 49:241–251. doi:10.1007/s10863-017-9709-9.

Rieske, J. S. 1967. Antimycin A. In: D. Gottlieb and P. D. Shaw, editors. Mechanism of Action. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. p. 542–584. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-46051-7\\_42](https://doi.org/10.1007/978-3-642-46051-7_42)

Röhr, H., and U. Stahl. 2003. Alternative Respiration in Plants and Fungi: Some Aspects of Its Biological Role. In: K. Esser, U. Lüttge, W. Beyschlag, and F. Hellwig, editors. Progress in Botany: Genetics Physiology Systematics Ecology. Springer



Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. p. 27–41. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55819-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55819-1_2)

Shi, N. Q., K. Pahl, J. Hendrick, J. Cruz, P. Lu, J. Y. Cho, S. Jones, and T. Jeffries. 2000. Characterization and complementation of a *Pichia stipitis* mutant unable to grow on D-xylose or L-arabinose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84–86:201–216.

Shi, N.-Q., J. Cruz, F. Sherman, and T. W. Jeffries. 2002. SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*. *Yeast.* 19:1203–1220. doi:10.1002/yea.915.

Silva, J. P. A., S. I. Mussatto, I. C. Roberto, and J. A. Teixeira. 2012. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renew. Energy.* 37:259–265. doi:10.1016/j.renene.2011.06.032.

Somerville, C. 2006. The Billion-Ton Biofuels Vision. *Science.* 312:1277–1277. doi:10.1126/science.1130034.

Subtil, T., and E. Boles. 2011. Improving L-arabinose utilization of pentose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters. *Biotechnol. Biofuels.* 4:38. doi:10.1186/1754-6834-4-38.

Temer, B., L. V. Santos, L. A. Calderón, and G. A. G. Pereira. 2014. Expression of a bacterial xylose isomerase in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Proc.* 8:P222. doi:10.1186/1753-6561-8-S4-P222.

Tilman, D., R. Socolow, J. A. Foley, J. Hill, E. Larson, L. Lynd, S. Pacala, J. Reilly, T. Searchinger, C. Somerville, and R. Williams. 2009. Beneficial Biofuels—The Food, Energy, and Environment Trilemma. *Science.* 325:270–271. doi:10.1126/science.1177970.

Träff, K. L., R. R. Otero Cordero, W. H. van Zyl, and B. Hahn-Hägerdal. 2001. Deletion of the GRE3 aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the xylA and XKS1 genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5668–5674. doi:10.1128/AEM.67.12.5668-5674.2001.

Unrean, P., and N. H. A. Nguyen. 2012. Metabolic pathway analysis of *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94:1387–1398. doi:10.1007/s00253-012-4059-3.

Van Vleet, J. H., T. W. Jeffries, and L. Olsson. 2008. Deleting the para-nitrophenyl phosphatase (pNPPase), PHO13, in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* improves growth and ethanol production on D-xylose. *Metab. Eng.* 10:360–369. doi:10.1016/j.ymben.2007.12.002.

Vanlerberghe, G. C., and L. McIntosh. 1997. ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:703–734. doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.703.

Wang, L., Jianhua Zhang, Z. Cao, Y. Wang, Q. Gao, Jian Zhang, and D. Wang. 2015. Inhibition of oxidative phosphorylation for enhancing citric acid production by *Aspergillus niger*. *Microb. Cell Factories.* 14. doi:10.1186/s12934-015-0190-z. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4320542/>

Wang, M., B. Chen, Y. Fang, and T. Tan. 2017. Cofactor engineering for more efficient production of chemicals and biofuels. *Biotechnol. Adv.* 35:1032–1039. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.09.008.

Wayne, R. 2010. Chapter 14 - Mitochondria. In: R. Wayne, editor. *Plant Cell Biology*. Academic Press, San Diego. p. 237–257. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123742339000143>

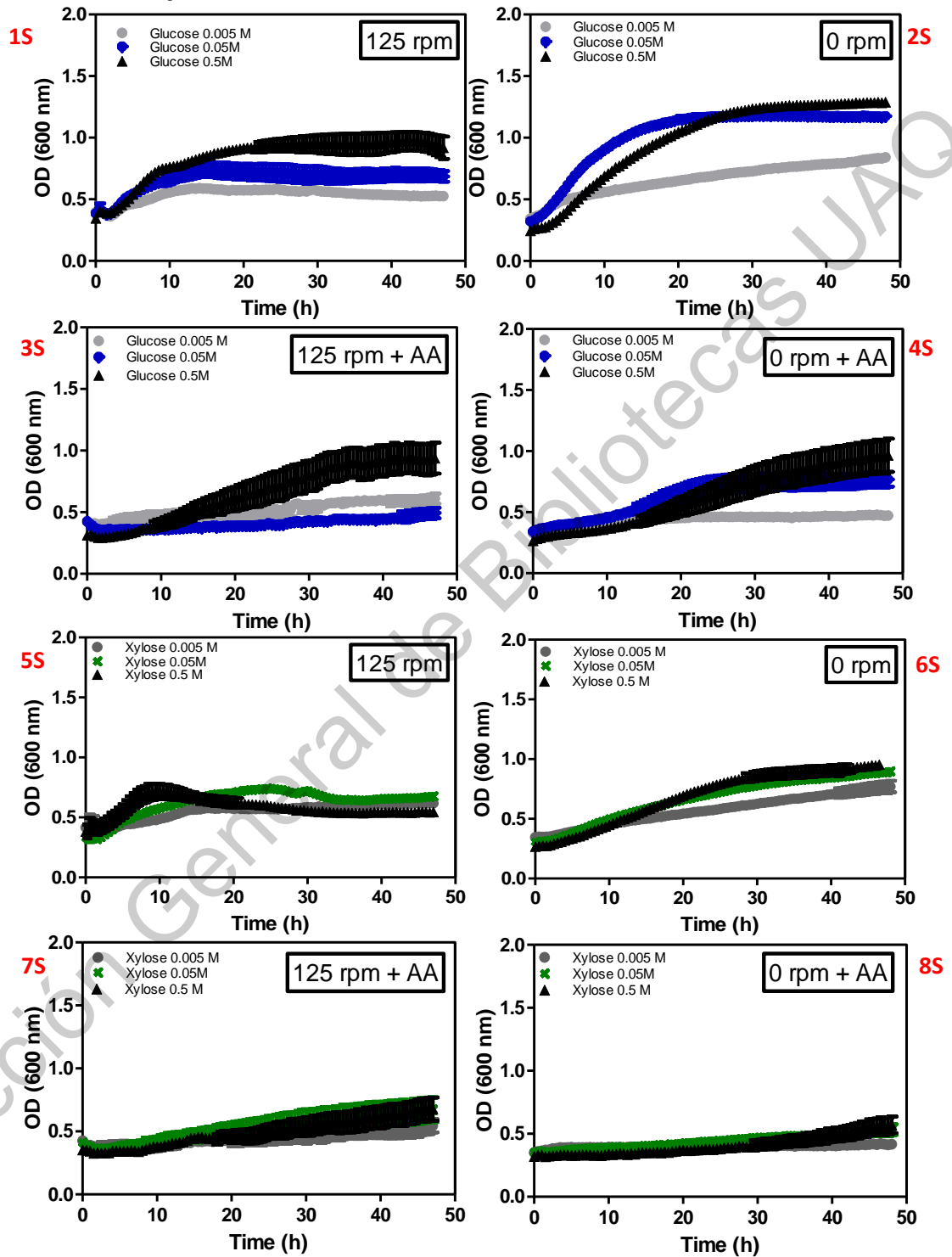
Wood, I. P., A. Elliston, P. Ryden, I. Bancroft, I. N. Roberts, and K. W. Waldron. 2012. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass Bioenergy*. 44:117–121. doi:10.1016/j.biombioe.2012.05.003.

Young, E., S.-M. Lee, and H. Alper. 2010. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. *Biotechnol. Biofuels*. 3:24. doi:10.1186/1754-6834-3-24.

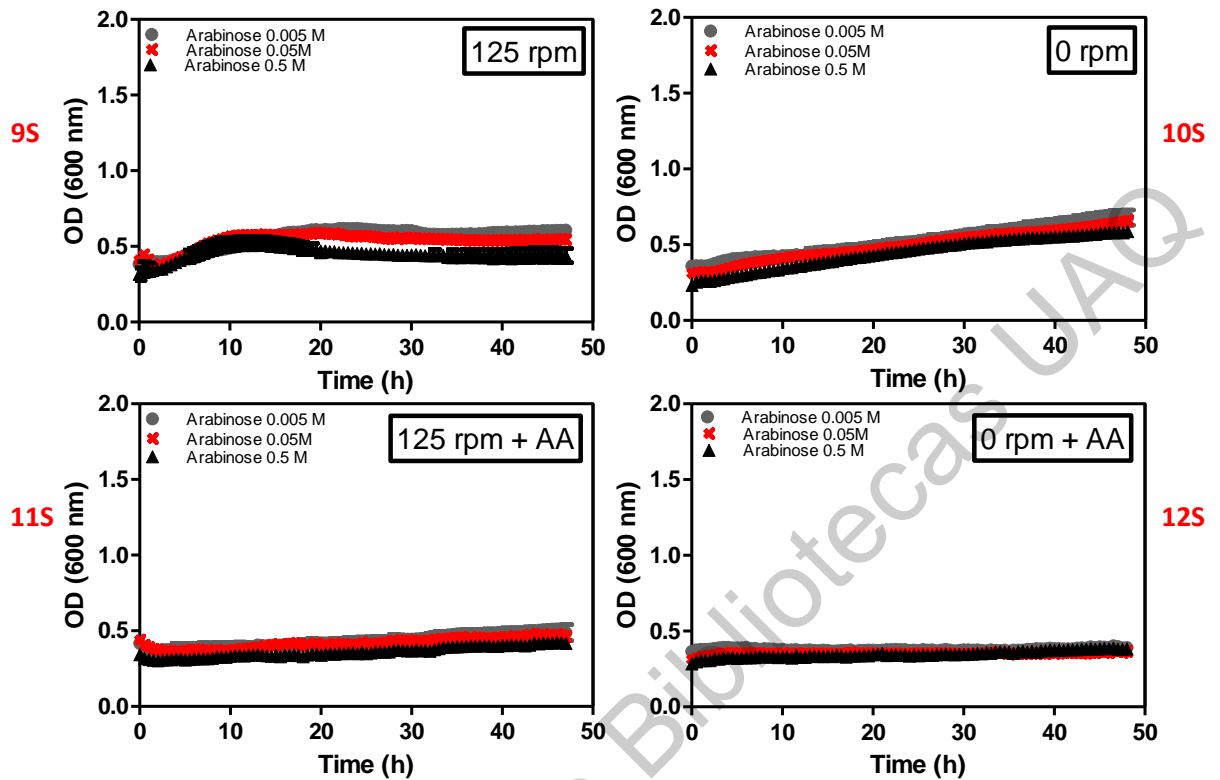
Zhang, W., and A. Geng. 2012. Improved ethanol production by a xylose-fermenting recombinant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method. *Biotechnol. Biofuels*. 5:46. doi:10.1186/1754-6834-5-46.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 10.0 Material suplementario



**Figura suplementaria 1.** Curvas de crecimiento de *S. stipitis* en glucosa sin AA (1S y 2S), y con AA (3S y 4S) y xilosa sin AA (5S y 6 S) con AA (7S y 8S). Las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo a 125 o 0 rpm empleando tres concentraciones de arabinosa, 0.5, 0.05 y 0.005M a 30 °C por 48 h. A partir de estas curvas se calcularon las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ). Los resultados representan la media  $\pm$  SE de 5 réplicas técnicas.



**Figura suplementaria 2.** Curvas de crecimiento de *S. stipitis* en arabinosa sin AA (9S y 10S), y con AA (11S y 12S). Las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo a 125 o 0 rpm empleando tres concentraciones de arabinosa, 0.5, 0.05 y 0.005M a 30 °C por 48 h. A partir de estas curvas se calcularon las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ). Los resultados representan la media  $\pm$  SE de 5 réplicas técnicas.



RESEARCH ARTICLE

# Effect of cytochrome $bc_1$ complex inhibition during fermentation and growth of *Scheffersomyces stipitis* using glucose, xylose or arabinose as carbon sources

J. A. Granados-Arvizu<sup>1</sup>, L. A. Madrigal-Perez<sup>2</sup>, M. Canizal-García<sup>2</sup>,  
J. C. González-Hernández<sup>3</sup>, B. E. García-Almendárez<sup>1</sup>  
and C. Regalado-González<sup>1,\*</sup>,<sup>†</sup>

<sup>1</sup>DIPA, PROPAC. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U. Cerro de las Campanas s/n. Col. Las Campanas, C.P. 76010 Querétaro, Qro., México, <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología Microbiana del, Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo, Av. Ing Carlos Rojas Gutiérrez #2120, 61100 Ciudad Hidalgo, Michoacán, México and <sup>3</sup>Laboratorio de Bioquímica del, Instituto Tecnológico de Morelia, Av. Tecnológico de Morelia #1500, 58120 Morelia, Michoacán, México

\*Corresponding author: DIPA, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U., Cerro de las Campanas s/n, Querétaro, Qro. México, Tel.: +52 441 192 1307; E-mail: [regcarlos@gmail.com](mailto:regcarlos@gmail.com)

**One sentence summary:** Respiratory and fermentative metabolism of *S. stipitis* can be differentiated using glucose, fructose or arabinose, whereas respiratory chain inhibition may be used to improve ethanol yields.

Editor: Monique Bolotin-Fukuhara

<sup>†</sup>C. Regalado-González, <http://orcid.org/0000-0002-3025-0313>

## ABSTRACT

*Scheffersomyces stipitis* shows a high capacity to ferment xylose, with a strong oxygen dependence to allow NAD<sup>+</sup> regeneration. However, without oxygen regeneration of NADH occurs by other metabolic pathways like alcoholic fermentation. There are few reports about inhibitors of mitochondrial respiration and their effects on growth and fermentation. This work aimed to explore the effect of cytochrome  $bc_1$  complex inhibition by antimycin A (AA), on growth and fermentation of *S. stipitis* using glucose, xylose and arabinose as carbon sources, at three agitation levels (0, 125 and 250 rpm). It was possible to discriminate between respiratory and fermentative metabolism in these different conditions using xylose or arabinose. Despite the inhibition of mitochondrial respiration, the glycolytic flux was active because *S. stipitis* metabolized glucose or xylose to produce ATP; on 0.5 M glucose the cells yielded 17–33 g L<sup>-1</sup> ethanol. However, more complex results were obtained on xylose, which depended upon agitation conditions where ethanol production without agitation increased up to 11 g L<sup>-1</sup>. Inhibition of respiratory chain in *S. stipitis* could therefore be a good strategy to improve ethanol yields

**Keywords:** *Scheffersomyces stipitis*; respiratory chain; antimycin A; fermentation; ethanol

## INTRODUCTION

The main polymers of lignocellulosic biomass are cellulose and hemicelluloses that comprise about 70% of the total dry biomass

weight (Zabed *et al.* 2017). Glucose represents the main hexose sugar, whereas D-xylose and L- arabinose are the major pentose sugars in lignocellulosic biomass (Subtil and Boles 2011;

Chen and Fu 2016). *Saccharomyces cerevisiae* is the microorganism mostly used for ethanol production, but is not capable to metabolize pentose sugars as carbon sources (Su, Willis and Jeffries 2015). However, to achieve economic feasibility in fermentation processes, it is necessary to use all sugars from lignocellulosic biomass (Subtil and Boles 2011; Acevedo, Conejeros and Aroca 2017). *Scheffersomyces stipitis* (Kurtzman and Suzuki 2010) is a Crabtree-negative yeast that is known for its xylose fermentation capacity, and its high yield of ethanol from this sugar (0.35–0.44 g g<sup>-1</sup>) (Papini et al. 2012). In this yeast ethanol production and oxygen supply are highly correlated, regardless of the carbon source or its concentration (Unrean and Nguyen 2012). The respiratory chain of *S. stipitis* includes the proton translocating NADH dehydrogenase complex I (NADH I), and the alternative oxidase (AOX) that provide high oxidative capacity for NADH (Shi et al. 2002), and are missing in *S. cerevisiae* (Shi et al. 2002; Acevedo, Conejeros and Aroca 2017). It is well known that oxygen levels play an important role to maintain cofactor balance during xylose metabolism in *S. stipitis* (Jeppsson, Alexander and Hahn-Hagerdal 1995; Liang et al. 2014), and thus different strategies have been adopted to increase ethanol yields from *S. stipitis* (Silva et al. 2012; Hanly and Henson 2013; Fonseca et al. 2018). However, few investigations explore cofactors manipulation using respiratory chain inhibition. Cofactor engineering strategies may be a good alternative to achieve efficient production of chemicals, and biofuels (Wang, San and Bennett 2013), which include culture conditions, genetic modification of host pathways for increased cofactors availability, change of specificity of enzymes cofactors and introduction of novel redox substances to form effective circuits for biochemical processes and biocatalysts (Wang, San and Bennett 2013; Wang et al. 2017). In xylose assimilation, xylose reductase (XR) can use either NADH or NADPH as cofactors to transform xylose into xylitol, but the affinity is higher for NADPH (Su, Willis and Jeffries 2015). In addition, xylitol can be converted into xylulose by xylitol dehydrogenase (XDH), which almost exclusively depends on NAD<sup>+</sup> (Liang et al. 2014), but NADH oxidation mainly occurs in the respiratory chain. For this reason, it is expected that oxygen supply is essential to metabolize xylose due to NAD<sup>+</sup> requirements. Nonetheless, when oxygen is not available, the oxidation of NADH probably occurs by alternative pathways such as alcoholic fermentation. There are few reports investigating the manipulation of cofactors of *S. stipitis* through inhibition of the electron transport chain (ETC), which could be an alternative to promote fermentative metabolism. For instance, Lighthelm, Prior and Preez du (1988) found that growth and ethanol production of *S. (formerly Pichia) stipitis* and *Pachysolen tannophilus* were stimulated or inhibited depending on the type of respiratory inhibitor used: rotenone, antimycin A (AA), potassium cyanide or sodium azide, whereas in *S. cerevisiae* the effects were less marked. An alternative strategy to increase ethanol production from *S. stipitis* may be the deletion of the salicylhydroxamic acid (SHAM)-sensitive terminal oxidase gene (PsSTOI). Shi et al. (2002) used this type of mutant to obtain 20% more ethanol from xylose compared to the parental strain. Recently, it was found that inhibition of complex I of ETC using rotenone in *S. stipitis* under limited oxygen supply promoted 18% increase in ethanol yield (Acevedo, Conejeros and Aroca 2017). Therefore, the aim of this work was to explore the effect of inhibition of cytochrome bc<sub>1</sub> complex by AA on growth and fermentation of *S. stipitis* using different agitation rates and concentrations of glucose, xylose or arabinose as carbon sources.

## MATERIALS AND METHODS

### Yeast strain

All experiments were conducted using *S. stipitis* (NRRL Y-1154), kept at -70°C in an ultrafreezer (Thermo Scientific, MA, USA). The yeast was activated twice using a medium containing 10 g L<sup>-1</sup> yeast extract (Sigma-Aldrich, MO, USA), 20 g L<sup>-1</sup> peptone (BD, MD, USA), and 20 g L<sup>-1</sup> glucose (Sigma-Aldrich), for 24 h at 30°C, and 150 rpm.

### Growth kinetics and specific growth rate ( $\mu$ )

Five  $\mu$ L of the activated yeast were mixed with 145  $\mu$ L of a medium containing 10 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 20 g L<sup>-1</sup> peptone in each well of a honeycomb plate (Growth curves, Piscataway, NJ, USA) and incubated at 30°C for 48 h in a Bioscreen CMBR (Growth curves) (Madrigal-Perez et al. 2016). Three different shaking levels were used (intense, medium and null) and the absorbance at 600 nm was taken every 30 min. The carbon sources used were glucose, xylose (Sigma-Aldrich) or arabinose (bioWorld, OH, USA) with three different concentrations (0.5, 0.05 and 0.005 M). These carbon sources are the main hexose and pentoses found in lignocellulosic biomass (Subtil and Boles 2011; Chen and Fu 2016). Growth kinetic parameters were calculated using equation 1:

$$X_f = X_o e^{\mu t} \quad (1)$$

Where  $X_o$  is the initial cells population,  $X_f$  is the final cells population;  $\mu$  is the specific growth rate and  $t$  is the time (h).

To calculate doubling time (dt) equation 2 was used:

$$dt = \ln 2 / \mu \quad (2)$$

### Respiratory inhibition kinetics

Antimycin A (AA; Sigma-Aldrich) was used to inhibit the mitochondrial complex III (Nicholls and Ferguson 2013). For these experiments, 5  $\mu$ L of pre-inoculum were added to 139  $\mu$ L of YP medium (containing the carbon source under evaluation) supplemented with 6  $\mu$ L of AA (0.2 mM). Absolute ethanol (Sigma-Aldrich), a non-fermentable carbon source, was used as respiratory growth control (Stahl et al. 2004) at two levels ( $v^{-1}$ ): 0.1% and 1.0%. Some reports mention that *S. stipitis* is not inhibited when initial concentration is between 20 to 30 g L<sup>-1</sup> of ethanol, but the effect of inhibition depends on the presence of oxygen and carbon source (Jeppsson, Alexander and Hahn-Hagerdal 1995; Liang et al. 2014).

### Quantification of bioenergetic variables

The bioenergetic variables measured were *in situ* mitochondrial respiration, and the extracellular acidification rate (ECAR). A base value of specific growth rate was determined using media containing 1% ethanol, 0.2 mM AA and 250 rpm, where growth was minimal (0.011 h<sup>-1</sup>). Treatments were selected to calculate the bioenergetic variables, when growth rate was higher than this base value, and are shown in Table 1.

### Quantification of *in situ* mitochondrial respiration

*In situ* mitochondrial respiration was evaluated according to Madrigal-Perez et al. (2016). Briefly, the oxygen consumption was

**Table 1.** Assays selected to test *S. stipitis* growth in shake-flasks.

Carbon source	Concentration (M)	Agitation rate (rpm)	Inhibitor <sup>a</sup>
Glucose	0.5	250	–
		125	
		0	
Glucose	0.5	250	AA
		125	
		0	
Glucose	0.05	250	–
		0	
Glucose	0.05	250	AA
		0	
Xylose	0.5	250	–
		125	
Xylose	0.5	250	AA
		125	
Xylose	0.05	250	–
		125	
Xylose	0.05	250	AA
		125	

<sup>a</sup>: – without AA

measured polarographically at 28°C in a Clark detector (YSI, model 5300, Yellow Spring, OH, USA). These assays were conducted using 125 mg of wet cells harvested at mid-logarithmic growth phase ( $OD_{600} \sim 0.6$ ). Cells were resuspended in 5 mL of 10 mM 2-N-(morpholino) ethane sulphonic acid (MES-TEA; Sigma-Aldrich) buffer, adjusted to pH 6.0 with triethanolamine (Sigma-Aldrich) in a closed chamber with constant stirring. The basal respiration was determined after adding the oxidizable substrate, which in this case was glucose or xylose, both at final concentration of 0.05 M or 0.5 M, and oxygen consumption was monitored for 3 min. The maximal respiratory capacity was analyzed by adding 10  $\mu$ M of the uncoupling agent cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP). Non-mitochondrial oxygen consumption was discriminated by adding 10  $\mu$ M AA at the end of each determination. Oxygen uptake was expressed in nano atoms oxygen  $\text{min}^{-1} \text{mg cells}^{-1}$ .

#### Measurement of glycolytic flux using extracellular acidification rate (ECAR)

The ECAR was measured according to Olivares-Marin et al. (2018) in conditions where specific growth rate was higher than the base value determined using 1% ethanol with AA, and 250 rpm where growth was minimal. Fifty milliliters of medium with one of two carbon sources: glucose or xylose (0.5 M and 0.05 M), supplemented with 10 g L<sup>-1</sup> yeast extract and 20 g L<sup>-1</sup> peptone were inoculated with 1.8 mL of an *S. stipitis* overnight culture and incubated at 30°C. Medium containing glucose was stirred using 250, 125 or 0 rpm, whereas medium added with xylose was stirred at 250, or 125 rpm, sampling was conducted when cultures reached mid-log phase. Two growth conditions were tested, with (0.4 mL, 0.2 mM) and without AA. After incubation cells were collected by centrifugation at 2500  $\times g$  for 5 min and washed 3 times with 5 mL deionized sterile water. The pellet was resuspended in deionized sterile water to achieve  $OD_{600} = 0.18$  in 25 mL, and after 2 min of pH equilibration 1.4 mL of 1 M glucose was added, followed by pH recording during 3 min using a Titrando equipment (Mod.902, Metrohm, Herisau, Switzerland). The slope of a plot of pH (milliunits) versus time (s) was used to

calculate ECAR. Five independent experiments with two replicates were carried out.

#### Shake-flask cultures

Previous experimental conditions used for growth kinetics were conducted using shake-flask cultures to measure ethanol, biomass and carbon source consumption in *S. stipitis*. For experiments without AA, medium containing 10 g L<sup>-1</sup> yeast extract and 20 g L<sup>-1</sup> peptone (9.7 mL) was inoculated with 0.3 mL of activated yeast in a 50 mL flask and incubated at 30°C for 48 h. In case of experiments with AA, same conditions as above were used except that 0.4 mL of AA (0.2 mM) was added. For both conditions arabinose was discarded due to growth inhibition. Biomass was measured gravimetrically using cells dried at 60°C for 24 h, and consumed sugar was quantified by the dimethylsalicylic acid (DNS) method (Wood et al. 2012). Ethanol was measured using an HPLC 1220 Infinity (Agilent Technologies, CA, USA) fitted with a refractive index detector, and a MetaCarb H plus column (300  $\times$  7.8 mm) (Agilent Technologies) at 55°C. The mobile phase was sulfuric acid (0.05 M) at a flow rate of 0.35 mL/min and running time of 35 min. The oven temperature was 75 °C and detector temperature of 55 °C with a sample injection of 20  $\mu$ L. Ethanol and biomass were calculated and reported as g L<sup>-1</sup> of medium.

#### Statistical analysis

Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SE). One-way ANOVA followed by Tukey's test were used to analyze the results of specific growth rate, maximal and basal respiratory capacity, and glycolytic flux by ECAR, and biomass and ethanol yields. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

#### Respiratory inhibition kinetics

Antimycin A was used initially to discriminate the use of ETC in the metabolism of xylose. Glucose was used as control because under static conditions (no agitation) it induces a fully fermentative metabolism in *S. stipitis*; whereas under agitation a respiratory metabolism is established. Since ethanol is only metabolized by mitochondrial respiration, it was used as positive control of respiratory growth. Additionally, three agitation conditions were tested 0, 125 and 250 rpm. As expected, under growing conditions without AA and 250 rpm, *S. stipitis* was able to grow in ethanol (Fig. 1A), but was unable to grow when AA was supplemented (Fig. 1B). This confirmed that AA is able to inhibit respiratory growth in *S. stipitis*, and the calculated  $\mu$  (0.011 h<sup>-1</sup>) from this treatment was used as reference to discriminate the growth by respiratory metabolism. Regarding glucose, *S. stipitis* grew at the three agitation rates tested without AA: 250 rpm (Fig. 1C), 125 rpm (Fig. S1, Supporting Information), and 0 rpm (Fig. S2, Supporting Information). When AA was added, growth decrease was observed in all treatments (250 rpm, Fig. 1D; 125 rpm, Fig. S3; 0 rpm, Fig. S4, Supporting Information), but growth inhibition was not observed. Interestingly, *S. stipitis* barely showed any growth for any xylose concentration when AA was supplemented (Fig. 1F) compared to the treatment without AA (Fig. 1E) at 250 rpm. A similar pattern was detected at 125 and 0 rpm (Fig. S5 and S6, Supporting Information) when compared to conditions with added AA (Fig. S7 and S8, Supporting



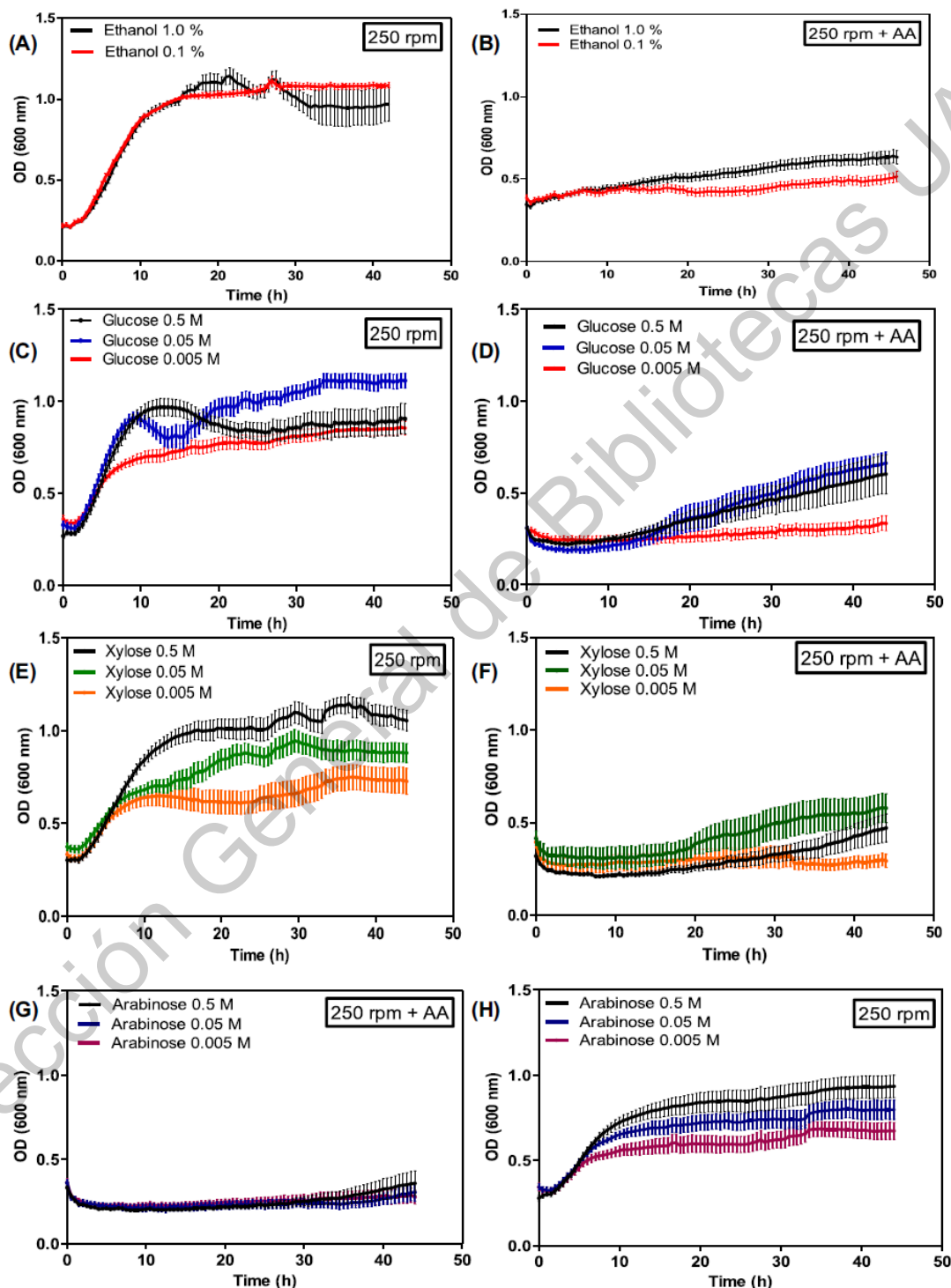
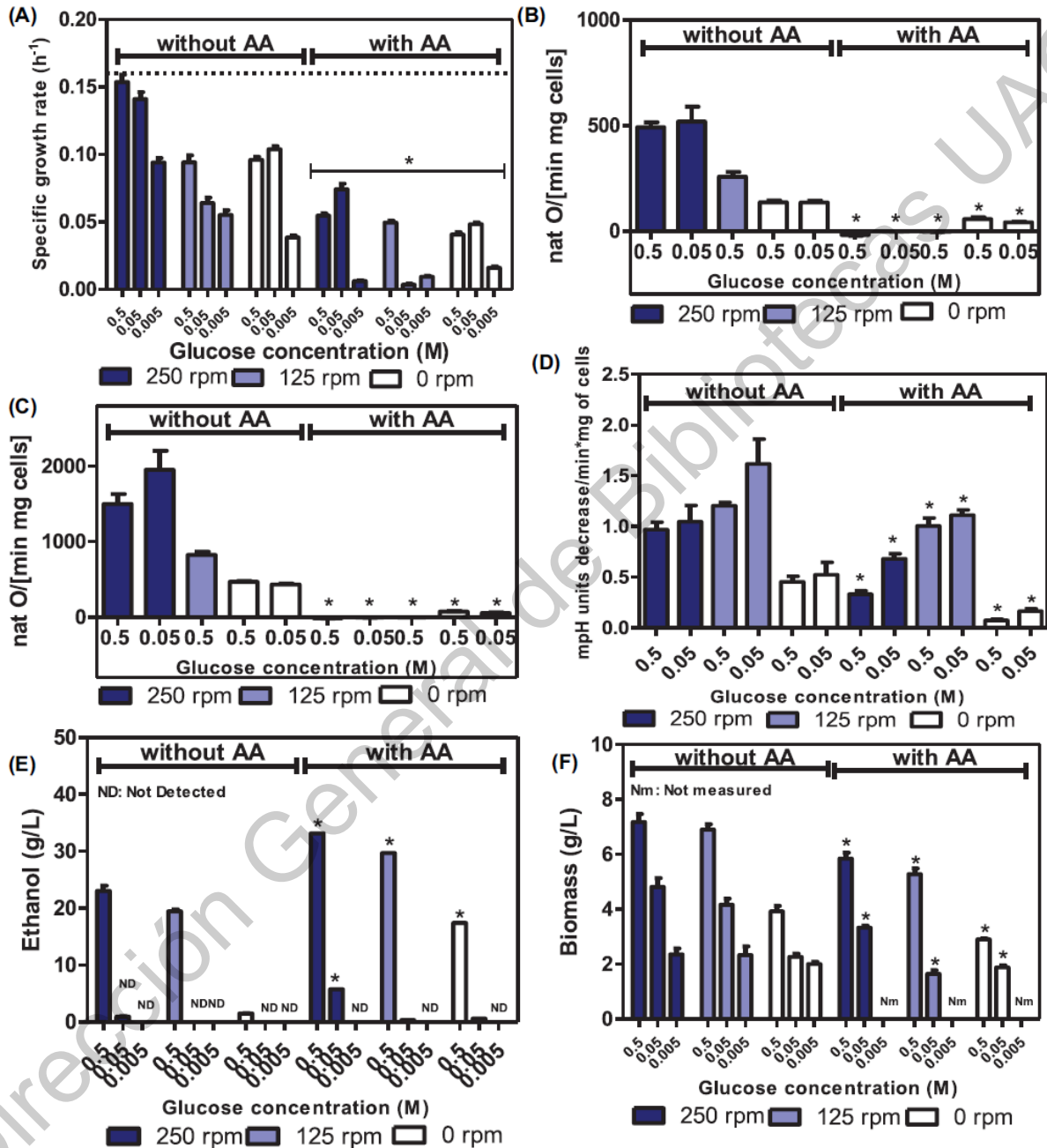


Figure 1. Growth kinetics of *S. stipitis* cultures at 250 rpm and 30°C for 48 h with ethanol (A), ethanol with AA (B), glucose (C), glucose with AA (D), xylose (E), xylose with AA (F), arabinose (G), and arabinose with AA (H). Results represent mean  $\pm$  SE from three technical replicates.

Information). These data indicate that *S. stipitis* needs a functional ETC to grow in xylose. In case of arabinose, *S. stipitis* was unable to grow when AA was supplemented (Fig. 1H) compared to the treatment without AA (Fig. 1G) at 250 rpm. When agitation was reduced, the growth of *S. stipitis* significantly ( $P > 0.05$ ) decreased even without AA (Fig. S9 and S10, Supporting Informa-

tion). However, when AA was added growth was totally inhibited (Fig. S11 and S12, Supporting Information).

Therefore, these data suggest that *S. stipitis* needs a completely functional ETC to metabolize arabinose. The effect of respiratory inhibition on specific growth rate using glucose as carbon source is shown in Fig 2A. Under inhibition conditions,



**Figure 2.** Effect of AA in energetic metabolism of *S. stipitis* using glucose as carbon source in cultures at 30°C for 48 h. (A), Specific growth rate ( $\mu$ ) at 250, 125 and 0 rpm, with and without AA; results represent mean  $\pm$  SE from three technical replicates. (B), Comparison of *in situ* mitochondrial basal respiration. Results represent mean  $\pm$  SE from six independent experiments. (C), Comparison of *in situ* mitochondrial maximal respiration. Results represent mean  $\pm$  SE from six independent experiments. (D), Comparison of glycolytic flux by ECAR. Results represent mean  $\pm$  SE from six independent experiments. (E), Ethanol and (F), Biomass yields, from shake-flask cultures. Results represent mean  $\pm$  SE from three technical replicates.

growth rates were lower in all treatments compared to non-inhibited cultures, especially at 0.005 M of glucose where growth was completely inhibited (Fig. 2A). Additionally, it was found that *S. stipitis* is able to grow at high glucose concentrations (Fig. 2A). When 5  $\mu$ M of AA was used in *Kluyveromyces lactis*, the specific growth rate was of 0.15  $\text{h}^{-1}$  (Merico et al. 2009), which is higher than the values observed in this study, using 0.11 M glucose and limited oxygen conditions. On the other hand, the inhibition of ETC using xylose as carbon source showed a significant

( $P < 0.05$ ) effect on specific growth rate at all growth conditions (Fig. 3A), and  $\mu$  values were below 0.05  $\text{h}^{-1}$ . Additionally, arabinose was tested because it is one of the major five-carbon sugars present in biomass hydrolysates (Subtil and Boles 2011). Complete growth inhibition was observed when ETC was blocked using arabinose as carbon source in all treatments (Fig. 4A). Therefore, these data indicate that arabinose metabolism in *S. stipitis* is fully respiratory. Even without AA, *S. stipitis* in the presence of arabinose did not grow without agitation (Fig. 4B),

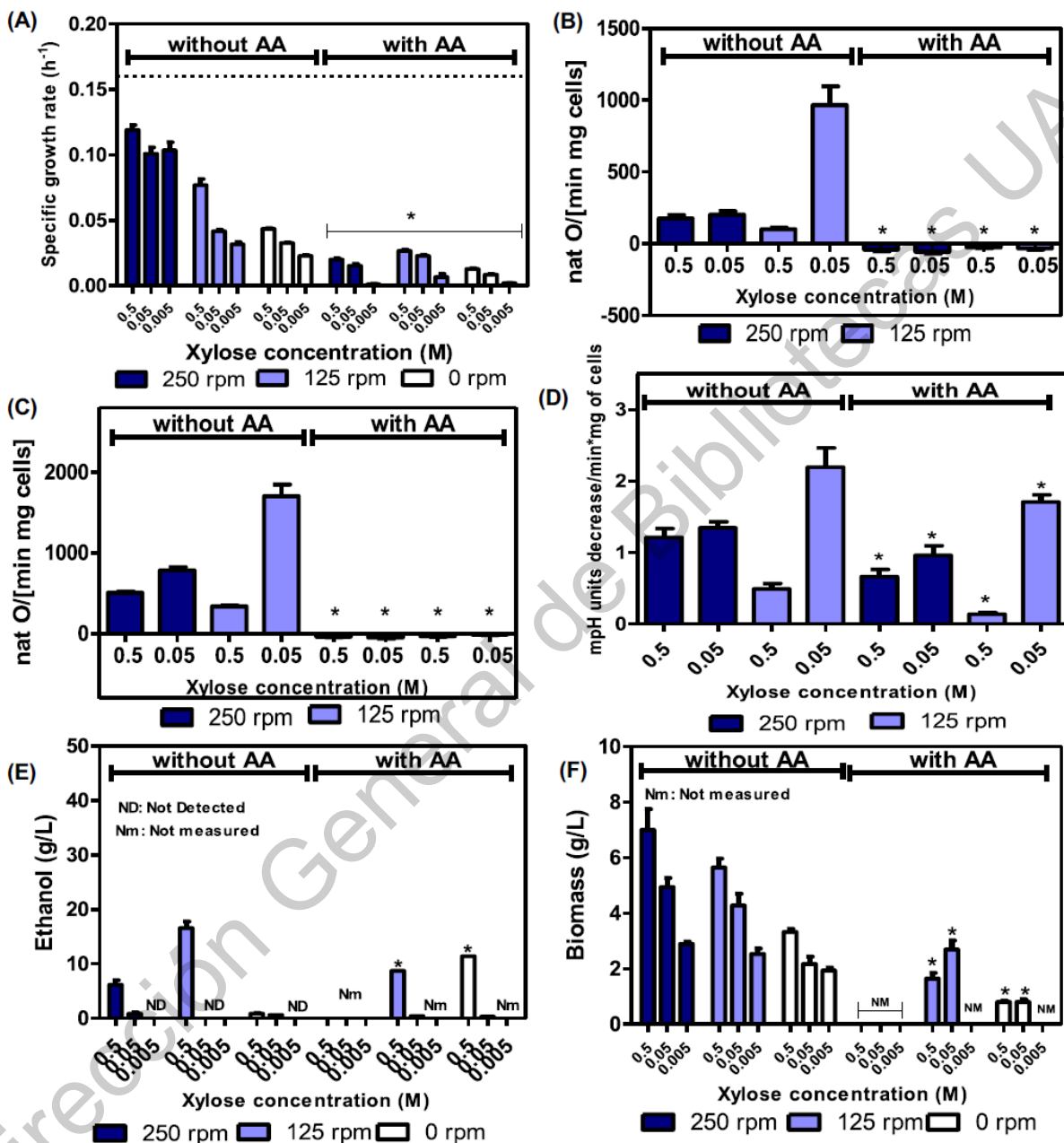


Figure 3. Effect of AA in energetic metabolism of *S. stipitis* using xylose as carbon source, in cultures at 30°C for 48 h. (A), Specific growth rate ( $\mu$ ) at 250, 125 and 0 rpm with and without AA; results represent mean  $\pm$  SE from three technical replicates. (B), Comparison of in situ mitochondrial basal respiration; results represent mean  $\pm$  SE from six independent experiments. (C), Comparison of in situ mitochondrial maximal respiration. Results represent mean  $\pm$  SE from six independent experiments. (D), Comparison of glycolytic flux by ECAR. Results represent mean  $\pm$  SE from six independent experiments. (E), Ethanol and (F), Biomass yields, of shake-flask cultures. Results represent mean  $\pm$  SE from three technical replicates.

showing a high dependence of oxygen to metabolize this five-carbon sugar.

#### Effect of glucose, xylose and antimycin A supplementation on the mitochondrial respiration at different agitation rates

To corroborate the utilization of the ETC for xylose metabolism, the mitochondrial respiration was measured. The lowest con-

centration of xylose and the null agitation were discarded, due to lack of growth. As expected, it was found that AA inhibits basal respiration (Fig. 3B) and maximal respiratory capacity (Fig. 3C) of *S. stipitis*, and it was confirmed that at 125 and 250 rpm without AA higher oxygen consumption was observed in xylose metabolism, especially at low concentration. These data support that in xylose metabolism the function of the ETC is essential to support *S. stipitis* growth. Additionally, it was decided to further investigate the role of the ETC in glucose metabolism

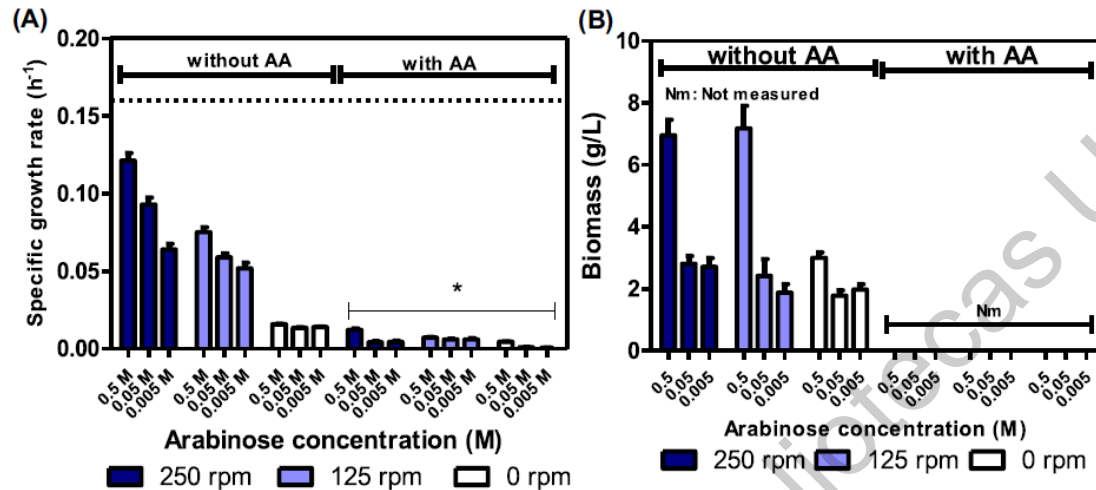


Figure 4. Effect of AA in energetic metabolism of *S. stipitis* using xylose as carbon source, in cultures at 30°C for 48 h. (A), Specific growth rate ( $\mu$ ) at 250, 125 and 0 rpm with and without AA. (B), Biomass yields of shake-flask cultures. Results represent mean  $\pm$  SE from three technical replicates.

considering that without agitation the AA has a negative role in growth. It was found that basal respiration and maximal respiratory capacity depend on agitation independently of the concentration of supplemented glucose. Interestingly, without agitation and inhibitor, cells still maintain oxygen consumption in both basal respiration (Fig. 2B) and maximal respiration capacity (Fig. 2C). These results explain the importance of ETC in glucose metabolism of *S. stipitis* without agitation.

#### Glycolytic flux of *S. stipitis* in the presences of xylose, glucose and/or antimycin A under different agitation rates

Based on the results from inhibition kinetics (Fig. 1a–h; Fig. S1–S12, Supporting Information), six conditions for glucose and four for xylose were selected, because the  $\mu$  values of these treatments were above respiratory metabolism limit ( $0.011 \text{ h}^{-1}$ ). Interestingly, in all growth conditions tested for glucose (Fig. 2D) and xylose (Fig. 3D), AA decreased the glycolytic flux. However, *S. stipitis* still maintains growth in the presence of glucose or xylose, which may be explained by ATP generation at substrate level by glycolysis pathway that is confirmed by mitochondrial respiration inhibition and the ECAR assay. Additionally, it was observed that glycolytic flux in all growth conditions tested was higher at low concentrations of carbon source. This could be possible because the low-affinity transport system of *S. stipitis* is used at high carbon source concentrations, whereas the high-affinity system is expressed when carbon source is low (Agbogbo and Coward-Kelly 2008). Thus, high expression of low affinity transport system may be useful to increase ethanol production at high glucose concentration, but further studies are needed to confirm this. This pattern was also observed in the ECAR assay even in conditions where mitochondrial respiration was inhibited.

#### Shake-flask cultures

To evaluate the effect of ETC inhibition on ethanol and biomass production using xylose or glucose as carbon sources, fermentation in shake-flasks was conducted. The inhibition of ETC resulted in a significant ( $P > 0.05$ ) increase in ethanol production

at all glucose treatments tested (Fig. 2E). Using 0.5 M glucose, the inhibition of cytochrome  $bc_1$  of *S. stipitis* increased ethanol yields from 17 to  $33 \text{ g L}^{-1}$ , depending on agitation level. Additionally, when 0.05 M glucose was used ethanol yield increased from 2 to  $5.7 \text{ g L}^{-1}$ , only at high agitation rate. In the case of biomass using glucose as carbon source, *S. stipitis* showed a significant ( $P < 0.05$ ) growth reduction at all conditions with ETC inhibition in the range of  $0.4$  to  $2.5 \text{ g L}^{-1}$ , in comparison to treatments without AA (Fig. 2F). Growth decreased similarly at both concentrations (0.5 M and 0.05 M) tested. When 0.5 M xylose was used as carbon source, unlike glucose, ethanol production decreased almost  $8 \text{ g L}^{-1}$  at 125 rpm but increased to  $11 \text{ g L}^{-1}$  without agitation (Fig. 3E). These results are similar to those reported by Acevedo, Conejeros and Aroca (2017), who tested some respiratory chain inhibitors in *S. stipitis* using xylose at limited oxygen supply conditions. They observed decreased ethanol yields in the range of 25%–50% depending on the inhibitor used, but complex I inhibition with rotenone increased the yield up to 13%. Lee et al. (2000) reported that the addition of rotenone to *S. stipitis* during the exponential growth phase increased 1.1 times the ethanol concentration, whereas in this work AA addition increased ethanol production 12.2 times at 0.5 M xylose without agitation (Fig. 3E). Lighthelm, Prior and Preez du (1988) reported that AA strongly stimulated ethanol production in *P. tannophilus* but not in *S. stipitis*. For biomass production with xylose as carbon source, ETC inhibition caused a significant ( $P < 0.05$ ) decrease in all treatments. However, treatments without agitation barely showed biomass production (Fig. 3F). The use of arabinose was discarded as carbon source because the calculated  $\mu$  values were below the respiratory metabolism limit ( $0.01 \text{ h}^{-1}$ ), when AA was incorporated (Fig. 4A). Arabinose fermentations treatments conducted without AA showed a strong dependence of  $\mu$  on agitation and concentration (Fig. 4A), while biomass production required both high concentration and agitation (Fig. 4B). Nevertheless, it must be mentioned that ethanol was not detected in any treatment (data not shown). In consequence, arabinose may be considered as a non-fermentable carbon source by *S. stipitis*, in agreement with a report of Shi et al. (2000). These results confirm that *S. stipitis* requires a functional ETC to metabolize xylose and arabinose, whereas this effect was not observed for glucose. Acevedo, Conejeros and Aroca (2017) mentioned that

respiratory inhibition could be an additional strategy combined with aeration control to improve ethanol yields from *S. stipitis* using xylose. Nonetheless, it is necessary to understand the exerted mechanisms when different ETC inhibitors are used, in addition to oxygen limitation to produce high ethanol yields from *S. stipitis* fermentation processes. In conclusion, the inhibition of cytochrome bc<sub>1</sub> complex proved to be a good strategy to improve ethanol yields from *S. stipitis*. However, before going into practical trials many factors have yet to be investigated, such as the identification of low cost inhibitors, optimization of fermentation with aeration using these ETC inhibitors as well as the role of AOX systems when these inhibitors are used.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at [FEMSYR](https://femsyr.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/femsyr.13111) online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Sofia M. Arvizu-Medrano for the facilities on the use of a BioScreen.

## FUNDING

The authors thank for financial support for PhD grant [541949] to JAG from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

**Conflict of interest.** None declared.

## REFERENCES

- Acevedo A, Conejeros R, Aroca G. Ethanol production improvement driven by genome-scale metabolic modeling and sensitivity analysis in *Scheffersomyces stipitis*. *Renewable Sustainable Energy Rev* 2017;12:475–501.
- Agbogbo FK, Coward-Kelly G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett* 2008;30:1515–24.
- Chen H, Fu X. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renew Sustain Energy Rev* 2016;57:468–78.
- Fonseca BG, Mateo S, Moya AJ et al. Biotreatment optimization of rice straw hydrolyzates for ethanolic fermentation with *Scheffersomyces stipitis*. *Biomass Bioenergy* 2018;112:19–28.
- Hanly TJ, Henson MA. Dynamic metabolic modeling of a microaerobic yeast co-culture: predicting and optimizing ethanol production from glucose/xylose mixtures. *Biotechnol Biofuels* 2013;6:44.
- Jeppsson H, Alexander NJ, Hahn-Hagerdal B. Existence of cyanide-insensitive respiration in the yeast *Pichia stipitis* and its possible influence on product formation during Xylose Utilization. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:2596–2600.
- Kurtzman CP, Suzuki M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* 2010;51:2–14.
- Lee T-Y, Kim M-D, Kim K-Y et al. A parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2000;5:27–31.
- Liang M, Damiani A, He QP et al. Elucidating xylose metabolism of *Scheffersomyces stipitis* for lignocellulosic ethanol production. *ACS Sustain Chem Eng* 2014;2:38–48.
- Lighthelm ME, Prior BA, Preez du JC. The effect of respiratory inhibitors on the fermentative ability of *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* under various conditions of aerobiosis. *Appl Microbiol Biotechnol* 1988;29:67–71.
- Madrigal-Perez LA, Canizal-García M, González-Hernández JC et al. Energy-dependent effects of resveratrol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2016;33:227–34.
- Merico A, Galafassi S, Piškur J et al. The oxygen level determines the fermentation pattern in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* 2009;9:749–56.
- Nicholls DG, Ferguson SJ. 5 - Respiratory Chains. In: *Bioenergetics (Fourth Edition)*. Boston: Academic Press, 2013;91–157.
- Olivares-Marin IK, Madrigal-Perez LA, Canizal-García M et al. Interactions between carbon and nitrogen sources depend on RIM15 and determine fermentative or respiratory growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018;102:4535–48.
- Papini M, Nookaew I, Uhlén M et al. *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Factories* 2012;11:136.
- Shi N-Q, Cruz J, Sherman F et al. SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*. *Yeast* 2002;19:1203–20.
- Shi NQ, Prahel K, Hendrick J et al. Characterization and complementation of a *Pichia stipitis* mutant unable to grow on D-xylose or L-arabinose. *Appl Biochem Biotechnol* 2000;84-86:201–16.
- Silva JPA, Mussatto SI, Roberto IC et al. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renew Energy* 2012;37:259–65.
- Stahl G, Salem SNB, Chen L et al. Translational Accuracy during Exponential, Postdiauxic, and Stationary Growth Phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2004;3:331–38.
- Su Y-K, Willis LB, Jeffries TW. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnol Bioeng* 2015;112:457–69.
- Subtil T, Boles E. Improving L-arabinose utilization of pentose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters. *Biotechnol Biofuels* 2011;4:38. DOI: 10.1186/1754-6834-4-38.
- Unrean P, Nguyen NHA. Metabolic pathway analysis of *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;94:1387–98.
- Wang M, Chen B, Fang Y et al. Cofactor engineering for more efficient production of chemicals and biofuels. *Biotechnol Adv* 2017;35:1032–39.
- Wang Y, San K-Y, Bennett GN. Cofactor engineering for advancing chemical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2013;24:994–99.
- Wood IP, Elliston A, Ryden P et al. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass Bioenergy* 2012;44:117–21.
- Zabed H, Sahu JN, Suely A et al. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renew Sustain Energy Rev* 2017;71:475–501.