

18.200

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGIA

Dpto. DE MICROBIOLOGIA III



* 5 3 0 9 5 6 7 6 2 0 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**SENSIBILIDAD A ETANOL EN LEVADURAS:
BASES FISIOLÓGICAS Y ANÁLISIS DE
MÉTODOS EMPLEADOS EN SU DETERMINACIÓN.**

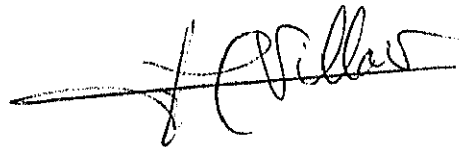
ÁNGEL LUIS VILLAR MORENO

MADRID, 1992

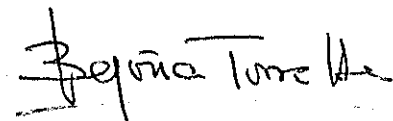
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III**

**SENSIBILIDAD A ETANOL EN LEVADURAS INDUSTRIALES:
BASES FISIOLÓGICAS Y ANÁLISIS DE MÉTODOS
EMPLEADOS EN SU DETERMINACIÓN.**

Memoria presentada para optar al Grado
de Doctor en Ciencias Biológicas por
Ángel Luis Villar Moreno.



Director de Tesis: Dra. D. Begoña Torralba
Redondo.



A Begoña, Marta y Elena.

"Y añadió aún: ¿A qué compararé el Reino de los Cielos?. Es semejante a la levadura....." (Lucas 13, 20-21).

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas, que me han ayudado a realizar este trabajo.

Muy especialmente a:

Prof. Dr. D. José Martínez Peinado, Director del Dpto. de Microbiología III, quien me inició en el trabajo con levaduras, por los medios puestos a mi disposición, apoyo y colaboración.

Dr. D^a Begoña Torralba Redondo, Directora de esta Tesis y esposa, por sus conocimientos, su esfuerzo y su cariño.

A todos mis compañeros del Dpto. de Microbiología III por su colaboración y ayuda inestimable. Especialmente a Almudena, Carmen, Fernando y Domingo por su esfuerzo final.

INDICE

I. INTRODUCCION	2
I.1.- LEVADURAS Y FERMENTACIÓN.	2
I.2.- MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL ETANOL.	7
I.3.- DETERMINACION DE LA TOLERANCIA A ETANOL	7
I.4.- DETERMINACIÓN DE TOLERANCIA POR INHIBICIÓN DE LA FERMENTACIÓN.	12
I.5.- DETERMINACION DE TOLERANCIA POR LA ALTERACION DE LA MEMBRANA PLASMATICA.	13
I.6.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.	15
 II. MATERIAL Y MÉTODOS.	 18
II.1.- MICROORGANISMOS.	18
II.2.- MEDIOS DE CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO.	18
II.5.- OBTENCION DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO.	19
II.5.1.- <u>Determinaciones turbidimetricas</u>	19
II.5.2.- <u>Calculo de la tasa especifica de crecimiento.</u>	21
II.5.3.- <u>Determinacion del peso seco celular.</u>	22
II.5.4.- <u>Determinacion del numero de microorganismos</u> <u>totales.</u>	23
II.6.- TECNICAS MANOMETRICAS.	23
II.6.1.- <u>Contenido de los matraces.</u>	24

II.6.2.- <u>Procedimiento</u>	24
II.6.3.- <u>Cálculo de las tasas de fermentación y respiración</u> . . .	26
II.6.4.- <u>Cálculo de las tasas específicas de fermentación y respiración</u>	28
II.7.- DETERMINACION DEL FLUJO PASIVO DE PROTONES TRANSMEMBRANA.	28
II.7.1.- <u>Procedimiento (Jimenez y van Uden, 1985)</u>	28
II.7.2.- <u>Determinación del tiempo de estabilización del pH extracelular</u>	29
II.7.3.- <u>Cálculo de las constantes de estimulación exponencial del flujo pasivo de protones (K)</u>	30
II.8.- DETERMINACION DE LA EXTRUSION ACTIVA DE PROTONES.	31
II.8.1.- <u>Procedimiento (Loureiro-Dias y Peinado, 1984)</u>	31
II.8.2.- <u>Cálculo de la tasa de extrusión activa de protones</u> . .	32
II.8.3.- <u>Cálculo de la tasa específica de extrusión activa de protones</u>	33
II.9.- DETERMINACION DE LA SALIDA DE LOS COMPUESTOS INTRACELULARES QUE ABSORBEN A 260 NM.	33
II.9.1.- <u>Procedimiento (Loureiro y cols., 1988)</u>	33
II.9.2.- <u>Cálculo de la constante exponencial de estimulación de salida de productos intracelulares (E)</u>	35

II.10.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA FOSFATASA ALCALINA.	37
II.10.1.- <u>Procedimiento.</u>	37
II.11.- DETERMINACION DEL CONTENIDO CELULAR TOTAL DE LOS COMPUESTOS INTRACELULARES QUE ABSORBEN A 260 NM. . .	38
III.- RESULTADOS.	41
III.1.- ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE LAS ESTIRPES ENSAYADAS. . .	41
III.1.1.- <u>Determinación de la tasa específica de crecimiento.</u>	41
III.1.2.- <u>Medida de la relación entre el número de células y la D.O.</u>	47
III.2.- INHIBICIÓN DE LA FERMENTACIÓN Y RESPIRACIÓN POR EFECTO DEL ETANOL.	42
III.2.1.- <u>Inhibición de la fermentación en presencia de etanol, en medio YPD.</u>	42
III.2.2.- <u>Inhibición de la respiración en presencia del etanol, en el medio YPD.</u>	56
III.2.3.- <u>Estudio comparativo de las inhibiciones por etanol, en medio YPD.</u>	62
III.2.4.- <u>Inhibición de la fermentación en presencia de etanol, en tampón fosfato 50 mM, pH 5.5.</u>	67

III.2.5.- <u>Estudio comparativo de las inhibiciones por etanol en tampón fosfato 50 mM, pH 5.5.</u>	73
III.3.- CÁLCULO DE LA TOLERANCIA AL ETANOL MEDIANTE EL ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ALTERACIONES DE FLUJO PASIVO DE PROTONES TRANSMEMBRANA.	81
III.3.1.- <u>Determinación de las variaciones de pH extracelular, debido al efecto del etanol sobre la permeabilidad de la membrana al flujo pasivo de protones.</u>	82
III.3.2.- <u>Cálculo de las constantes de estimulación exponencial al flujo pasivo de protones.</u>	87
III.3.3.- <u>Estudio comparativo de las constantes de estimulación exponencial al flujo pasivo de protones (K) y la tolerancia al etanol según este método.</u>	90
III.3.4.- <u>Comparación entre las constantes de estimulación (K) y la inhibición de la fermentación debido a la acción del etanol.</u>	91
III.3.5.- <u>Cálculo del tiempo necesario para la estabilización del pH extracelular debido a la acción del etanol.</u> <u>Medida del pH extracelular.</u>	92
III.3.6.- <u>Comparación de los resultados obtenidos.</u>	98

III.3.7.- <u>Alteración por etanol de la actividad ATP-asa de la membrana plasmática. Cálculo de las tasas extrusión activa de protones, a través de la membrana</u>	99
III.3.8.- <u>Comparación entre las tasas de extrusión activa de protones (K_p) en las cinco estirpes ensayadas.</u>	105
III.4.- CÁLCULO DE LA TOLERANCIA AL ETANOL MEDIANTE EL ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ALTERACIONES DE LOS FLUJOS DE SALIDA DE LOS COMPUESTOS INTRACELULARES QUE ABSORBEN A 260 NM , DEBIDO A LA ACCIÓN DEL ETANOL.	106
III.4.1.- <u>Estudio de la salida de los compuestos intracelulares que absorben a 260 nm, en presencia de etanol.</u>	107
III.4.2.- <u>Medida de la viabilidad celular mediante determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina.</u>	113
III.4.3.- <u>Medida de las tasas de salida de los productos intracelulares que absorben a 260 nm (K_p^x).</u>	118
III.4.4.- <u>Calculo de las constantes exponenciales de estimulación de salida de productos intracelulares que absorben a 260 nm (E).</u>	124

III.4.5.- <u>Estudio comparativo entre los diferentes valores de la constante exponencial de estimulación (E) y la tolerancia al etanol, según este método.</u>	126
III.4.6.- <u>Comparación entre las constantes exponenciales de estimulación de salida de productos intracelulares que absorben a 260 nm. (E) y la inhibición de la fermentación.</u>	128
III.4.7.- <u>Alteraciones en la cinética de salida de A_{260} a concentraciones de etanol superiores al 15 %.</u> . . .	129
III.4.8.- <u>Salida de compuestos intracelulares que absorben a 260 nm a tiempos muy cortos.</u>	130
III.4.9.- <u>Valoración espectrofotométrica del conjunto de los compuestos intracelulares que absorben a 260nm. Por lisado celular por calor.</u>	134
III.4.10.- <u>Ajuste a un modelo cinético de salida de compuestos a_{260}.</u>	136
IV.- DISCUSION	141
V.- CONCLUSIONES.	163
VI.- BIBLIOGRAFIA.	169

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

I.1.- LEVADURAS Y FERMENTACIÓN.

Las levaduras son hongos unicelulares capaces de producir, en su metabolismo, grandes cantidades de etanol, tolerarlo y seguir desarrollándose a concentraciones a las que otros microorganismos son incapaces de sobrevivir. Las levaduras han sido utilizadas empíricamente desde tiempos muy remotos por las civilizaciones humanas. Ya en el año 6.000 a J.C, la civilización mesopotámica obtenía bebidas alcohólicas semejantes a las cervezas y vinos actuales.

También los egipcios, de forma empírica utilizaban levadura procedente de la fabricación de la cerveza para hacer más esponjosa la masa del pan.

La producción de bebidas alcohólicas utilizando levaduras, por fermentación de azúcares es, por tanto, una de las aplicaciones de la biotecnología, más antiguas y de gran importancia económica. En la actualidad, la bioproducción de etanol como carburante presenta también interés comercial y ecológico, como alternativa a los combustibles tradicionales, más caros y con mayores riesgos de contaminación ambiental.

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levadura que ha sido empleada empíricamente desde tiempos muy antiguos en la obtención de bebidas alcohólicas,

tales como vino y cerveza, hasta que Pasteur abordó el estudio de las fermentaciones con una perspectiva y metodología científicas.

La fermentación alcohólica implica la degradación de las hexosas, por la vía glicolítica, hasta piruvato y, posteriormente, la actuación de las llamadas enzimas alcohologénicas, que producen etanol como producto final de la fermentación, regenerando el poder reductor, en forma de NAD^+ .

En la fermentación en batch (cultivo no continuo), las tasas de glicolisis y de producción de etanol, por unidad de proteína celular, son muy elevadas en las etapas iniciales, para descender progresivamente, a medida que el etanol producido comienza a acumularse en el medio de cultivo (Moulin y col. 1984; Van Uden, 1985; Dombeck e Ingram, 1987).

Este descenso comienza a concentraciones extracelulares de etanol relativamente bajas - entre 1 % y 2 % (p/v) - (Dombeck e Ingram, 1988 y 1989). Según estos autores, cuando el etanol extracelular alcanza una concentración del 5%, tiene lugar una pérdida del 50% de la actividad metabólica.

El descenso en la actividad fermentativa coincide con la transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria de crecimiento (Dombeck e Ingram, 1987), y esta transición supone numerosos cambios fisiológicos, pues la

maquinaria celular cambia de una actividad biosintética intensa a una actividad, fundamentalmente, de mantenimiento.

Los primeros estudios sobre la inhibición de la fermentación datan de principios de este siglo. Brown, en 1905 (revisión de Ingram y Butke, p.287), examinó los efectos de los productos no gaseosos de la fermentación, comprobando que los productos volátiles, fundamentalmente etanol, eran los más inhibitorios sobre el crecimiento de las levaduras. Sin embargo, este mismo autor concluyó, tras varios trabajos posteriores, que era el dióxido de carbono y no el etanol el responsable de la inhibición del crecimiento.

Estudios posteriores, realizados por Richards, en 1928, y Rahn, en 1929, demostraron sin lugar a dudas, que era el etanol el compuesto que provocaba la inhibición del crecimiento celular. Gray, en 1941, confirmó esta inhibición por etanol y demostró que estirpes diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, variaban sensiblemente en su resistencia al etanol.

Dado que el etanol es uno de los productos finales de la fermentación, es lógico que algunos investigadores sugirieran que la inhibición del crecimiento observada era consecuencia de una retroinhibición. Troyer (1955), tratando de comprobar esta hipótesis, estudió el crecimiento de varias estirpes de *S. cerevisiae* en presencia de metanol, concluyendo, en palabras del propio autor, que: "LA

ACCIÓN INHIBITORIA DEL ETANOL SOBRE LA UTILIZACIÓN DE LA GLUCOSA PUEDE ESTAR ASOCIADA CON SUS PROPIEDADES COMO MIEMBRO DE UNA CLASE GENERAL DE SUSTANCIAS, MAS QUE CON SU FUNCIÓN DE METABOLITO DE LA LEVADURA".

Los resultados de Troyer fueron, posteriormente, confirmados por Gray y Sova (1956) al estudiar, utilizando 14 alcoholes diferentes por su tamaño y polaridad, la tolerancia al etanol como disminución del consumo de glucosa, en lugar de inhibición del crecimiento celular, observando que la concentración de alcohol necesaria para disminuir al 50 %, el consumo de glucosa, era inversamente proporcional al tamaño del alcohol.

No obstante, se ha aceptado que la acumulación extracelular de etanol en el medio de cultivo es la causa del descenso en la fermentación (Gray, 1941, Bazua y Wilke, 1977; Ghose y Tyagy, 1979; Brown y cols., 1981; Luong, 1985). Por ello, el paso siguiente en las investigaciones fue la búsqueda de mecanismos por los cuales el etanol producido inhibía la fermentación.

Los estudios iniciales mostraron que el etanol incidía sobre múltiples dianas celulares, pues hay varios procesos fisiológicos que resultan afectados por la presencia de etanol extracelular.

Estos resultados eran esperables si tenemos en cuenta la capacidad del etanol de interaccionar con proteínas y lípidos fundamentalmente, dado su carácter de disolvente y de agente desnaturizante. Además, se ha podido comprobar su capacidad de inducir mutaciones, tal como la mutación "petite" (Bacila y Horii, 1979), así como de variar los parámetros de crecimiento de las estirpes, tales como temperatura óptima y termotolerancia (Coote y cols., 1991).

La genética de la tolerancia al etanol es poco conocida por su complejidad. Aguilera y Benitez (1986), hicieron un estudio en el que seleccionaron mutantes de *S. cerevisiae*, sensibles a etanol, que eran incapaces de crecer a concentraciones de etanol a las cuales crecía el tipo silvestre. Aislaron 21 mutantes monogénicos sensibles a etanol, lo que es indicativo de que un gran número de genes están implicados en la tolerancia a etanol. Según las estimaciones de estos autores, probablemente sean más de 250 genes. De lo que deducen que *S. cerevisiae* posee un gran número de proteínas implicadas en la tolerancia a etanol.

Es interesante resaltar que al menos un tercio de los mutantes sensibles a etanol presentaban termosensibilidad.

Otro aspecto, que complica el abordaje genético de la selección de estirpes tolerantes a etanol, es el hecho de que la capacidad de producción de etanol es

independiente de la tolerancia (D'Amore y Steward, 1987). Así, estirpes muy tolerantes pueden tener un rendimiento bajo en producción de etanol, o viceversa.

Hasta el momento, se han realizado estudios de selección de estirpes tolerantes a etanol mediante:

1. Fusión de protoplastos
2. Obtención de híbridos entre parentales homotálicos y estirpes heterotálicas.

Los resultados obtenidos no han sido muy satisfactorios, pero han confirmado que la producción de etanol y la tolerancia al mismo son dos fenómenos genéticamente independientes.

Desde una perspectiva aplicada, la selección de estirpes tolerantes continúa haciéndose mediante enriquecimiento en cultivo continuo.

I.2.- MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL ETANOL.

La bibliografía existente coincide en afirmar que el etanol inhibe el crecimiento y la fermentación en *Saccharomyces* de forma no competitiva

(Kalmokoff y Ingledew, 1985; Brown y cols., 1981; Jones y Greenfield, 1984; Aiba y Shoda, 1969; Zines y Rogers, 1971). Es decir, el etanol afecta a las tasas específicas de crecimiento y fermentación máximas, pero no a la afinidad por el sustrato.

Sin embargo, existe diversidad de opiniones sobre la cinética de esta inhibición que, dependiendo de los resultados experimentales de diferentes equipos de trabajo, se ha referido como lineal (Ghose y Tyagi, 1979, Hope y Hansford, 1984; Roman y cols., 1984), exponencial (Jones y Greenfield, 1984; Aiba y Shoda, 1968 y 1969; Loureiro-Dias y Peinado, 1982; Leao y van Uden, 1982, Moulin y cols., 1980; Sa-Correia & van Uden, 1983), hiperbólica (Brown y cols., 1981; Mota y cols., 1984; Novak y cols., 1981), u otras cinéticas mas complejas (Brown y cols., 1981).

La inhibición de la actividad fermentativa por etanol, que tiene lugar en la fermentación en batch, como cuando el etanol se añade al medio de cultivo, es compleja. Los efectos sobre la tasa específica de crecimiento de la población (Thomas y Rose, 1979; Aguilera y Benítez, 1985), la viabilidad celular (Thomas y cols, 1978) y la tasa específica de fermentación (Luong, 1985; Thomas y cols, 1978) son diferentes, siendo la tasa de fermentación el factor menos afectado de los tres.

La fermentación de glucosa hasta etanol implica una serie de reacciones enzimáticas coordinadas, cuyos requerimientos generales serían los siguientes:

1. Transporte adecuado de nutrientes.
2. Enzimas funcionales.
3. Nucleótidos (NAD⁺, AMP, ADP y ATP).
4. Cofactores (Mg⁺⁺, Zn⁺⁺).
5. pH interno apropiado.
6. Membrana plasmática funcional, capaz de mantener la concentración intracelular adecuada de iones, reactivos y enzimas.

Se ha estudiado el efecto del etanol sobre todos estos factores, siendo la información bibliográfica existente la que se recoge en la tabla de la página siguiente.

La bibliografía existente sobre los efectos del etanol en levaduras está referida, casi exclusivamente, a *Saccharomyces cerevisiae* por ser la especie más resistente a etanol y por razones obvias de índole aplicada.

Existe muy poca información bibliográfica sobre el efecto del etanol en otras especies de levaduras, si bien se han ensayado algunos otros géneros, como

Kluyveromyces y *Pichia*, para realizar fermentación alcohólica sobre sustratos de interés industrial (Margaritis y cols., 1982; Slininger y cols., 1991).

I.3.- DETERMINACION DE LA TOLERANCIA A ETANOL

Como se ha concretado, las bases fisiológicas de la acción del etanol sobre las células de levadura son múltiples y complejas.

Uno de los métodos empleados para definir la tolerancia al etanol es determinar la concentración de etanol que suprime completamente el crecimiento (Ranganathan y Bhat, 1958; Inoue y cols., 1962; Day y cols., 1975; White, 1978; Rose, 1980).

Asimismo, la tolerancia puede determinarse por los efectos del etanol sobre la viabilidad celular, utilizando la tasa de pérdida de viabilidad celular, en presencia de etanol, como criterio. Kalmokoff e Ingledew (1985), comprobaron que el etanol afectaba a la viabilidad celular, en función del estado de crecimiento de las células, siendo más resistentes las células en fase estacionaria que aquellas que se encontraban en fase exponencial. También se pudo comprobar que las condiciones nutricionales, del medio de cultivo, afectaban a la tasa de pérdida de viabilidad celular.

EFECTOS DEL ETANOL SOBRE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

- Inhibición no competitiva del transporte de maltosa (Loureiro-Dias y Peinado, 1982).
- Inhibición del transporte de iones amonio (Iglesias y cols., 1991; van Uden y cols., 1984).
- No alteración del transporte de glucosa, hasta concentraciones de etanol 2M (Pascual y cols., 1988)
- Inhibición del consumo de glucosa y otros nutrientes (Rose y cols., 198).
- Inhibición del transporte de xilosa en *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis*. (9 y 23 en F.10).
- Inhibición del transporte de aminoácidos (Van Uden y cols., 1984).
- Inhibición de las actividades piruvato kinasa y hexokinasa, a concentraciones superiores a 3M de etanol (Pascual y cols., 1988).
- No inhibición de las actividades de las enzimas glicolíticas hasta concentraciones de 12 % de etanol (Millar y cols., 1982).
- Inhibición de hexokinasa, como consecuencia de acumulación de AMP a concentraciones bajas de etanol (Alterthum y cols., 1989).
- Variación en las concentraciones intracelulares de nucleótidos de adenina (Lee y Lewis, 1968; Dombek e Ingram, 1988)
- Descenso en la concentración intracelular de Mg^{2+} , en la bacteria *Zymomonas mobilis* (Osman e Ingram, 1985)
- Desacoplamiento del transporte electrónico secundario (Van Uden y cols., 1984).
- Variación del pH intracelular en células desenergizadas (Loureiro-Dias y Santos, 1990).
- No alteración del pH intracelular en presencia de glucosa (Dombek e Ingram, 1987).
- Inhibición no competitiva de la actividad ATP-asa de membrana (Cartwright y col, 1987; Pascual y cols., 1988).
- Activación de la ATP-asa de membrana (Sa-Correia y cols., 1991)
- Estimulación del flujo pasivo de protones a través de la membrana plasmática (Leao y Van Uden, 1984; Jiménez y Van Uden, 1985).
- Estimulación del flujo de salida de compuestos que absorben a 260 nm (nucleótidos, nucleósidos y aminoácidos) (Salgueiro y col, 1988; Osman e Ingram, 1985).

Otro criterio para definir la tolerancia es el nivel máximo de etanol

producido. Este método ha sido aplicado preferentemente a estirpes de *Saccharomyces* empleadas en fermentaciones tipo sake (Casey y cols., 1986).

El método aceptado como más operativo, desde un punto de vista aplicado, define la tolerancia como el efecto del etanol en la actividad fermentativa, determinando la relación entre la actividad fermentativa en ausencia y en presencia de una concentración dada de etanol.

La determinación de la tolerancia al etanol de una estirpe concreta es una característica fundamental, desde una perspectiva aplicada. Por ello, numerosos autores han buscado un método que, de forma sencilla e inequívoca, permita predecir la tolerancia a etanol, sin necesidad de recurrir a la propia eficacia de la fermentación. Los distintos métodos de determinación de tolerancia propuestos, están basados en la acción del etanol sobre una determinada estructura o proceso diana, pero, hasta el momento, no ha sido hallado un método aceptado universalmente, a pesar de que se han propuesto varios.

I.4.- DETERMINACIÓN DE TOLERANCIA POR INHIBICIÓN DE LA FERMENTACIÓN.

Otro método para definir la tolerancia al etanol, se basa en la relación existente entre las actividades fermentativas, de las estirpes, en medios con ausencia y presencia de etanol, a una determinada concentración (Nojiro y Ouchii, 1962). Según este método, se aprecian pocas diferencias en la tolerancia de estirpes vínicas, cerveceras, de destilerías o de panificación de *Saccharomyces*.

Este método tiene el inconveniente de que no expresa, directamente, la tolerancia al etanol en términos absolutos, ni tampoco refleja la cinética de la inhibición, como indica Casey (1986).

En el marco de la inhibición fermentativa, también se ha definido la tolerancia como la concentración de etanol que inhibe totalmente la fermentación (Curtain y cols., 1984).

Por último, se ha establecido un parámetro, denominado IF_{50} , para valorar la inhibición por etanol; este parámetro representa el valor de la concentración de etanol necesaria para inhibir la actividad fermentativa un 50 % (Kalmokoff e Ingledew, 1985).

I.5.- DETERMINACION DE TOLERANCIA POR LA ALTERACION DE LA MEMBRANA PLASMATICA.

Varios de los métodos propuestos para determinar la tolerancia al etanol están basados en la interferencia del mismo con los procesos fisiológicos dependientes de membrana, pues éstas, y en particular la membrana plasmática, son consideradas como dianas primarias de la acción del etanol (Thomas y cols., 1978; Thomas y Rose, 1979; Ingram y Buttker, 1984).

Entre estos métodos podemos citar los siguientes:

1.- Inhibición no competitiva del transporte de nutrientes:

Aminoácidos (Thomas y Rose, 1979; Leao y van Uden, 1984a). Iones amonio (Leao y Van Uden, 1983). Maltosa (Loureiro Dias y Peinado, 1982). Glucosa (Thomas y Rose, 1979; Leao y van Uden, 1982).

2.- Disipación del gradiente protonico transmembrana.

Inhibición de la actividad ATP-asa de membrana (Cartwright y cols., 1986). Descenso de la extrusión neta de protones hacia el exterior celular (Pascual y cols., 1988). Estimulación de la difusión pasiva de protones hacia el interior celular (Leao y van Uden, 1984; Jiménez y van Uden, 1985).

3.- Disminución de la barrera de permeabilidad de la membrana:

Estimulación de la salida de aminoácidos y compuestos intracelulares que absorben a 260 nm (Salgueiro y cols., 1988).

I.6.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.

La determinación de la tolerancia a etanol en levaduras de utilización industrial es un paso necesario para la selección de estirpes de interés biotecnológico.

El hecho de no existir en la actualidad un método aceptado con carácter universal para cuantificar la sensibilidad o resistencia al etanol, ha llevado a algunos autores a la búsqueda de métodos, rápidos y sencillos, que permitan una primera selección de estirpes, antes de ensayar la inhibición de la actividad fermentativa.

Estos métodos de selección rápida han sido diseñados y probados, fundamentalmente, en especies del género *Saccharomyces*, que son levaduras cuya elevada tolerancia al etanol ha sido comprobada ampliamente.

En el presente trabajo nos proponemos comprobar si dos de los métodos propuestos, uno basado en la estimulación por etanol del influjo pasivo de protones, y otro basado en la estimulación por etanol de la velocidad de salida de compuestos intracelulares, que absorben a 260 nm, son aplicables a otros géneros de levaduras, cuya tolerancia al etanol es menor.

Hemos seleccionado estos dos métodos para su estudio, en primer lugar, porque se basan en alteraciones de la permeabilidad de la membrana citoplásmica, que es, en células de levaduras, una de las principales dianas de acción del etanol. Y en segundo lugar, por la sencillez de los mismos, lo que les hace muy adecuados para su posible utilización como métodos de rutina en la selección de estirpes.

Como pauta de comparación de los resultados obtenidos en la aplicación de ambos métodos, hemos realizado el estudio cuantitativo de la inhibición de la tasa de fermentación por etanol, en las cinco estirpes de levaduras estudiadas.

MATERIAL Y METODOS

II. MATERIAL Y MÉTODOS.

II.1.- MICROORGANISMOS.

Las estirpes de levaduras utilizadas en este trabajo son las siguientes:

Saccharomyces cerevisiae IGC 3507

Candida utilis IGC 3092

Candida pseudotropicalis IGC 3282

Pichia stipitis IGC 4374

Kluyveromyces marxianus IGC 2671

Estas estirpes fueron proporcionadas por el Instituto Gulbenkian de Ciencia. Oeiras. Portugal.

II.2.- MEDIOS DE CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO.

Para el crecimiento de todas las estirpes de levadura se utiliza el medio YPD, cuya composición es la siguiente:

Glucosa	20.0 g
Extracto de levadura	10.0 g
Peptona	10.0 g
Agua destilada	1.0 l

Para el mantenimiento de la colección, y en aquellos casos que se utilizan cultivos en medio sólido, se emplea el mismo medio de cultivo suplementado con agar bacteriológico al 2.0 %.

La esterilización se realiza en autoclave, a 110°C durante 15 minutos.

II.5.- OBTENCION DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO.

II.5.1.- Determinaciones turbidimetricas

El crecimiento se determina midiendo el aumento de Densidad Optica a 640 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Ray Co.), utilizándose como blanco el propio medio de cultivo estéril.

El seguimiento de las variaciones turbidimétricas se realiza en un intervalo de 24 horas, tomándose muestras cada 2 horas.

Todos los ensayos se realizan por duplicado.

II.5.2.- Calculo de la tasa especifica de crecimiento.

El crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo puede ser descrito por la siguiente ecuación:

$$dx/dt = \mu \cdot x$$

$$\mu = (dx/dt) \cdot 1/x$$

La relación dx/dt es la tasa de crecimiento del microorganismo, siendo:

x = D.O. instantánea del cultivo

t = tiempo transcurrido de crecimiento.

μ es una constante de proporcionalidad denominada *tasa o velocidad específica de crecimiento*.

Cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial se cumple que:

$$x = x_0 \cdot e^{\mu t}$$

En las determinaciones del crecimiento microbiano, la tasa específica de crecimiento se puede obtener calculando el valor del tiempo de duplicación de la población microbiana (t_d). Así:

$$\mu = \ln 2 / t_d$$

El tiempo de duplicación se determina gráficamente y corresponde al intervalo de tiempo necesario para que x sea igual a $2x_0$.

La tasa específica de crecimiento se determina calculando la recta de regresión logarítmica de los valores de D.O. frente al tiempo, el valor de la pendiente corresponde a la tasa específica de crecimiento.

II.5.3.- Determinación del peso seco celular.

Se realiza siguiendo el método propuesto por Peinado y van Uden (1977), para levaduras, calculándose el valor aproximado del peso seco celular correspondiente a un valor de Densidad Óptica, a partir de la siguiente relación:

$$\text{D.O.} \times 1.000 = \mu\text{g/ml aprox.}$$

II.5.4.- Determinación del número de microorganismos totales.

A partir de un cultivo en YPD de las directas estirpes en fase exponencial, se preparan 5 diluciones, midiéndose la D.O. a 640 nm.

Se deposita una gota de cada dilución en una cámara de recuento Burkler, colocándose el cubreobjetos con una suave presión (Anillos de Newton). La cámara presenta celdillas de dos tamaños: 0.04 mm² y 0.0025 mm². La distancia entre porta y cubre es de 0.100 mm.

Se cuentan , al menos, 80 celdillas en las que el número de células sea inferior a 10.

II.6.- TECNICAS MANOMETRICAS.

El respirómetro Warburg utilizado (Braun, V-166), consta de un baño de agua termostático, con un sistema para mantener el conjunto manómetro-matriz en agitación. La temperatura del agua se mantiene a 28°C en todos los ensayos.

Los matraces, de forma cónica, son de 13.0 ml de volumen, con un pocillo central en el que se introduce, en los ensayos que lo requieran, un papel de filtro plegado e impregnado con KOH al 20.0 %. Los manómetros contienen líquido de Brodie. El conjunto está perfectamente sellado con grasa de silicona.

Los procedimientos empleados han sido los descritos por Umbreit y cols. (1964).

Se utiliza como termobarómetro, uno de los manómetros unido a un matraz que contiene unicamente un volumen de agua destilada, exactamente igual al resto de los matraces.

II.6.1.- Contenido de los matraces.

Se realizan dos series de experimentos :

En la primera se introducen, en los matraces, 2.0 ml de un cultivo de levaduras en YPD, en fase exponencial, conteniendo 0.4 mg peso seco/ml.

En la segunda, los matraces contienen 2.0 ml de una suspensión celular de levaduras (0.6 mg peso seco de células/ml) en tampón fosfato-fosfórico, 50.0 mM, pH 5.5, y glucosa a una concentración final de 100.0 mM.

Para la medida de la tasa de respiración, se añade KOH al 20.0 %, en el pocillo central.

II.6.2.- Procedimiento.

Una vez preparados los matraces, se disponen en el aparato, manteniéndose unos minutos los manómetros abiertos, hasta que la temperatura en los matraces es uniforme y constante. Posteriormente los matraces se cierran, y se comprueba durante unos minutos la actividad fermentativa, o respiratoria, de los microorganismos.

Transcurrido este tiempo, se añaden a los matraces 0.5 ml de agua destilada, en el caso del control, o una mezcla de agua destilada y etanol que permita obtener la concentración final de etanol deseada en los 2.5 ml de volumen total.

En los ensayos con células en crecimiento activo sobre YPD, la concentración de etanol empleada fué 2.0 M.

En los ensayos con células suspendidas en tampón fosfato 50.0 mM, pH 5.5, y glucosa 100.0 mM se prueban las concentraciones de: 2.5 %, 5.0 %, 7.5 % y 10.0 % (v/v).

Seguidamente los manómetros se cierran y enrasan ,tomándose lecturas de las variaciones manométricas.

En el primer experimento, la toma de muestras se efectúa a lo largo de 20 minutos, a intervalos de 5 minutos. En el segundo, la toma de muestras se realiza durante 60 minutos, a intervalos de 15 minutos.

Todos los ensayos se realizan por triplicado.

II.6.3.- Cálculo de las tasas de fermentación y respiración.

El aumento o disminución de la presión en los manómetros se mide por la diferencia de nivel del líquido de Brodie en las dos ramas del manómetro. Esta diferencia de nivel es directamente proporcional a la cantidad de CO₂ producido, o a la cantidad de O₂ consumido.

La cantidad de gas producido o consumido durante un ensayo viene dada por la expresión siguiente:

$$x = h.k$$

siendo:

x: volumen de gas en μl

h: variación observada entre las alturas manométricas

k: constante del matraz

Los valores de k se calculan para cada uno de los conjuntos matraz-manómetro, según la siguiente ecuación:

$$k = \frac{(V_g \cdot 273/T + V_l \cdot \beta)}{P_0}$$

siendo:

V_g = volumen de la fase gaseosa

V_l = volumen del líquido presente

β = coeficiente de solubilidad del gas en el líquido

P_0 = presión a la que se realiza el ensayo

T = temperatura a la que se realiza el ensayo.

Una vez calculados los valores de k y medidas las variaciones de altura en las ramas del manómetro, se calculó x . Habitualmente, estos resultados se dividen por 22.4, de forma que se expresan en μ Moles de gas.

El cálculo de la tasa de fermentación o respiración se realiza mediante ajuste por regresión lineal de los valores obtenidos de consumo o producción de gas frente al tiempo. Las tasa se expresan en: μ moles de gas/minuto.

II.6.4.- Cálculo de las tasas específicas de fermentación y respiración.

El cálculo de la tasa específica de fermentación y respiración se efectúa dividiendo el valor de la tasa correspondiente por el peso seco celular.

Las tasa específicas se expresan en: $\mu\text{moles de gas/g de peso seco celular /hora.}$

II.7.- DETERMINACION DEL FLUJO PASIVO DE PROTONES TRANSMEMBRANA.

II.7.1.- Procedimiento (Jimenez y van Uden, 1985).

A partir de un cultivo de 24 horas en YPD, incubado a 28 °C y una agitación de 200 rpm, se inocula un matraz de 250.0 ml, que contiene 50.0 ml del mismo medio y se incuba en las mismas condiciones hasta alcanzar una D.O. de 1.0, momento en el que el cultivo se encuentra en fase exponencial.

De este cultivo, se toman 150.0 ml y se recogen las células por centrifugación a 3000 rpm, 5 minutos y 5 °C (Sigma 6 K 10). Las células

obtenidas se lavan dos veces con agua destilada y se resuspenden en agua destilada, hasta un volumen final de 3.0 ml (50 mg/ml peso seco).

Se toman volúmenes de 0.5 ml de esta suspensión celular concentrada y se llevan a recipientes cerrados con tapón de rosca, a los que se añaden 0.5 ml de solución de glucosa al 20.0 % (p/v), y 4.0 ml de agua destilada, en el caso del control, o una mezcla de agua destilada y etanol hasta concentraciones finales de 2.5 %, 5.0 %, 7.5 % y 10.0 % (v/v).

Los viales se incuban en agitación a 200 rpm, a 28 °C, durante 75 minutos. Finalizado el tiempo de incubación, se determinan los valores de pH de las diferentes suspensiones celulares en un pH-metro Radiometer TTT-2b, conectado a un registro.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

II.7.2.- Determinación del tiempo de estabilización del pH extracelular.

Para comprobar el tiempo de estabilización del pH extracelular se procede de la siguiente manera:

Las suspensiones celulares se ajustan a un pH inicial de 7.0, de forma que las condiciones iniciales fueran semejantes para todas las estirpes.

Los valores del pH extracelular se determinaron durante 135 minutos, a intervalos de 15 minutos.

II.7.3.- Cálculo de las constantes de estimulación exponencial del flujo pasivo de protones (K).

Los autores Jimenez y van Uden (1985), proponen la siguiente ecuación:

$$\text{pH final} = \log C_0 - \log K_p + KX \log e$$

siendo:

pH final = valor del pH extracelular a los 75 minutos.

C_0 = constante de difusión de protones a través de la membrana de células no tratadas con etanol.

K_p = velocidad o tasa de extrusión activa de protones a través de la membrana en células energizadas.

K = constante de estimulación exponencial del flujo pasivo de protones. cd

X = concentraciones de etanol.

Según los mencionados autores, a concentraciones de etanol entre el 0 y el 10.0 % (v/v), se cumple que:

$$\log C_0 - \log K_p$$

es prácticamente constante, debido a que la tasa de extrusión activa de protones, en este rango de concentraciones, queda prácticamente inalterada.

Por ello, la ecuación que proponen estos autores es la ecuación de una recta.

$$\text{pH final} = A + KX \log e$$

Cuya pendiente es, $B = K \log e$ y $K = B / \log e$.

El valor de K es propuesto por los autores como factor de correlación inversa a la tolerancia de una estirpe al etanol.

II.8.- DETERMINACION DE LA EXTRUSION ACTIVA DE PROTONES.

II.8.1.- Procedimiento (Loureiro-Dias y Peinado, 1984).

Cultivos en fase exponencial, obtenidos según la técnica seguida en el apartado anterior, se ponen en contacto con etanol (concentración final 10.0 % v/v) durante 60 minutos. A partir de estos cultivos, se obtienen suspensiones celulares

concentradas, según la técnica descrita anteriormente, con una concentración celular de 5.0 mg/ml peso seco.

En vasos encamisados, para mantener la temperatura a 28 °C durante todo el ensayo, se colocan 10.0 ml de la suspensión celular concentrada, ajustándose el pH inicial a un valor de 5.0 con HCl 0.1 M. Después de que tiene lugar la estabilización al pH indicado, se añaden 100.0 µl de una solución de glucosa 1.0 M, con el fin de energizar las células. A continuación se registran las variaciones de pH extracelular mediante un registrador conectado al pHmetro.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

II.8.2.- Cálculo de la tasa de extrusión activa de protones

La tasa de extrusión activa de protones se obtiene calculando la pendiente, sobre la gráfica de acidificación, del tramo rectilíneo de la misma (20 segundos). La tasa de extrusión activa de protones viene, por tanto, expresada en nmoles de protones/segundo (Cartwright y cols., 1986).

Previamente se realiza un calibrado del registro gráfico utilizando HCl 10.0 mM, cada descenso gráfico de 1.0 mm equivale a 6.0 nmoles de protones.

II.8.3.- Cálculo de la tasa específica de extrusión activa de protones.

La tasa específica de extrusión activa de protones (K_p) se obtiene dividiendo el valor de la tasa de extrusión activa de protones por el peso seco celular.

La tasa específica de extrusión activa de protones, K_p , se expresa en: nmoles de protones/mg de peso seco celular/minuto.

El valor de K_p es considerado por los autores como factor de correlación directa con respecto a la alteración de la actividad de la ATP-asa de membrana citoplasmática, por efecto del etanol.

II.9.- DETERMINACION DE LA SALIDA DE LOS COMPUESTOS INTRACELULARES QUE ABSORBEN A 260 NM.

II.9.1.- Procedimiento (Loureiro y cols., 1988).

Se cultivan las estirpes ensayadas en matraces de 250 ml con 50 ml de YPD. Se incuban durante 24 horas a 28 °C y 200 rpm en un agitador orbital (Gallenkamp).

Con 50 ml de ese cultivo, se inoculan otros matraces de 1.0 l que contienen 500 ml de YPD. Se inoculan hasta alcanzar una D.O.=1.0. El cultivo se encuentra en fase exponencial de crecimiento.

Estos cultivos se centrifugan a 3000 rpm durante 5 minutos a 5 °C en una centrífuga refrigerada (Sigma 6K10).

El sedimento se resuspende en tampón fosfato 50.0 mM y pH=5.0, se lava, y se centrifuga posteriormente. El proceso se repete 2 veces.

El precipitado finalmente se resuspende en tampón fosfato 50.0 mM y pH 5.0, hasta alcanzar una biomasa de 0.94 mg peso seco celular/ml, que equivale a 5×10^7 células/ml (obtenido por recuento directo).

Se toman volúmenes de 100.0 ml de esta suspensión celular concentrada y se llevan a recipientes cerrados de vidrio de 500 ml y tapón de rosca.

A las suspensiones celulares se les incorpora etanol de manera que las concentraciones finales sean del 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 % (v/v). Las suspensiones celulares control no contienen etanol.

Los viales se mantienen en agitación a 200 rpm, a una temperatura de 28 °C, durante 90 minutos.

Se toman muestras de 5.0 ml de cada vial cada 15 minutos.

Cada muestra extraída se centrifuga, inmediatamente después de la extracción, a 4.500 rpm durante 3 minutos a 5 °C en centrífuga refrigerada (Sigma 6K10).

El sobrenadante se separa y se mide inmediatamente su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

Los ensayos se realizan por triplicado, para las distintas estirpes y diferentes concentraciones de etanol.

II.9.2.- Cálculo de la constante exponencial de estimulación de salida de productos intracelulares (E).

Los autores Salgueiro y cols. (1988) proponen que la velocidad o tasa de salida de compuestos que absorben a 260 nm es una función exponencial de la concentración del etanol.

$$K_e^x = K_e^{X_m} e^{E(X-X_m)} \quad (1)$$

Donde:

X = Valores de las concentraciones de etanol ensayadas.

X_m = Valor de la concentración mínima de etanol a la que se cumple la ecuación.

$K_e^{X_m}$ = velocidad de salida a través de la membrana de los compuestos intracelulares que absorben a 260 nm en una suspensión celular con una concentración de etanol X_m .

K_e^x = Velocidad de salida a través de la membrana de los compuestos intracelulares que absorben a 260 nm, en una suspensión celular a las distintas concentraciones de etanol ensayadas.

Los autores consideran constantes los valores X_m y $K_e^{X_m}$ para cada estirpe, siempre que las condiciones experimentales se mantengan constantes.

La ecuación (1) también se puede expresar así:

$$\ln K_e^x = \ln K_e^{X_m} + E (X - X_m)$$

Es decir, la ecuación de una recta

$$\ln K_e^x = A + E \cdot (X - X_m)$$

El valor de la constante exponencial de estimulación de salida de productos intracelulares que absorben a 260 nm (E) es propuesto por los autores como factor de correlación inversa a la tolerancia al etanol.

II.10.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA FOSFATASA ALCALINA.

II.10.1.- Procedimiento.

Una vez medida la absorbancia a 260 nm de las sobrenadantes estudiados, según lo descrito en el apartado anterior, se procede a determinar la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, en los mismos.

Se toman 250.0 μ l de cada una de las muestras estudiadas y se mezclan con 250.0 μ l de p-nitro fenil fosfato, 20.0 mM en tampón glicocola 0.1 M, pH 9.7, y 2.5 ml del mismo tampón.

La mezcla final se introduce en un tubo de vidrio con tapón de rosca, se cierra perfectamente y se incuba en un baño a 37 °C, durante 30 minutos. Se mide la liberación de p-nitro fenol a 420 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

La unidad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1.0 nmol de p-nitro fenol por ml de muestra y por minuto, en las condiciones de ensayo descritas.

II.11.- DETERMINACION DEL CONTENIDO CELULAR TOTAL DE LOS COMPUESTOS INTRACELULARES QUE ABSORBEN A 260 NM.

Se utilizan suspensiones celulares como las descritas en el apartado II.8.

Una muestra de 5.0 ml de la suspensión celular se introduce inmediatamente en un baño a 100 °C y se mantiene durante 15 minutos. A continuación se centrifuga a 4.500 rpm durante 3 minutos y se recoge el sobrenadante.

Se toman otras dos muestras de 5.0 ml de suspensión celular, se mantiene en agitación a 200 rpm y 28 °C en un agitador orbital Gallenkamp, durante 90 minutos. Una de las muestras contiene etanol a una concentración 10.0 % (v/v). A continuación se centrifugan a 4.500 rpm durante 3 minutos y se recoge el sobrenadante.

De todos los sobrenadantes se preparan diluciones 1/10.

En los sobrenadantes, y sus diluciones, se midió la absorbancia a 260 nm, en un espectrofotómetro UV (Shimadzu UV-160A).

Los ensayos se realizaron exclusivamente con la estirpe de *S. cerevisiae*.

RESULTADOS

III.- RESULTADOS.

III.1.- ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE LAS ESTIRPES ENSAYADAS.

III.1.- Determinación de la tasa específica de crecimiento.

El crecimiento de las cinco estirpes ensayadas se determinó midiendo la variación de la D.O. a lo largo del tiempo por los métodos ya descritos. Posteriormente, se llevó a cabo el cálculo de las tasas específicas de crecimiento, para cada una de las cinco estirpes ensayadas.

Los resultados obtenidos se representan en las gráficas 1, 2, 3, 4 y 5, y en la tabla 1.

Estirpes	μ (h ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i>	0.467
<i>C. utilis</i>	0.364
<i>C. pseudotropicalis</i>	0.575
<i>P. stipitis</i>	0.193
<i>K. marxianus</i>	0.249

Tabla 1.- Valores de las tasas específicas de crecimiento.

Curva de crecimiento de *S. cerevisiae*

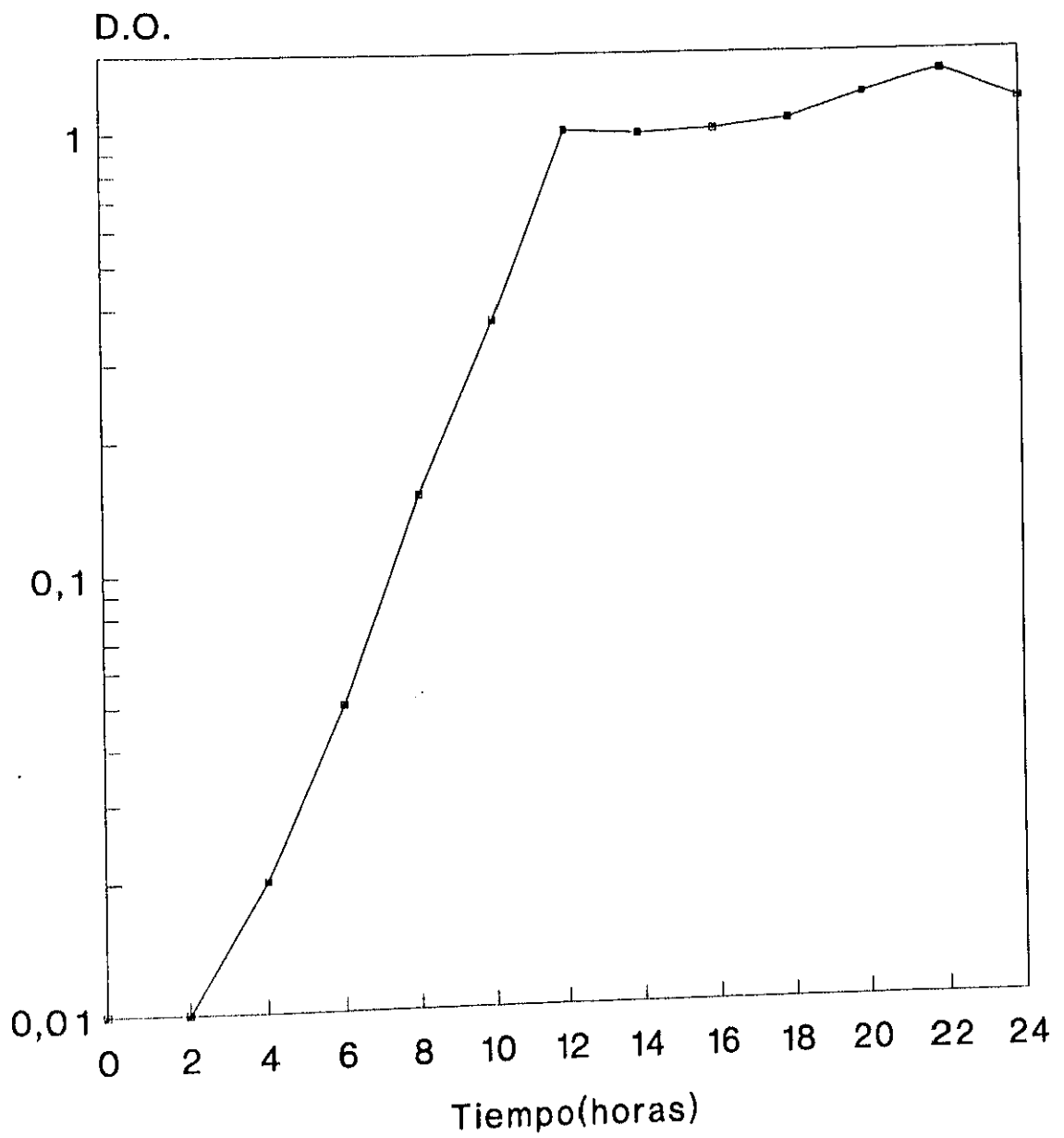


Figura 1.

Curva de crecimiento de *C.utilis*

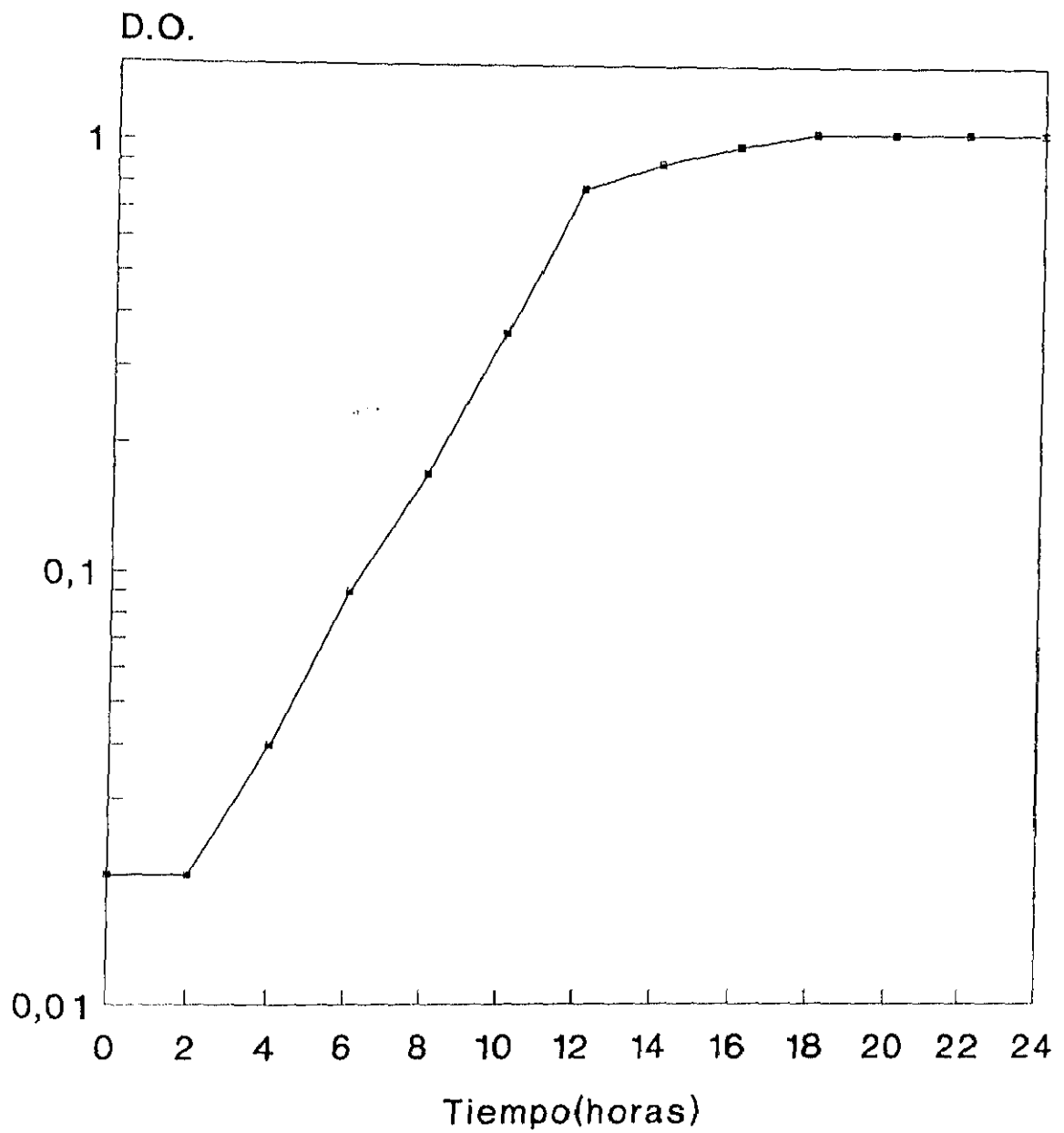


Figura 2.

Curva de crecimiento de
C. pseudotropicalis

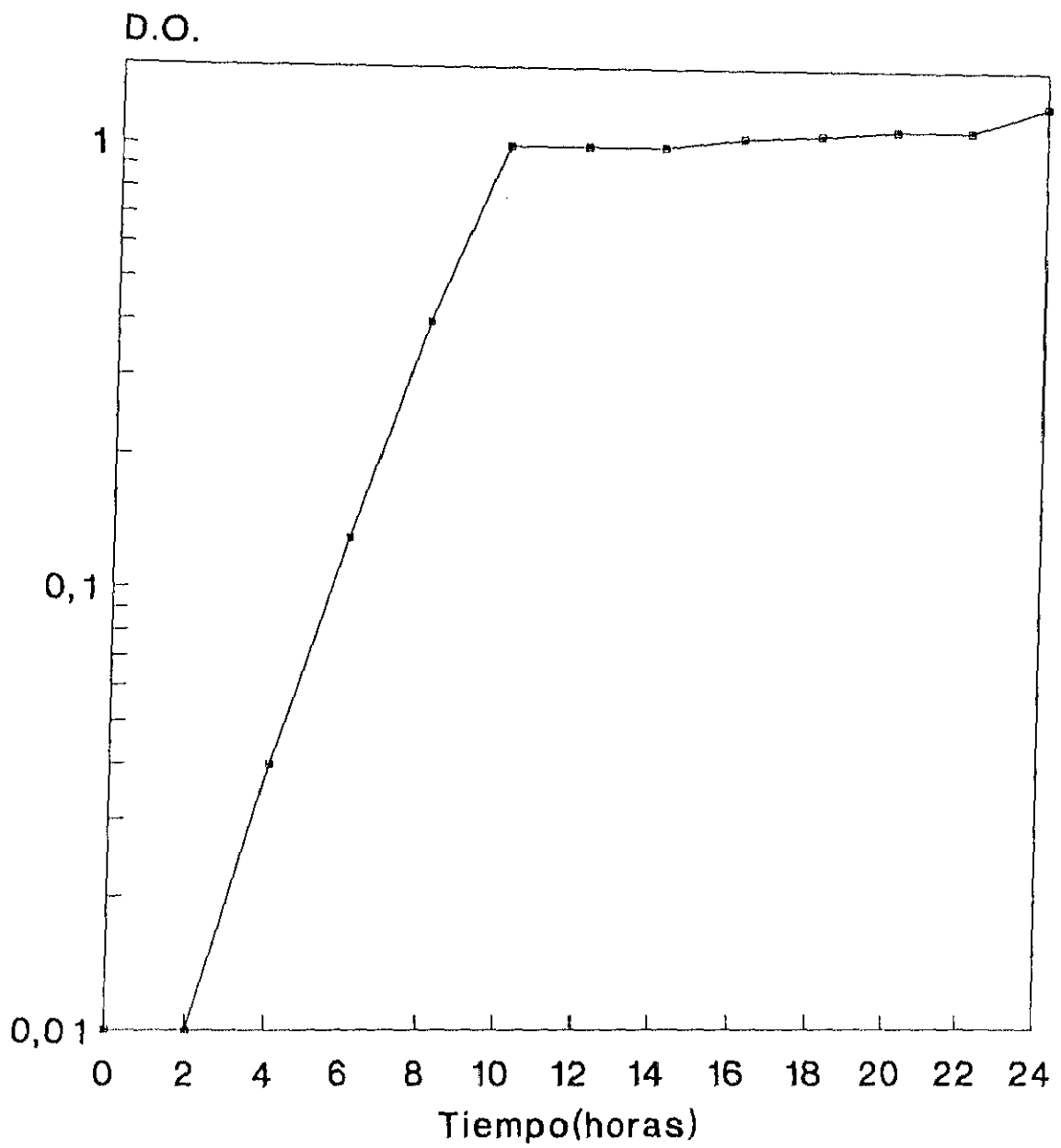


Figura 3.

Curva de crecimiento de *P. stipitis*

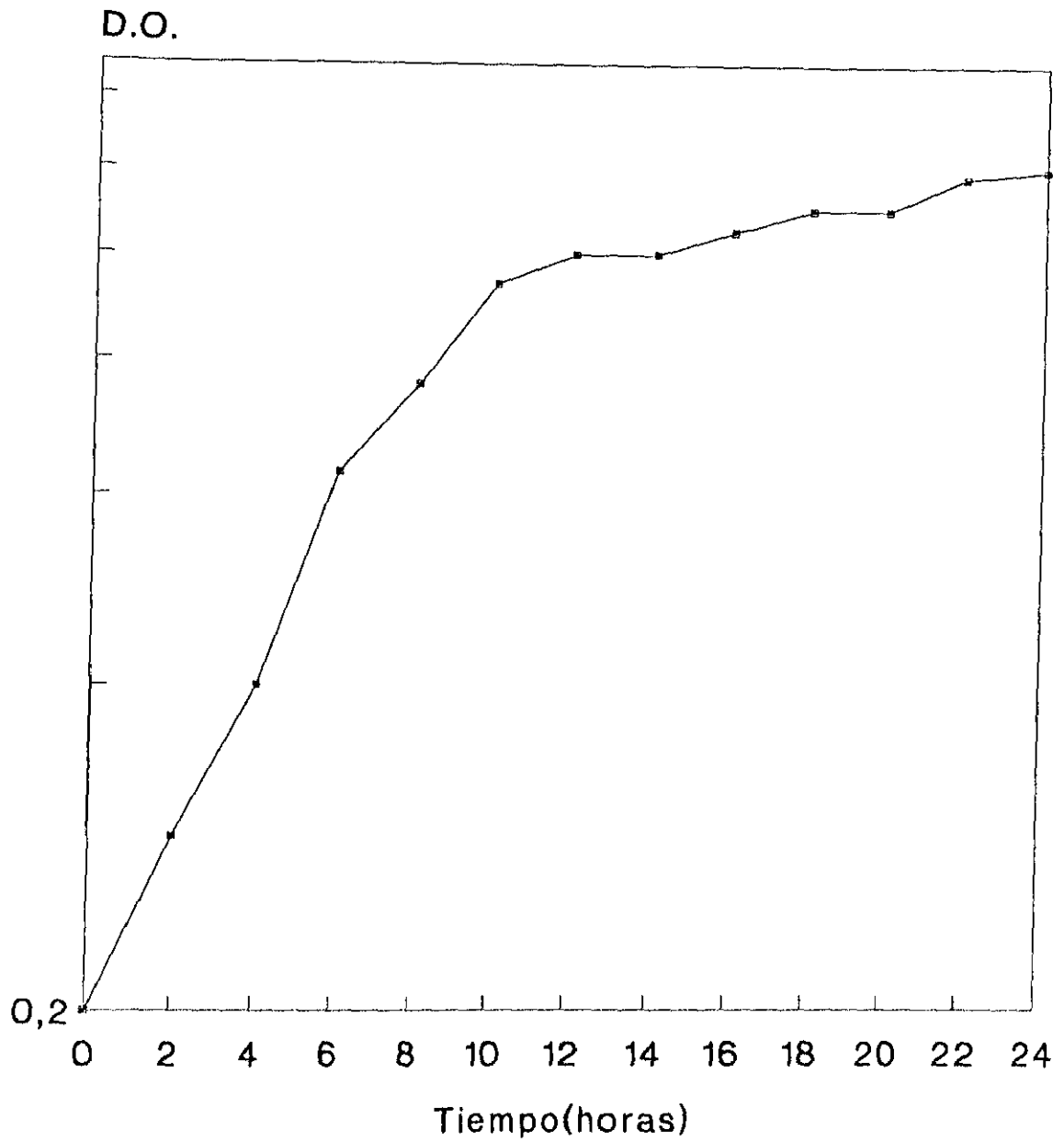


Figura 4.

Curva de crecimiento de *K. marxianus*

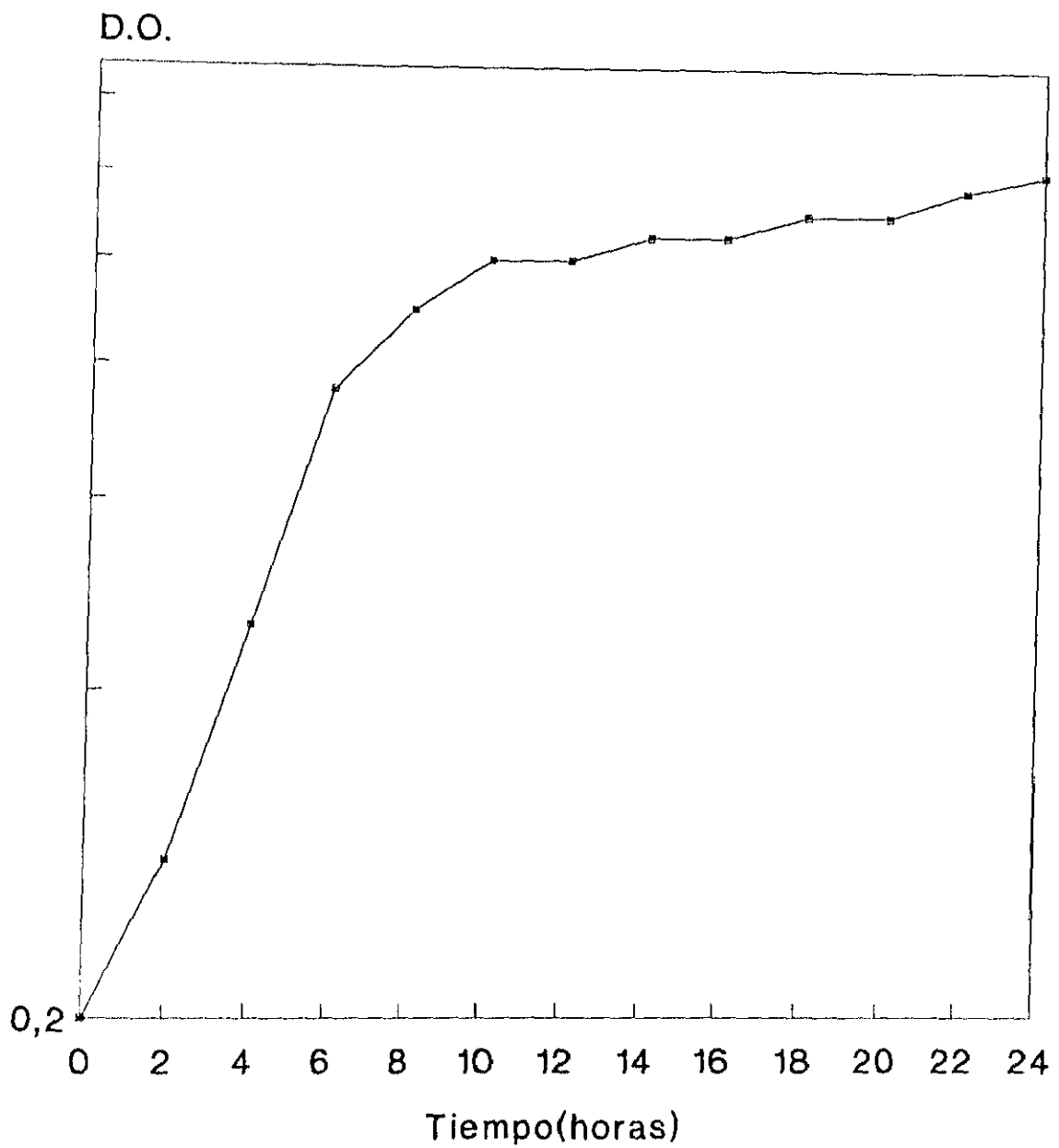


Figura 5.

III.2.- Medida de la relación entre el número de células y la D.O.

La relación entre el número de células y la densidad óptica (D.O.) se obtuvo mediante recuento directo al microscopio, de una suspensión de células en tampón fosfato.

Los resultados se exponen en las tablas 2, 3, 4, 5 y 6.

D.O.(640 nm)	nº células/ ml
0.000	0.00 x 10 ⁶
0.173	2.16 x 10 ⁶
0.266	3.02 x 10 ⁶
0.352	4.08 x 10 ⁶
0.413	4.29 x 10 ⁶
0.450	5.44 x 10 ⁶

Tabla 2.- Medida de la relación entre número de células y D.O. en *S.cerevisiae*.

Valores de la regresión lineal: $B= 11.277 \times 10^6$, $r= 0.99$.

D.O. (640 nm)	n° células/ ml
0.00	0.00 x 10 ⁶
0.178	3.50 x 10 ⁶
0.298	5.73 x 10 ⁶
0.383	6.83 x 10 ⁶
0.442	10.09 x 10 ⁶
0.479	10.84 x 10 ⁶

Tabla 3.- Medida de la relación entre el número de células y D.O. en *C. utilis*.

Valores de la regresión lineal: $B= 22.114 \times 10^6$, $r= 0.98$.

D.O. (640 nm)	n° células/ ml
0.000	0.00 x 10 ⁶
0.137	2.52 x 10 ⁶
0.221	3.82 x 10 ⁶
0.288	5.17 x 10 ⁶
0.323	7.20 x 10 ⁶
0.366	7.96 x 10 ⁶

Tabla 4.- Medidas de la relación entre el número de células y la D.O. en

C. pseudotropicalis.

Valores de la regresión lineal: $B= 21.403 \times 10^6$, $r= 0.99$

D.O. (640 nm)	n° células/ ml
0.00	0.00 x 10 ⁶
0.132	0.52 x 10 ⁶
0.212	0.78 x 10 ⁶
0.276	2.97 x 10 ⁶
0.327	3.12 x 10 ⁶
0.326	3.30 x 10 ⁶

Tabla 5.- Medidas de la relación entre el número de células y la D.O. en

P. stipitis.

Valores de la regresión lineal: $B= 9.220 \times 10^6$, $r= 0.98$.

D.O. (640 nm)	n° células/ ml
0.00	0.00 x 10 ⁶
0.089	2.92 x 10 ⁶
0.164	5.36 x 10 ⁶
0.216	7.88 x 10 ⁶
0.258	8.44 x 10 ⁶
0.287	9.11 x 10 ⁶

Tabla 6.- Medidas de la relación entre el número de células y la D.O. en

K. marxianus.

Valores de la regresión lineal: $B= 34.057 \times 10^6$, $r= 0.99$

III.2.- INHIBICIÓN DE LA FERMENTACIÓN Y RESPIRACIÓN POR EFECTO DEL ETANOL.

III.2.1.- Inhibición de la fermentación en presencia de etanol, en medio YPD.

Para obtener la medida de la inhibición de la fermentación en presencia de etanol, hemos utilizado técnicas manométricas tradicionales (respirómetro de Warburg) según la metodología previamente descrita.

El medio de fermentación en el que se realizaron los ensayos fue YPD, con la composición ya descrita. La concentración de etanol utilizada fué siempre 2 M.

La fermentación se mantuvo a lo largo de 20 minutos, determinándose los μmoles de CO_2 producido a lo largo de ese tiempo, para cada una de las estirpes.

Los resultados se exponen en las tablas 7, 8, 9, 10 y 11 y en las figuras 6, 7, 8, 9 y 10.

Inhibición de la fermentación en *S. cerevisiae*

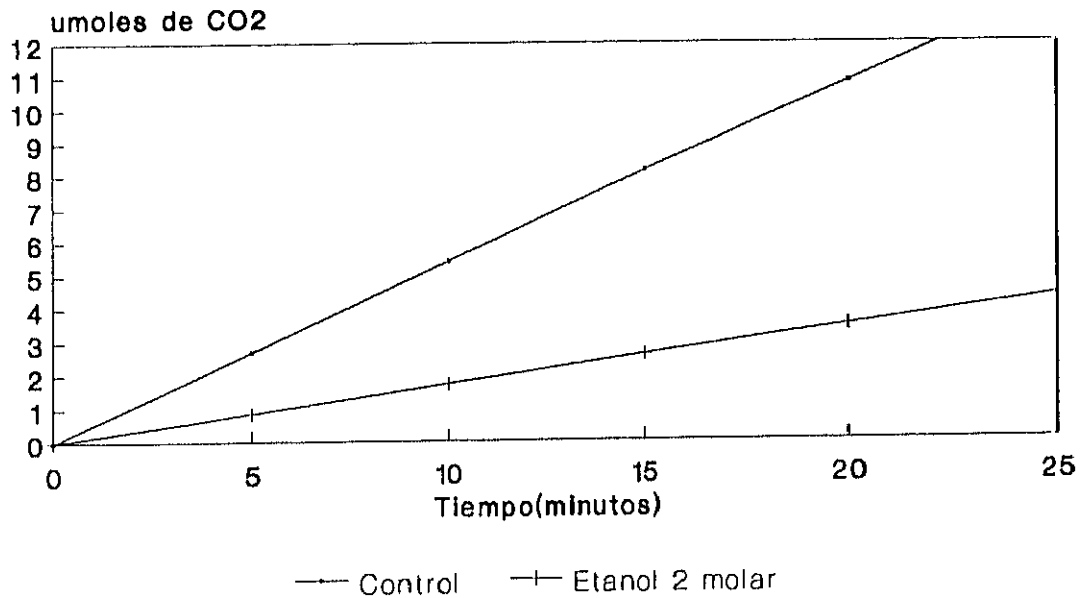


Figura 6.

Tiempo (minutos)	control	etanol 2M
0	0.000	0.000
5	2.710	0.865
10	5.421	1.729
15	8.129	2.596
20	10.841	3.459

Tabla 7.- Resultados de la fermentación sobre medio YPD en *S. cerevisiae*.

Los resultados vienen expresados en μmoles de CO_2 .

Valores de la regresión lineal para: Control: $B= 0.542$, $r= 0.99$
Etanol 2M: $B= 0.173$, $r=0.99$

Inhibición de la fermentación en *C. utilis*

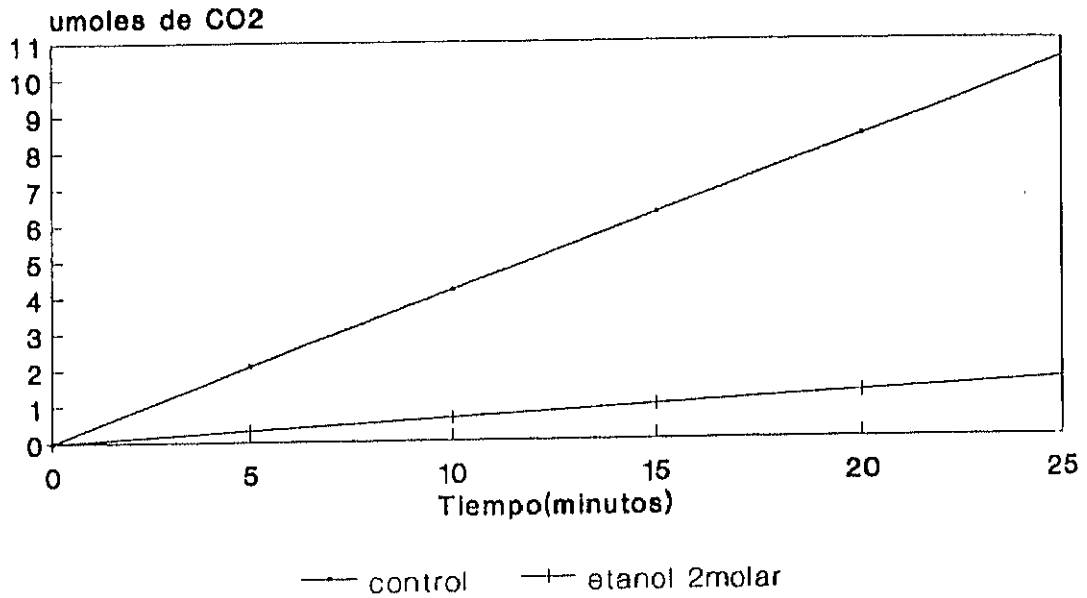


Figura 7.

Tiempo (minutos)	control	etanol 2M
0	0.000	0.000
5	2.095	0.320
10	4.191	0.639
15	6.284	0.961
20	8.380	1.270

Tabla 8.- Resultados de la fermentación sobre medio YPD en *C. utilis*.

Los resultados vienen expresados en μmoles de CO₂.

Valores de la regresión lineal para: Control: B= 0.419, r= 0.99
Etanol 2M: B= 0.064, r=0.99

Inhibición de la fermentación en *C. pseudotropicalis*

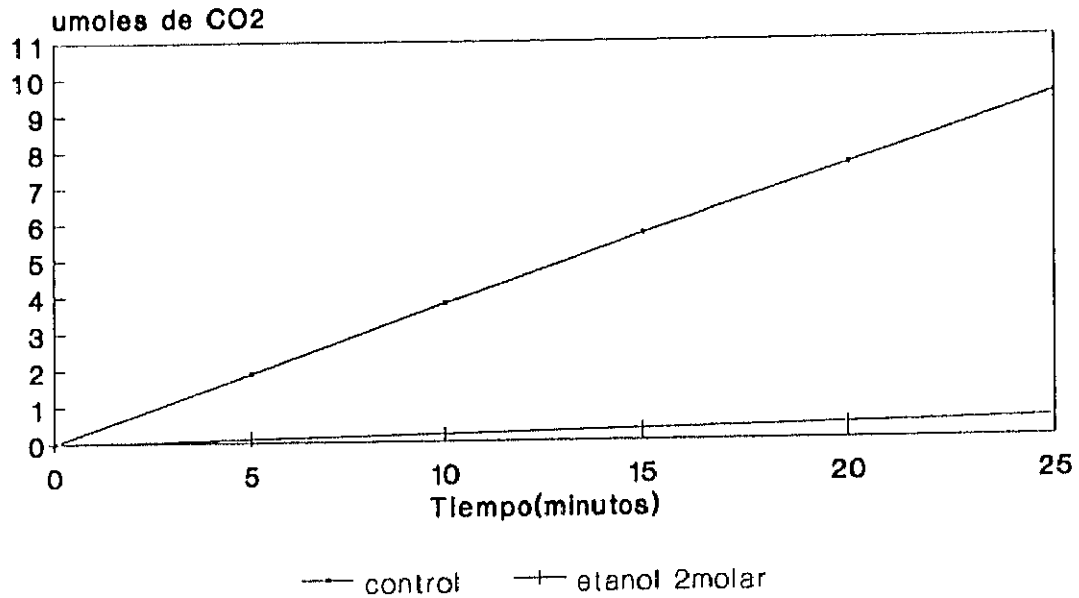


Figura 8.

Tiempo (minutos)	control	etanol 2M
0	0.000	0.000
5	1.890	0.105
10	3.778	0.209
15	5.673	0.316
20	7.561	0.420

Tabla 9.- Resultados de la fermentación sobre medio YPD en *C. pseudotropicalis*.

Los resultados vienen expresados en μmoles de CO₂.

Valores de la regresión lineal para: Control: $B= 0.378$, $r= 0.99$
Etanol 2M: $B= 0.021$, $r=0.99$

Inhibición de la fermentación en *P. stipitis*

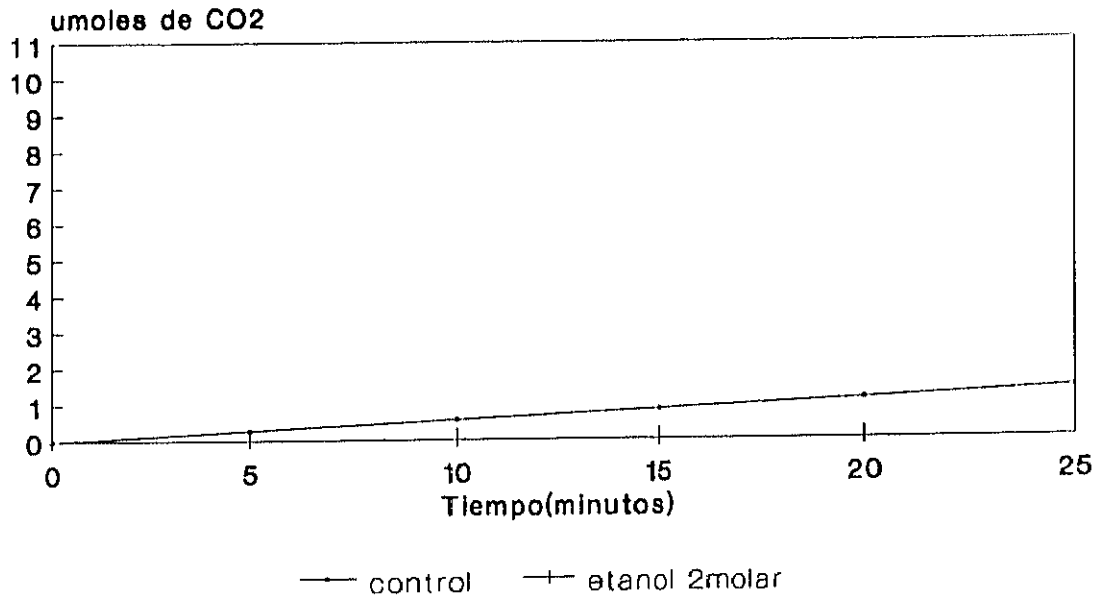


Figura 9.

Tiempo (minutos)	control	etanol 2M
0	0.000	0.000
5	0.274	0.000
10	0.552	0.000
15	0.825	0.000
20	1.103	0.000

Tabla 10.- Resultados de la fermentación sobre medio YPD en *P. stipitis*.

Los resultados vienen expresados en $\mu\text{moles de CO}_2$.

Valores de la regresión lineal para: Control; $B= 0.055$, $r= 0.99$
Etanol 2M: $B= --$, $r= --$

**Inhibición de la fermentación en
*K. marxianus***

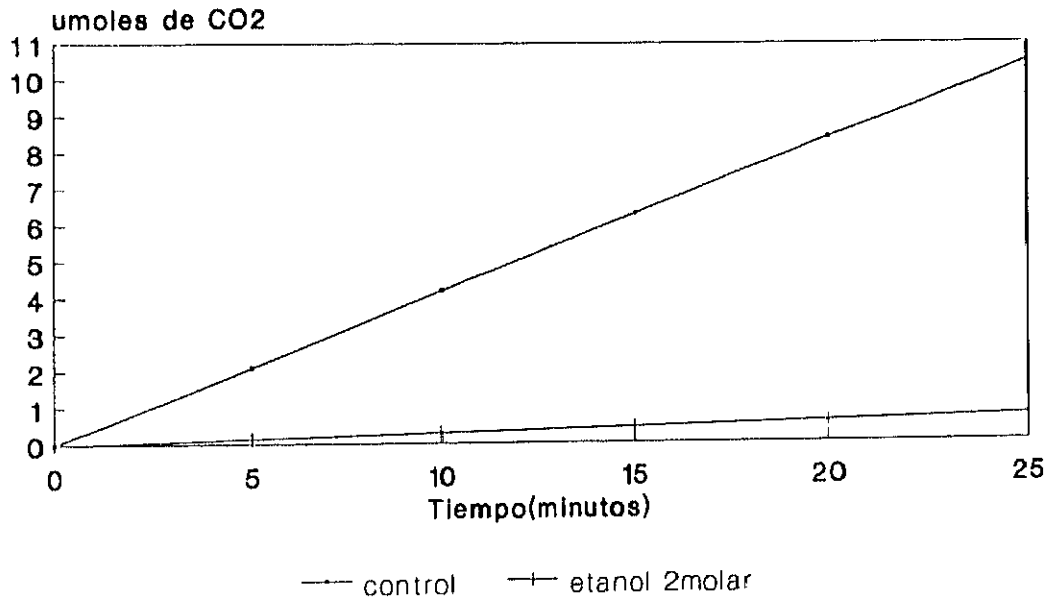


Figura 10.

Tiempo (minutos)	control	etanol 2.0 M
0	0.000	0.000
5	2.100	0.145
10	4.202	0.289
15	6.298	0.436
20	8.403	0.580

Tabla 11.- Resultados de la fermentación sobre medio YPD en *K. marxianus*.

Los resultados vienen expresados en μmoles de CO₂.

Valores de la regresión lineal para: Control: B= 0.420, r= 0.99
Etanol 2M: B= 0.029, r= 0.99

III.2.2.- Inhibición de la respiración en presencia del etanol, en el medio YPD.

Para obtener la medida de la inhibición de la respiración en presencia de etanol hemos utilizado técnicas manométricas semejantes a las descritas para la fermentación.

Como en el caso de la fermentación el medio utilizado para estas determinaciones ha sido YPD y la concentración de etanol ha sido 2.0 M en todos los ensayos.

La respiración se mantuvo a lo largo de 20 minutos, determinándose los μmoles de O_2 consumidos, a lo largo de ese tiempo, por cada una de las estirpes.

Los resultados se expresan en las tablas 12, 13, 14, 15 y 16 y en las figuras 11, 12, 13, 14 y 15.

Inhibición de la respiración en *S. cerevisiae*

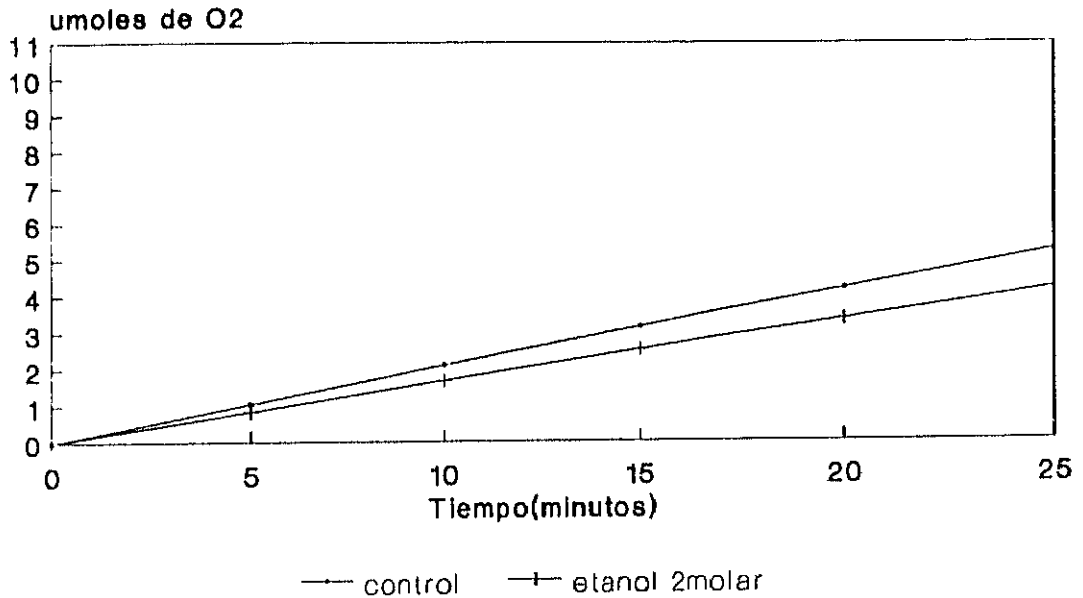


Figura 11.

Tiempo (minutos)	Control	Etanol 2M
0	0.000	0.000
5	1.050	0.840
10	2.101	1.679
15	3.149	2.521
20	4.201	3.359

Tabla 12.- Resultados de la respiración sobre medio YPD en *S. cerevisiae*.

Los resultados vienen expresados en $\mu\text{moles de O}_2$.

Valores de la regresión lineal para: Control: $B= 0.210$, $r= 0.99$
Etanol 2M: $B= 0.168$, $r= 0.99$

Inhibición de la respiración en *C. utilis*

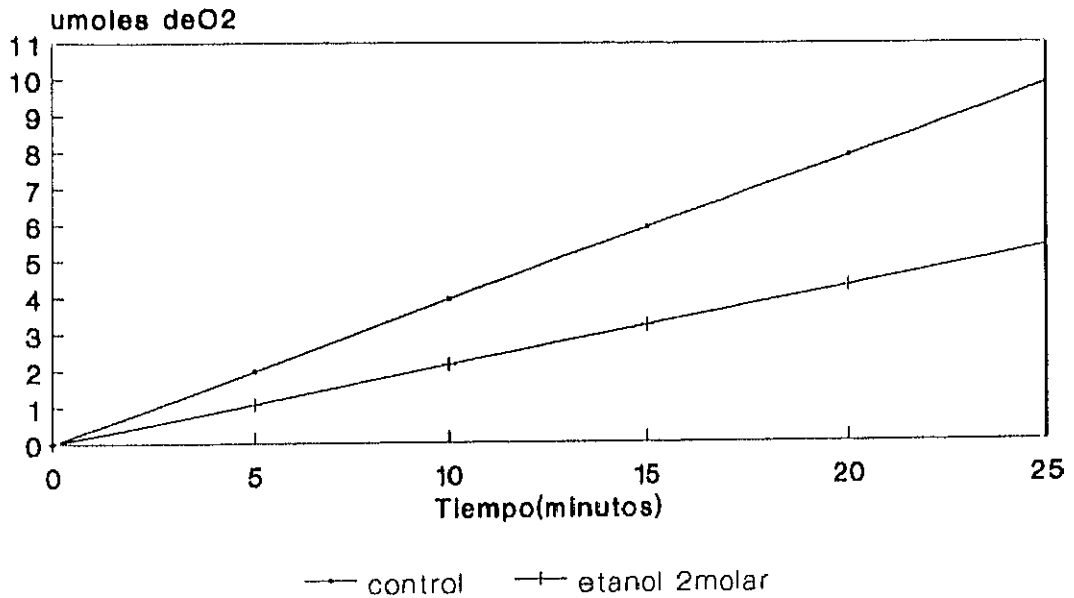


Figura 12.

Tiempo (minutos)	Control	Etanol 2M
0	0.000	0.000
5	1.975	1.075
10	3.951	2.149
15	5.924	3.226
20	7.900	4.300

Tabla 13.- Resultados de la respiración sobre medio YPD en *C. utilis*.

Los resultados vienen expresados en $\mu\text{moles de O}_2$.

Valores de la regresión lineal para: Control: $B= 0.395$, $r= 0.99$
Etanol 2M: $B= 0.215$, $r= 0.99$

**Inhibición de la respiración en
*C. pseudotropicalis***

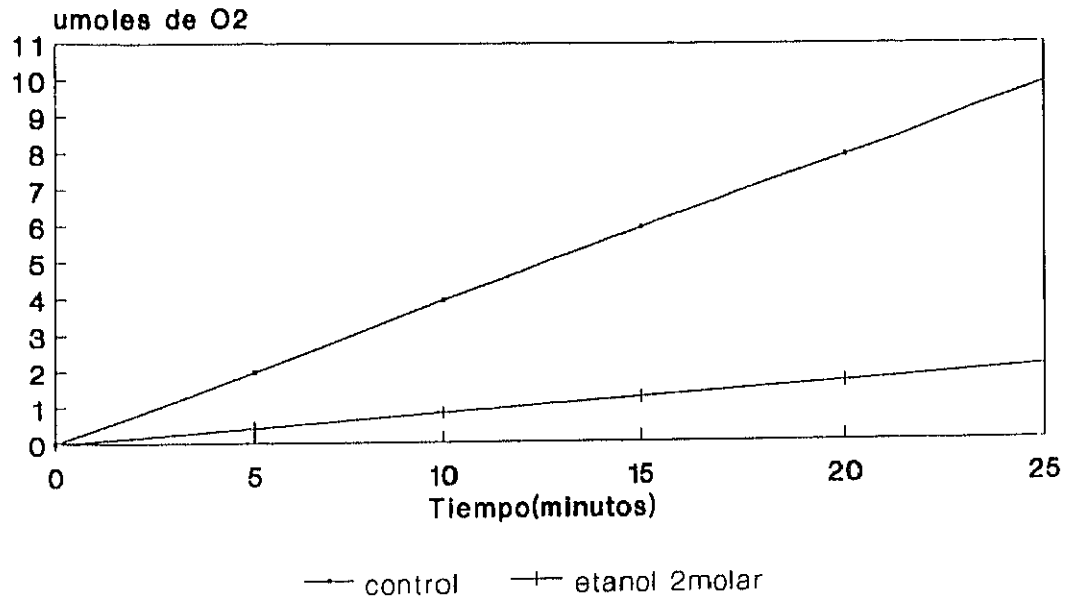


Figura 13.

Tiempo (minutos)	Control	Etanol 2M
0	0.000	0.000
5	1.979	0.415
10	3.960	0.832
15	5.943	1.245
20	7.918	1.661

Tabla 14.- Resultados de la respiración sobre el medio YPD en *C. pseudotropicalis*.

Los resultados vienen expresados en $\mu\text{moles de O}_2$.

Valores de la regresión lineal para: Control: $B= 0.396$, $r= 0.99$
Etanol 2M: $B= 0.083$, $r= 0.99$

Inhibición de la respiración en *P. stipitis*

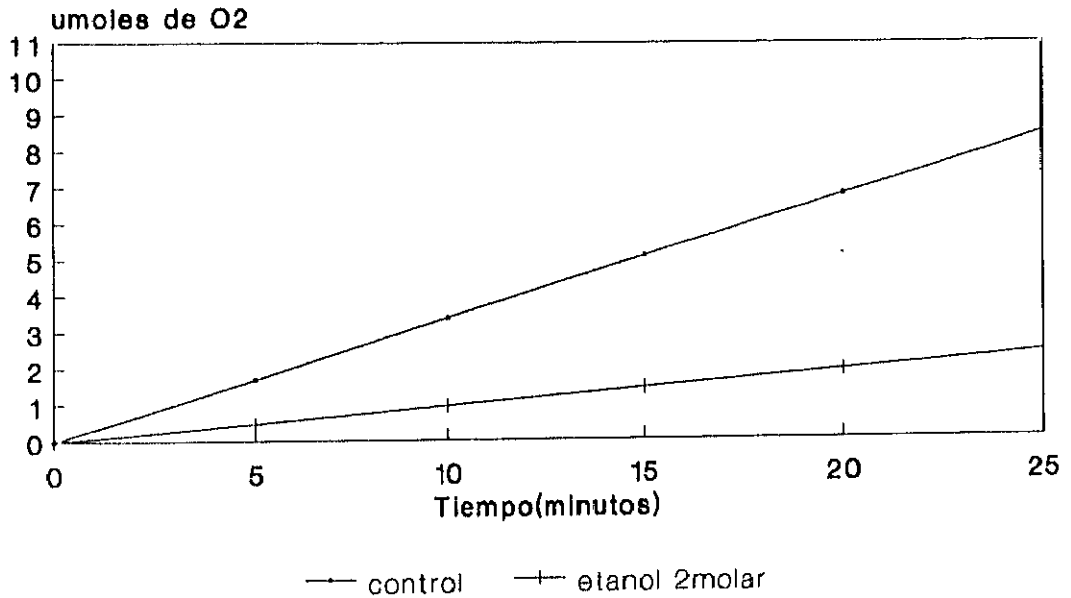


Figura 14.

Tiempo (minutos)	Control	Etanol 2M
0	0.000	0.000
5	1.693	0.475
10	3.388	0.949
15	5.084	1.426
20	6.780	1.902

Tabla 15.- Resultados de la respiración sobre medio YPD en *P. stipitis*.

Los resultados vienen expresados en $\mu\text{moles de O}_2$.

Valores de la regresión lineal para: Control: $B= 0.339$, $r= 0.99$
Etanol 2M: $B= 0.095$, $r= 0.99$

Inhibición de la respiración en *K. marxianus*

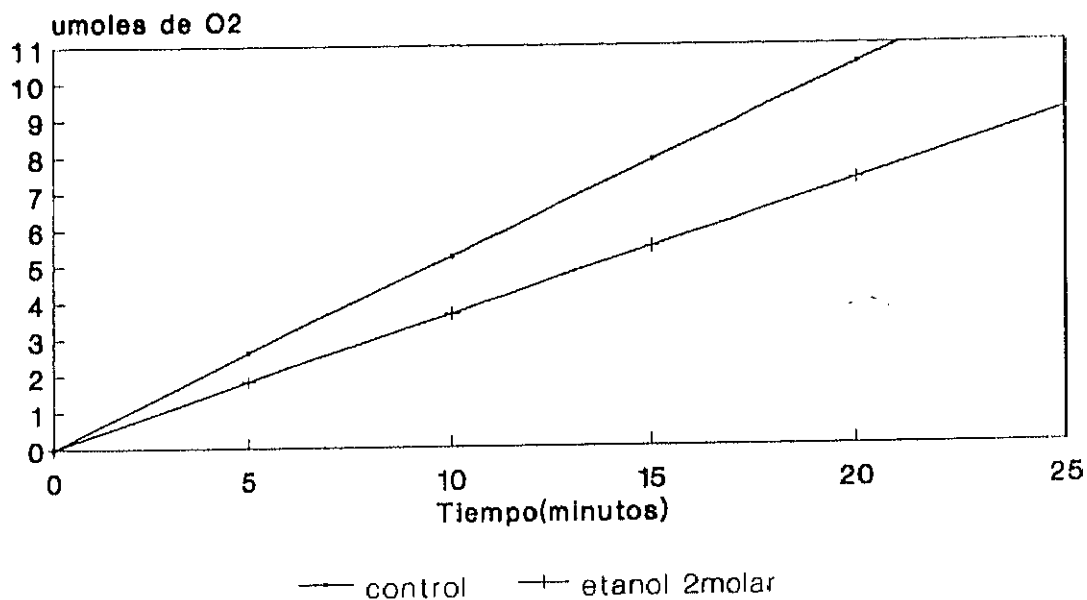


Figura 15.

Tiempo (minutos)	Control	Etanol 2M
0	0.000	0.000
5	2.621	1.830
10	5.240	3.661
15	7.862	5.488
20	10.477	7.322

Tabla 16.- Resultados de la respiración sobre medio YPD en *K. marxianus*.

Los resultados vienen expresados en $\mu\text{moles de O}_2$.

Valores de la regresión lineal para: Control: $B= 0.524$, $r= 0.99$
Etanol 2M: $B= 0.366$, $r= 0.99$

III.2.3.- Estudio comparativo de las inhibiciones por etanol, en medio YPD.

A partir de los datos obtenidos en la fermentación y en la respiración de las cinco estirpes estudiadas, realizamos las comparaciones de resultados en presencia de etanol con respecto a los controles.

Como valor de comparación hemos utilizado la tasa específica de fermentación o respiración correspondiente, expresada en mmoles de CO_2/g de peso seco de células/hora ó mmoles de O_2/g de peso seco de células/hora.

En todos los ensayos se utilizó un inóculo de 0.8 mg de células (peso seco).

Estos valores de comparación (tasas específicas) han sido calculados a partir de la pendiente de la recta de regresión obtenida al relacionar la producción o consumo de gases frente al tiempo.

Los valores de dichas tasas específicas se expresan en las tablas 16 bis y 17.

Las comparaciones entre las tasas de fermentación y respiración en presencia o ausencia de etanol se representan en las figuras 16 y 17.

Los valores de los porcentajes de inhibición debido al efecto del etanol, sobre la fermentación y respiración se expresan en la tabla 18.

El orden de tolerancia al etanol, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, quedarían expuestos en la tabla 19.

Inhibición de las tasas específicas de fermentación

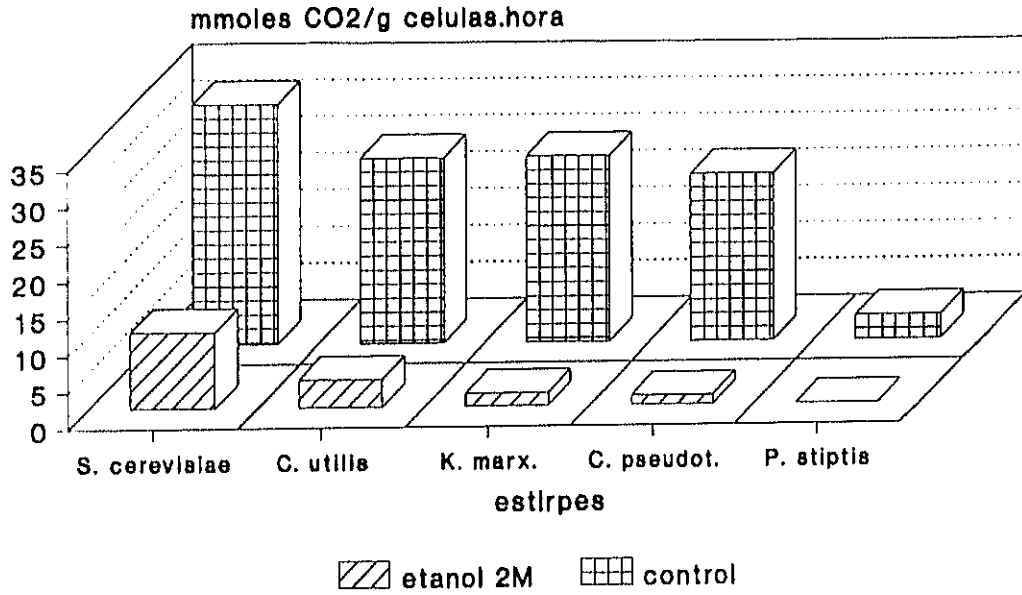


Figura 16.

Estirpes	Control	Etanol 2 molar
<i>S. cerevisiae</i>	32.54	10.42
<i>C. utilis</i>	25.14	3.84
<i>C. pseudotropicalis</i>	22.72	1.30
<i>P. stiptis</i>	3.33	0.00
<i>K. marxianus</i>	25.25	1.77

Tabla 16 bis.- Inhibición por etanol de la fermentación sobre YPD
(Tasas de fermentación)

Producción de mmoles de CO₂/g células.hora

Inhibición de las tasas específicas de respiración

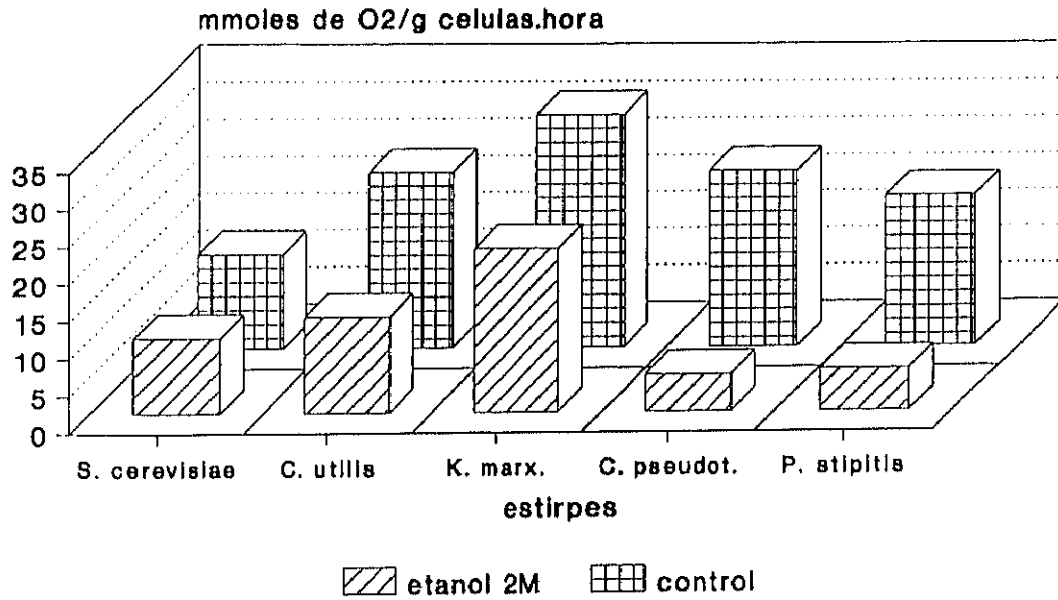


Figura 17.

Estirpes	Control	Etanol 2 molar
<i>S. cerevisiae</i>	12.61	10.11
<i>C. utilis</i>	23.71	12.92
<i>C. pseudotropicalis</i>	23.78	5.01
<i>P. stipitis</i>	20.34	5.70
<i>K. marxianus</i>	31.46	22.01

Tabla 17.-Inhibición por etanol de la respiración sobre YPD
(Tasas de respiración)

Consumo de mmoles de O₂/g células . hora

Estirpes	Fermentación	Respiración
<i>S. cerevisiae</i>	67.95 %	19.78 %
<i>C. utilis</i>	84.70 %	45.50 %
<i>C.pseudotropicalis</i>	94.27 %	78.84 %
<i>P. stipitis</i>	100 %	71.93 %
<i>K. marxianus</i>	92.97 %	30.03 %

Tabla 18.- Porcentaje de inhibición* de las tasas específicas de fermentación y respiración por efecto del etanol.

$$*\% \text{ de inhibición} = (1 - \text{tasa específica con etanol} / \text{tasa específica control}) \times 100$$

Orden	Fermentación	Respiración
1ª	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
2ª	<i>C. utilis</i>	<i>K. marxianus</i>
3ª	<i>K. marxianus</i>	<i>C. utilis</i>
4ª	<i>C.pseudotropicalis</i>	<i>P. stipitis</i>
5ª	<i>P. stipitis</i>	<i>C.pseudotropicalis</i>

Tabla 19.- Orden de tolerancia al etanol como resultado de la medida de lastasas específicas de fermentación y respiración.

III.2.4. - Inhibición de la fermentación en presencia de etanol, en
tampón fosfato 50 mM, pH 5.5.

Autores como Janssens y col. (1983), Casey y col. (1985), D'Amore y Stewart (1987) al estudiar diferentes factores fisiológicos que inciden sobre la tolerancia al etanol, en términos de actividad fermentativa recalcan la importancia de los factores nutricionales en la misma. Se plantearon, para confirmar dichas hipótesis unas nuevas experiencias con las estirpes estudiadas.

Para la medida de la inhibición de la fermentación se utilizaron las técnicas manométricas ya descritas, pero el medio de fermentación utilizado fué tampón fosfato-fosfórico 50 mM ajustado a un pH 5.5 siguiendo el método descrito por Brown y col. (1981) al que se incorporaba como fuente carbonada glucosa hasta alcanzar una concentración final 100 mM. Las concentraciones de etanol utilizadas en las pruebas fueron del 2.5%, 5%, 7.5% y 10% (v/v).

La fermentación se mantuvo a lo largo de 60 minutos, determinándose cada 15 minutos los μmoles de CO_2 producidos por cada una de las estirpes ensayadas.

Los resultados se expresan en las tablas 20, 21, 22, 23 y 24 y en las figuras 18, 19, 20 y 21.

Inhibición de la fermentación en *S. cerevisiae*

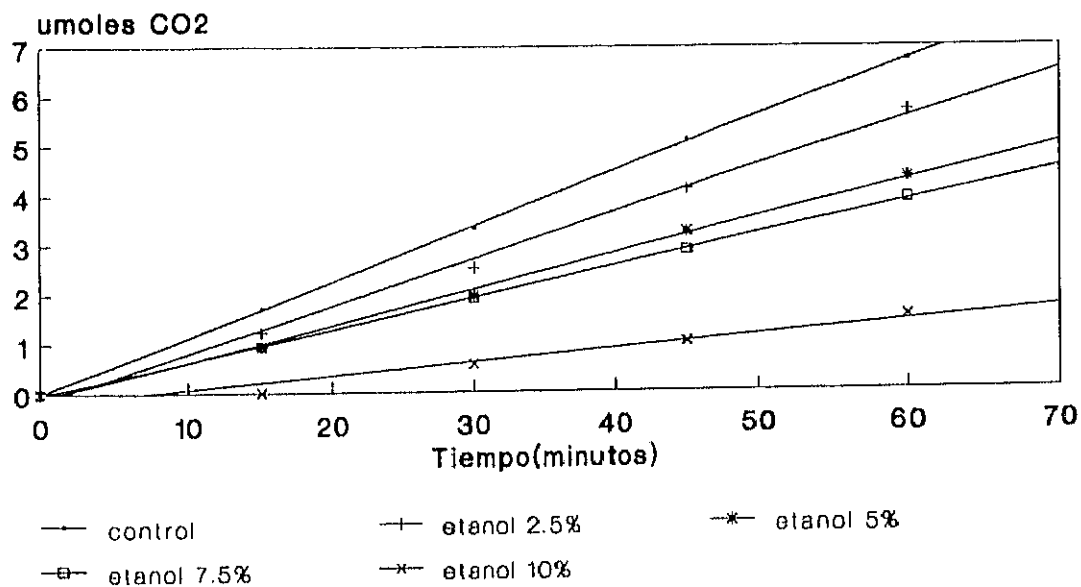


Figura 18.

Tiempo minutos	Concentraciones de etanol % (v/v)				
	control	2.5	5	7.5	10
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	1.712	1.224	0.886	0.939	0.000
30	3.329	2.521	1.950	1.902	0.558
45	5.090	4.107	3.242	2.865	0.995
60	6.731	5.692	4.332	3.897	1.505

Tabla 20.- Resultados de la fermentación sobre tampón fosfato en *S. cerevisiae*.

Los resultados vienen expresados en μmoles de CO_2 .

Regresiones de los valores de producción de CO_2 frente al tiempo:

Control: $B = 0.112$, $r = 0.99$

Etanol 2.5 %: $B = 0.095$, $r = 0.99$

Etanol 5 %: $B = 0.073$, $r = 0.99$

Etanol 7.5 %: $B = 0.064$, $r = 0.99$

Etanol 10 %: $B = 0.033$, $r = 0.99$

Inhibición de la fermentación en *C. utilis*

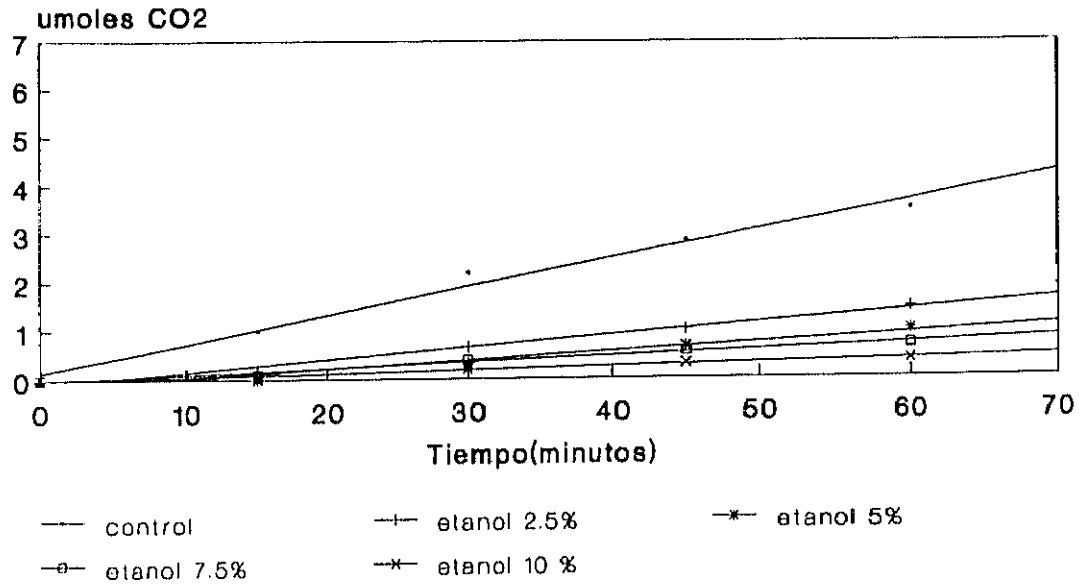


Figura 19.

Tiempo (minutos)	Concentraciones de etanol % (v/v)				
	control	2.5	5	7.5	10
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	1.013	0.176	0.000	0.106	0.032
30	2.187	0.656	0.304	0.381	0.194
45	2.863	1.008	0.658	0.564	0.307
60	3.506	1.441	0.987	0.687	0.372

Tabla 21.- Resultados de la fermentación sobre tampón fosfato en *C. utilis*.
Los resultados vienen expresados en μ moles de CO₂.

Regresiones de los valores de producción de CO₂ frente al tiempo.

Control: B= 0.059 , r= 0.99

Etanol 2.5 %: B= 0.024 , r= 0.99

Etanol 5 %: B= 0.022 , r= 0.99

Etanol 7.5 %: B= 0.012 , r= 0.99

Etanol 10 %: B= 0.006 , r= 0.98

Inhibición de la fermentación en *C. pseudotropicalis*

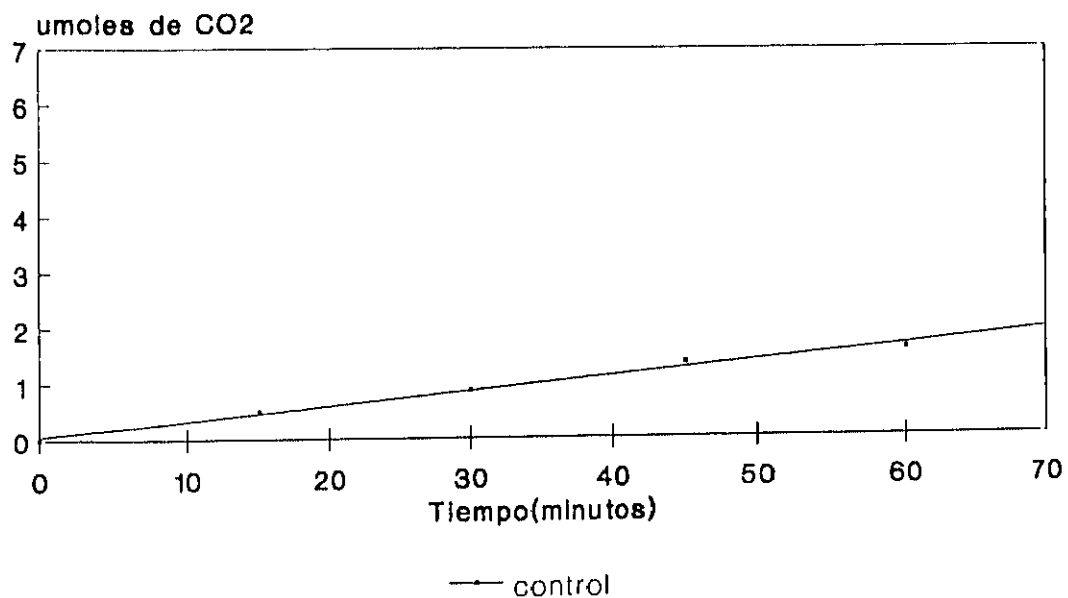


Figura 20.

Tiempo minutos	Concentraciones de etanol % (v/v)				
	control	2.5	5	7.5	10
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	0.506	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.868	0.000	0.000	0.000	0.000
45	1.351	0.000	0.000	0.000	0.000
60	1.568	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla 22. - Resultados de la fermentación sobre tampón fosfato en *C. pseudotropicalis*.
Los resultados vienen expresados en μ moles de CO_2 .

Regresiones de los valores de producción de CO_2 frente al tiempo:

Control: $B = 0.062$, $r = 0.99$

Tiempo minutos	Concentraciones de etanol % (v/v)				
	control	2.5	5	7.5	10
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
45	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
60	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla 23.- Resultados de la fermentación sobre tampón fosfato en *P. stipitis*.

Los resultados vienen expresados en μmoles de CO_2 .

Inhibición de la fermentación en *K. marxianus*

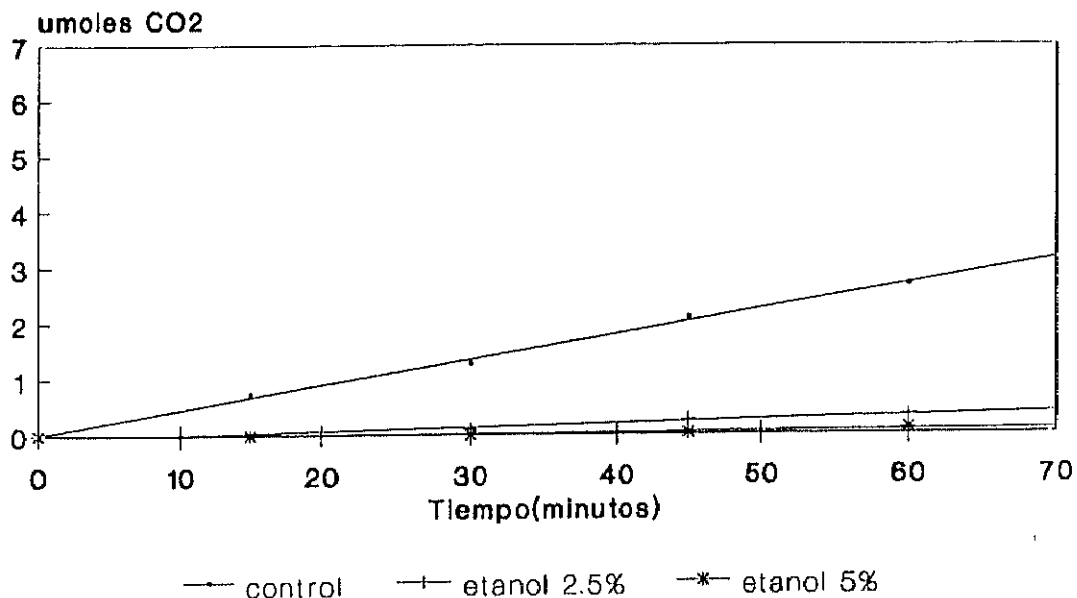


Figura 22.

tiempo minutos	Concentraciones de etanol % (v/v)				
	control	2.5	5	7.5	10
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	0.747	0.000	0.000	0.000	0.000
30	1.278	0.096	0.000	0.000	0.000
45	2.099	0.264	0.025	0.000	0.000
60	2.678	0.336	0.101	0.000	0.000

Tabla 24.- Resultados de la fermentación sobre tampón fosfato en *K. marxianus*.

Los resultados vienen expresados en umoles de CO₂.

Las regresiones de los valores de producción de CO₂ frente al tiempo.

Control: B= 0.044 , r= 0.99

Etanol 2.5 %: B= 0.007 , r= 0.98

Etanol 5 %: B= 0.003 , r= 0.96

III.2.5.- Estudio comparativo de las inhibiciones por etanol en tampón fosfato 50 mM, pH 5.5.

A partir de los resultados **obtenidos** en las fermentaciones sobre tampón fosfato en las cinco especies estudiadas, podemos realizar las comparaciones de los resultados, debido a la acción del etanol a las concentraciones estudiadas.

Como valor de comparación se utilizó el valor de la tasa específica de fermentación expresada en mmoles de CO₂/g de peso seco de células. hora.

En todos los ensayos se utilizó un inóculo de 1.2 mg de células (peso seco).

Estos valores han sido calculados a partir de la pendiente de la recta de regresión correspondiente (ver apartado anterior).

Los valores de dichas tasas específicas se expresan en la tabla 25 y en las figuras 23, 24, 25, 26 y 27.

Los valores de los porcentajes de inhibición debido al efecto del etanol se expresan en la tabla 26.

Se han comparado los valores de las tasas específicas de fermentación sobre tampón fosfato-fosfórico y glucosa con las tasas específicas de fermentación sobre medio YPD, para evaluar el descenso de la fermentación debido a factores nutricionales. Los valores se exponen en la tabla 27 y en la figura 28.

El orden de tolerancia al etanol teniendo en cuenta los resultados obtenidos sería el expuesto en la tabla 28.

Inhibición de las tasas específicas de fermentación en *S. cerevisiae*

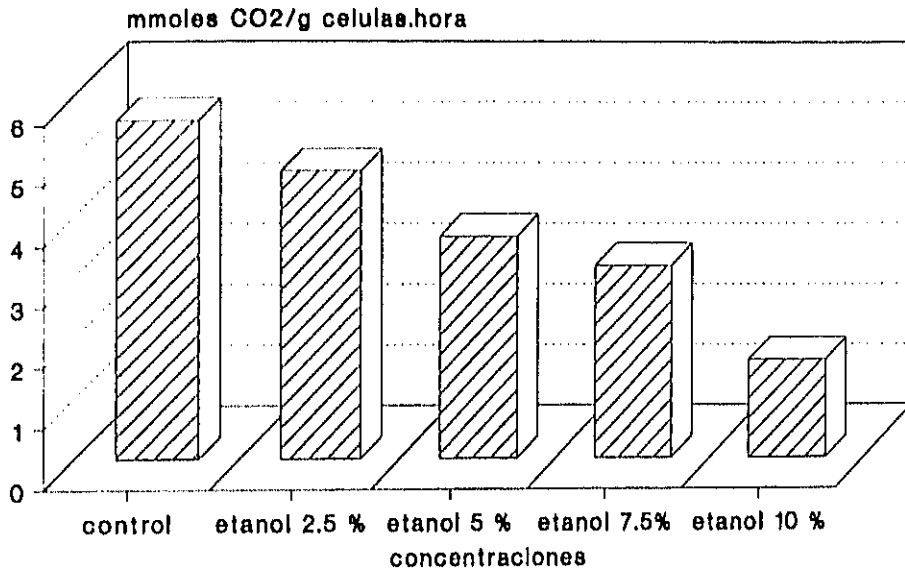


Figura 23.

Inhibición de las tasas específicas de fermentación en *C. utilis*

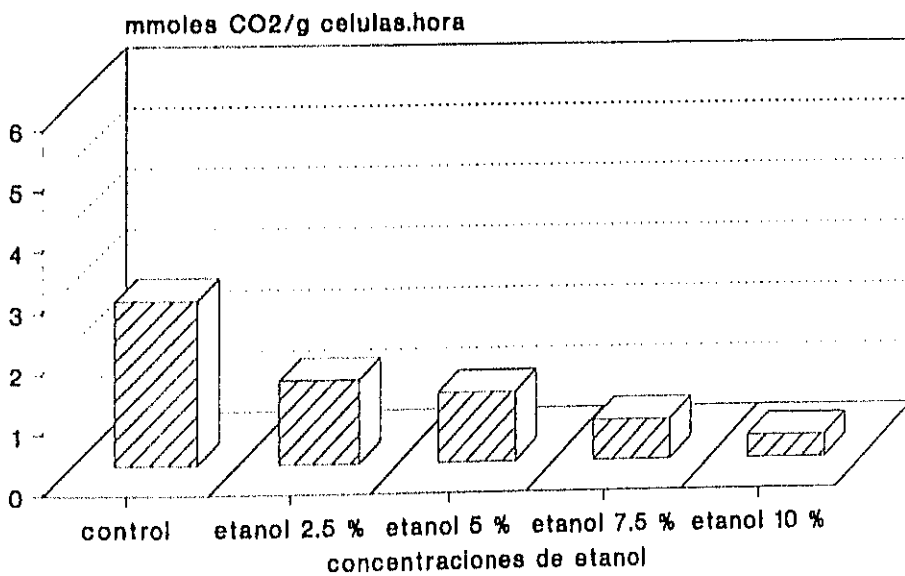


Figura 24.

Inhibición de las tasas específicas de fermentación en *C. pseudotropicalis*

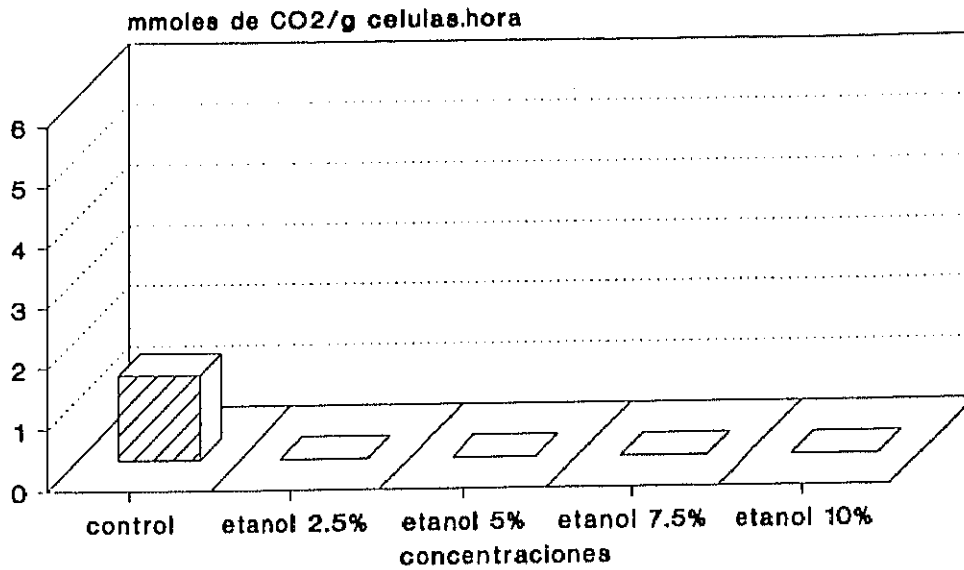


Figura 25.

Inhibición de las tasas específicas de fermentación en *P. stipitis*

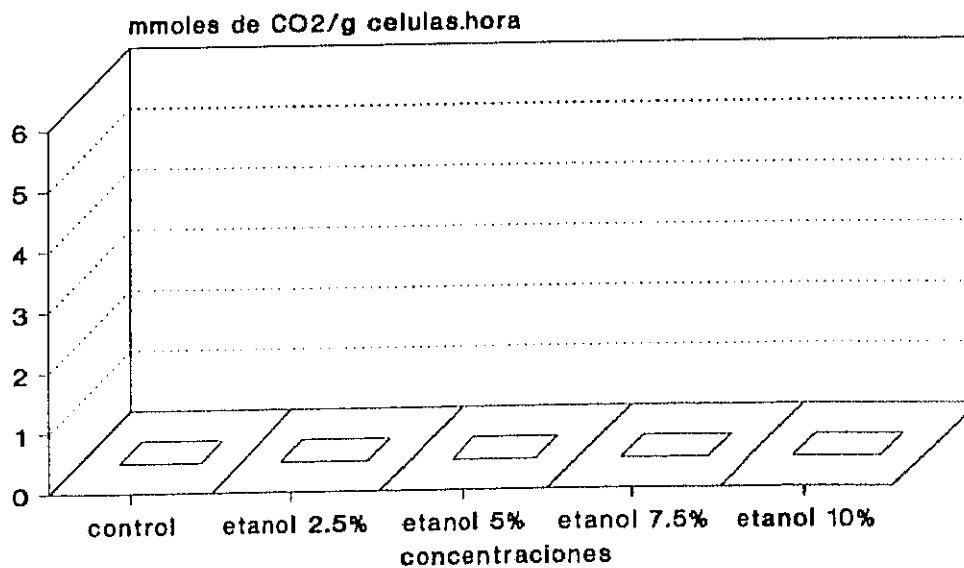


Figura 26.

Inhibición de las tasas específicas de fermentación en *K. marxianus*

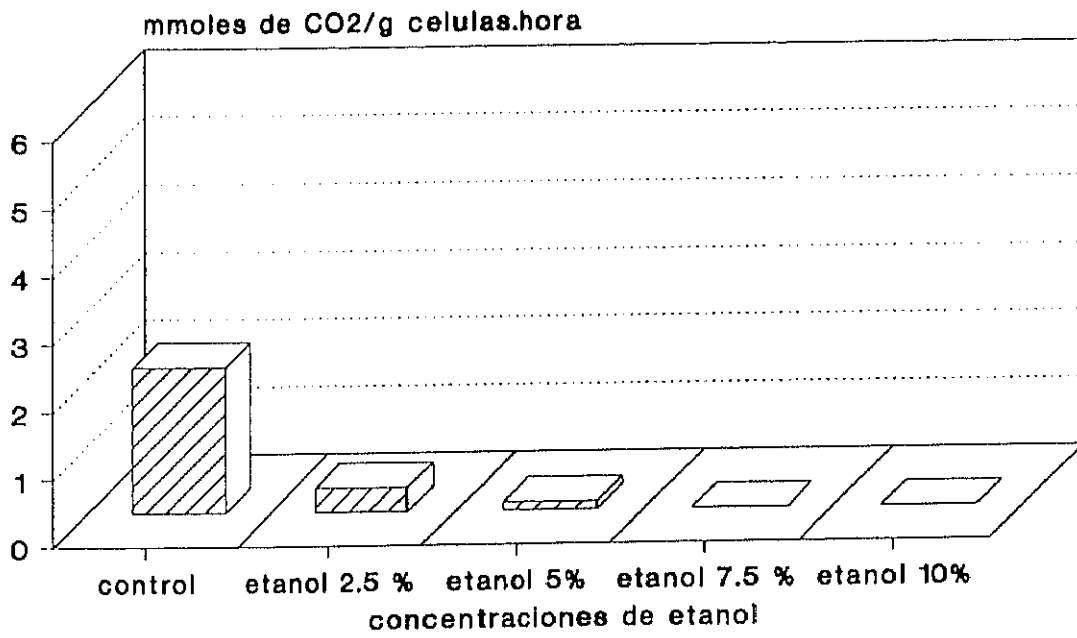


Figura 27.

Estirpes	Concentraciones de etanol % (v/v)				
	0%	2.5%	5%	7.5%	10%
<i>S. cerevisiae</i>	5.58	4.74	3.66	3.18	1.62
<i>C. utilis</i>	2.70	1.38	1.14	0.65	0.36
<i>C. pseudotropicalis</i>	1.38	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>P. stipitis</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>K. marxianus</i>	2.16	0.36	0.12	0.00	0.00

Tabla 25.- Inhibición de la fermentación (Pruebas sobre tampón fosfato).

Los valores descritos corresponden a las tasas específicas de fermentación expresadas en mmoles de CO₂/g células.hora.

Estirpes	Concentraciones de etanol % (v/v)				
	0 %	2.5 %	5 %	7.5 %	10 %
<i>S. cerevisiae</i>	0.00	15.06	34.43	43.04	76.32
<i>C. utilis</i>	0.00	48.88	57.77	75.92	86.66
<i>C. pseudotropicalis</i>	0.00	100	100	100	100
<i>P. stipitis</i>	----	----	----	----	----
<i>K. marxianus</i>	0.00	83.33	94.44	100	100

Tabla 26.- Valores de los % de inhibición* de la fermentación sobre tampón fosfato, debido a la acción del etanol.

*% de inhibición = (1-tasa específica con etanol/tasa específica control) x 100

Inhibición de las tasas específicas de fermentación debida al medio

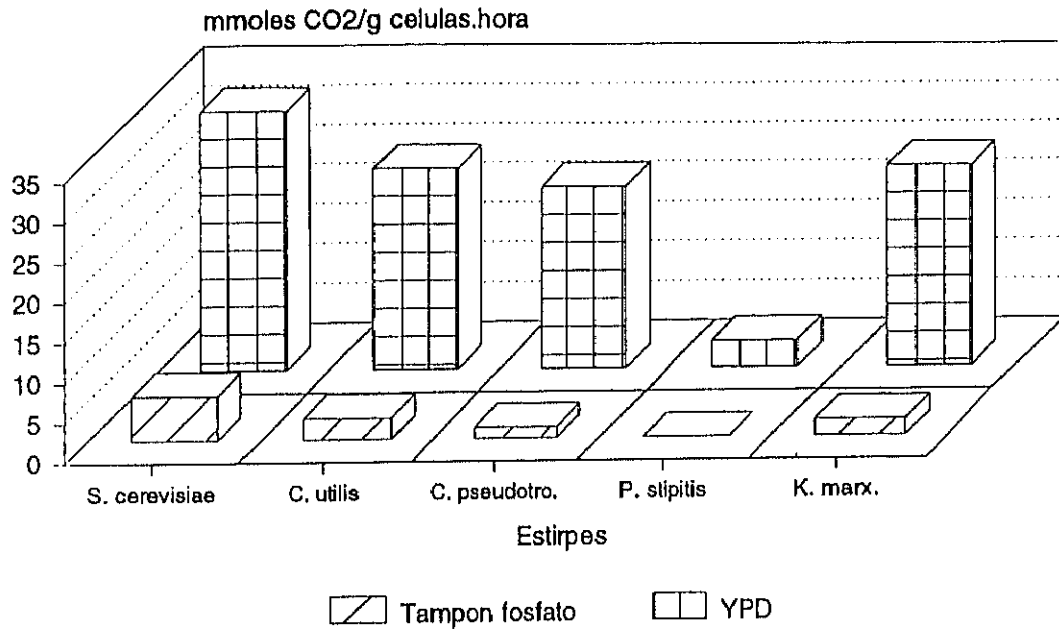


Figura 28.

Estirpes	Medio YPD	Tampón fosfato
<i>S. cerevisiae</i>	32.54	5.58
<i>C. utilis</i>	25.14	2.70
<i>C. pseudotropicalis</i>	22.72	1.38
<i>P. stipitis</i>	3.33	---
<i>K. marxianus</i>	25.25	2.16

Tabla 27.- Tasas específicas de fermentación.

Los valores de las tasas específicas de fermentación vienen expresados en mmoles de CO₂/g células . hora.

Orden	Estirpes
1ª	<i>S. cerevisiae</i>
2ª	<i>C. utilis</i>
3ª	<i>K. marxianus</i>
4ª	<i>C. pseudotropicalis</i>
5ª	<i>P. stipitis</i>

Tabla 28.- Orden de tolerancia al etanol como resultado de la medida de las variaciones de las tasas específicas de fermentación sobre tampón fosfato.

III.3.- CÁLCULO DE LA TOLERANCIA AL ETANOL MEDIANTE EL ESTUDIO
COMPARATIVO DE LAS ALTERACIONES DE FLUJO PASIVO DE
PROTONES TRANSMEMBRANA.

Jimenez y van Uden (1985) comprobaron en *S. cerevisiae* que el etanol actuaba estimulando el flujo pasivo de protones hacia el interior celular, y que dicha estimulación era función de la concentración de etanol.

El método propuesto por estos autores consiste en la medida del pH extracelular, de una suspensión de levaduras, al cabo de 75 minutos de haber añadido glucosa.

Según este método, la estimulación de dicho flujo pasivo de protones por etanol, es exponencial y existe una relación entre el pH extracelular al cabo de dicho tiempo y la tolerancia al etanol, definida mediante una constante de estimulación exponencial (K).

III.3.1.- Determinación de las variaciones de pH extracelular, debido al efecto del etanol sobre la permeabilidad de la membrana al flujo pasivo de protones.

Siguiendo la metodología propuesta por Jimenez y van Uden (1985), se determinó el pH extracelular de una suspensión de levaduras energizadas con una solución de glucosa al 20.0 % (p/v).

El etanol se incorporaba a las suspensiones celulares en concentraciones finales del 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 % (v/v).

Los ensayos se realizaron siempre a una temperatura de 28 °C y en agitación (200 rpm). Transcurridos 75 minutos, tal como se define el método, se tomaron las correspondientes medidas del pH extracelular.

Los valores obtenidos de dichas medidas se presentan en la tabla 29 y en las figuras 29, 30, 31, 32, 33 y 34.

Variaciones del pH extracelular en
S. cerevisiae

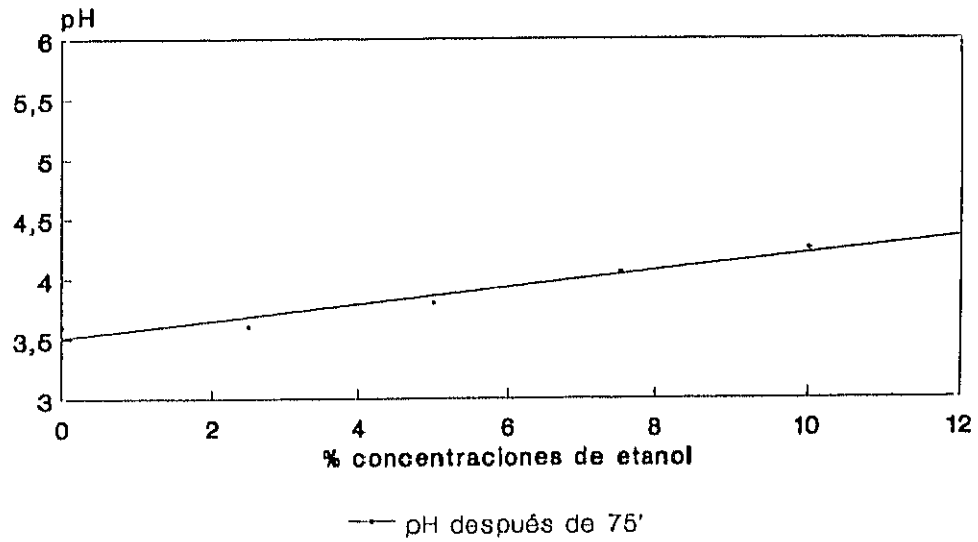


Figura 29.

Variaciones del pH extracelular en
C. utilis

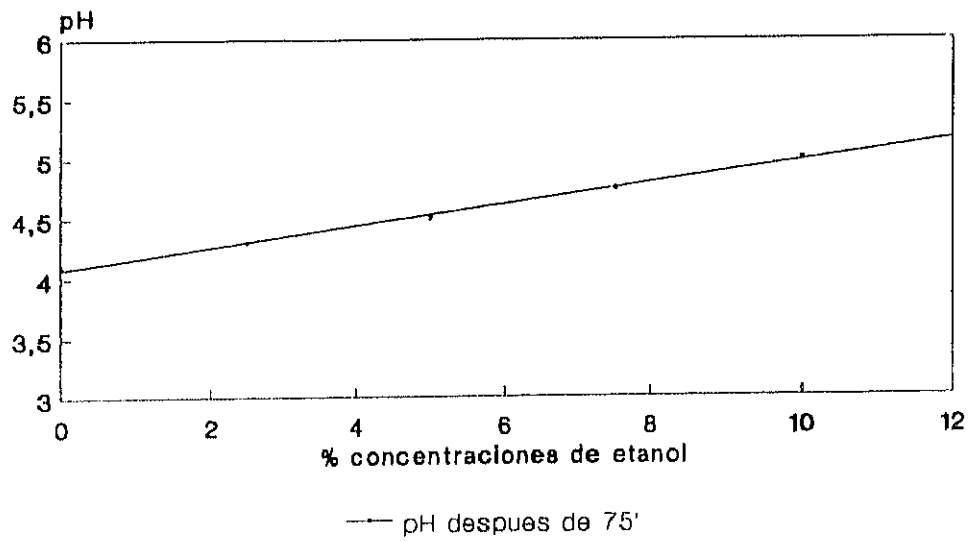


Figura 30.

Variaciones del pH extracelular en
C. pseudotropicalis.

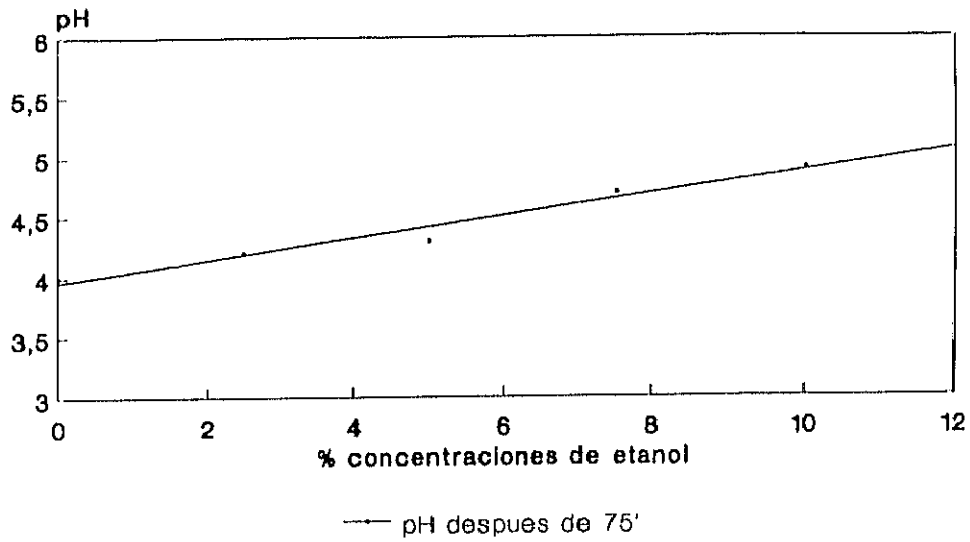


Figura 31.

Variaciones del pH extracelular en
P. stipitis

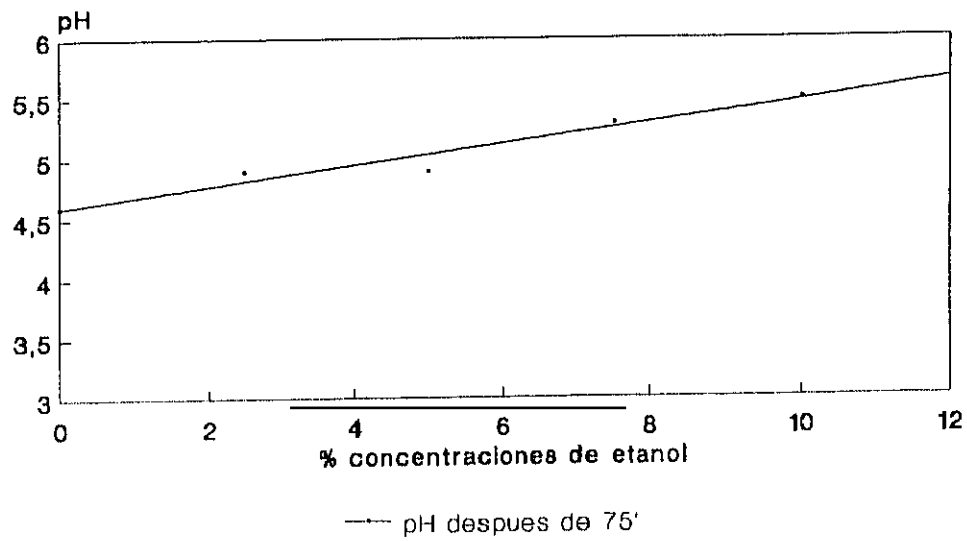


Figura 32.

Variaciones del pH extracelular en
K. marxianus

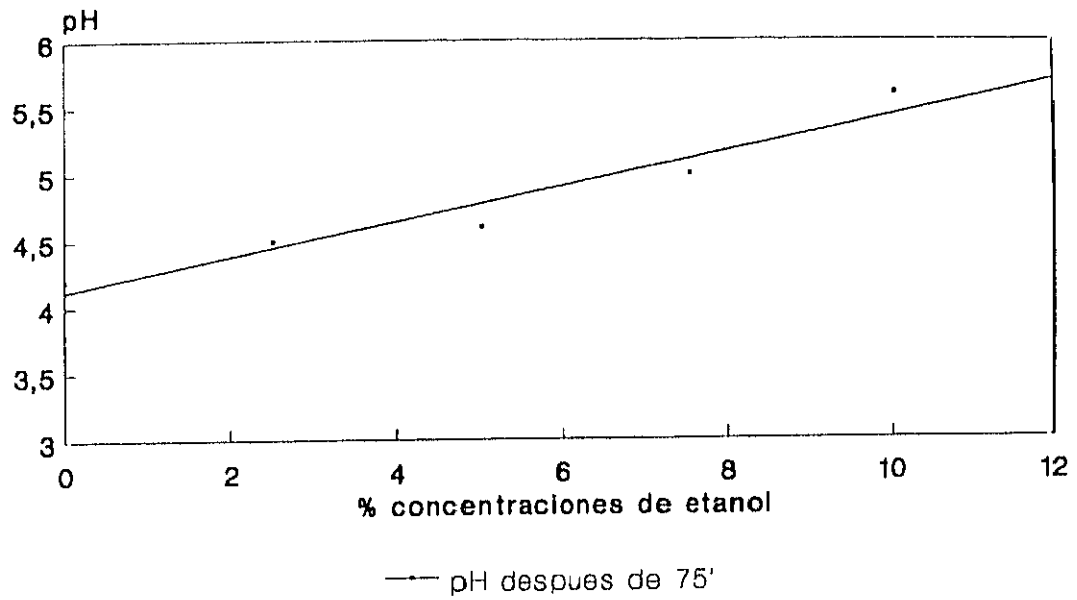


Figura 33.

Variaciones del pH extracelular en todas las estirpes

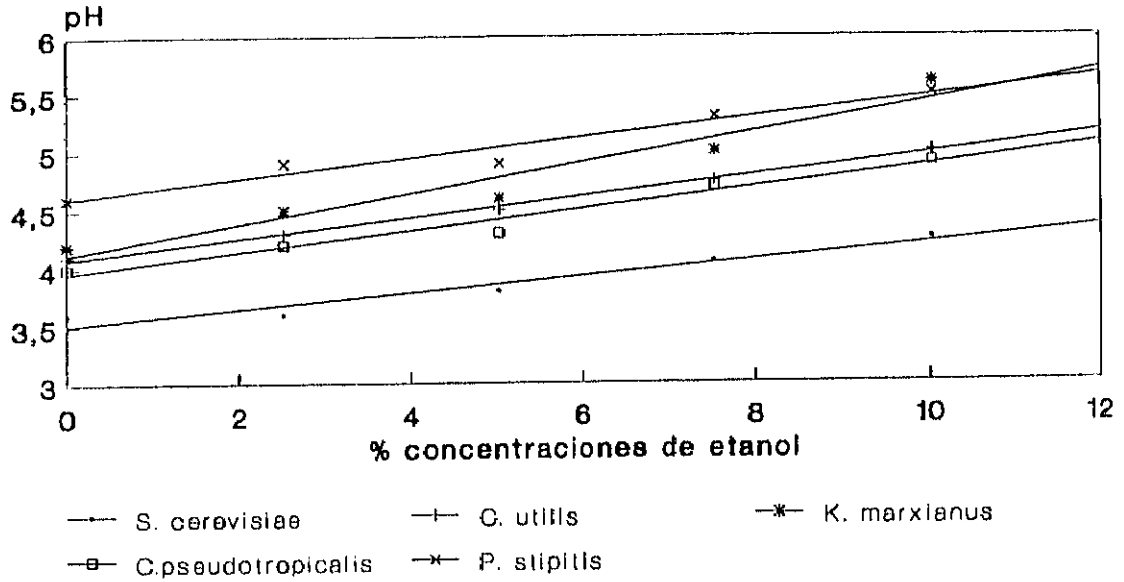


Figura 34.

Estirpes	Concentraciones de etanol % (v/v)				
	Control	2.5	5	7.5	10
<i>S. cerevisiae</i>	3.6	3.6	3.8	4.05	4.25
<i>C. utilis</i>	4.1	4.3	4.5	4.75	5.0
<i>C. pseudotropicalis</i>	4.0	4.2	4.3	4.7	4.9
<i>K. marxianus</i>	4.2	4.5	4.6	5.0	5.6
<i>P. stipitis</i>	4.6	4.9	4.9	5.3	5.5

Tabla 29.- La tabla expresa los valores medios de pH obtenidos a los 75 minutos de contacto con el etanol, en las concentraciones descritas.

Valores de la regresión lineal para:

S. cerevisiae: $B = 0.070$, $r = 0.96$

C. utilis: $B = 0.090$, $r = 0.99$

III.3.2.- Cálculo de las constantes de estimulación exponencial al flujo pasivo de protones.

El método Jimenez y van Uden (1985) formula la siguiente ecuación:

$$\text{pH final} = \log C_0 - \log K_p + KX \log e \quad (1)$$

Donde:

pH final = valor del pH al cabo de 75 minutos.

C_0 = Constante de difusión de protones a través de la membrana a una concentración de etanol del 0 %.

K_p = Tasa de extrusión activa de protones a través de la membrana con diferentes concentraciones de etanol.

K = Constante de estimulación exponencial de flujo pasivo de protones.

X = Concentraciones de etanol ensayadas.

Los autores afirman que para concentraciones de hasta el 10% de etanol.

$$\log C_0 - \log K_p = \text{Constante}$$

Pues suponen que K_p prácticamente no se altera y C_0 por definición es una constante. Es decir, la ecuación (1) podría expresarse como la ecuación de una recta:

$$\text{pH final} = A + KX \log e$$

La pendiente de esta recta sería:

$$B = K \log e \implies K = B/0.4342$$

Los valores obtenidos de K para cada una de las cinco estirpes ensayadas se representan en la tabla 30 y en la figura 35.

Valores de K (constante de estimulación)

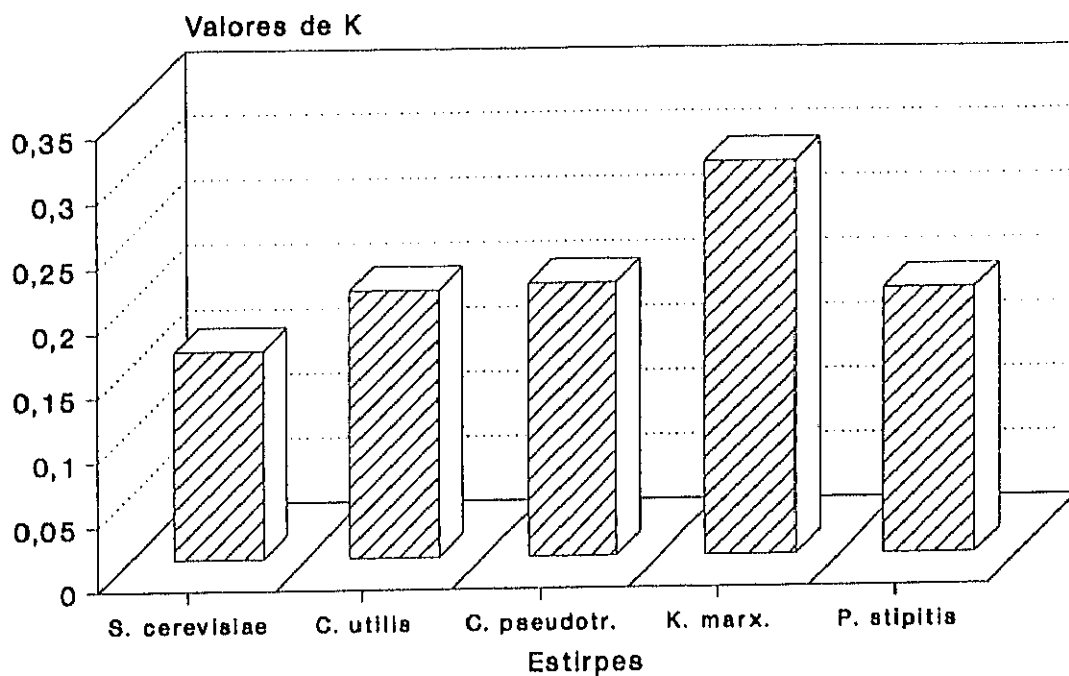


Figura 35

Estirpes	(K)
<i>S.cerevisiae</i>	0.1612
<i>C.utilis</i>	0.2072
<i>C.pseudotropicalis</i>	0.2118
<i>K.marxianus</i>	0.3040
<i>P.stipitis</i>	0.2060

Tabla 30.- Valores de K (constante de estimulación exponencial al flujo pasivo de protones) para las diferentes estirpes.

Los valores de K vienen expresados en molar⁻¹.

III.3.3.- Estudio comparativo de las constantes de estimulación exponencial al flujo pasivo de protones (K) y la tolerancia al etanol según este método.

El valor de la constante (K) es propuesto por Jimenez y van Uden (1985) como factor de correlación inversa con la tolerancia al etanol. Es decir, los valores menores indicarían una mayor tolerancia y los valores mayores una menor tolerancia.

Los resultados de este estudio comparativo quedan expuestos en la tabla 31.

Orden	Estirpes	K (molar ⁻¹)
1ª	<i>S. cerevisiae</i>	0.1612
2ª	<i>C. utilis</i>	0.2060
3ª	<i>C. pseudotropicalis</i>	0.2072
4ª	<i>P. stipitis</i>	0.2118
5ª	<i>K. marxianus</i>	0.3040

Tabla 31.- Orden de tolerancia al etanol de las estirpes ensayadas.

III.3.4.- Comparación entre las constantes de estimulación (K) y la inhibición de la fermentación debido a la acción del etanol.

En el apartado III.2 de este trabajo presentamos los resultados de la inhibición de la fermentación, debido a la acción del etanol a las concentraciones 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 % (v/v).

La comparación de los resultados obtenidos en el apartado de inhibición de fermentación con los obtenidos según el método de Jimenez y van Uden (1985) se expresa en la tabla 32.

Orden	Método (Jimenez y van Uden)	Método (tasas específicas de fermentación)
1ª	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
2ª	<i>C. utilis</i>	<i>C. utilis</i>
3ª	<i>C. pseudotropicalis</i>	<i>K. marxianus</i>
4ª	<i>P. stipitis</i>	<i>C. pseudotropicalis</i>
5ª	<i>K. marxianus</i>	<i>P. stipitis</i>

Tabla 32.- Comparación de las tolerancias al etanol, según el método Jimenez y van Uden (1985) y el método de medida directa de las tasas específicas de fermentación.

III.3.5.- Cálculo del tiempo necesario para la estabilización del pH extracelular debido a la acción del etanol. Medida del pH extracelular.

Aunque el método propuesto por Jimenez y van Uden (1985) supone que a los 75 minutos el pH de la suspensión celular está estabilizado, se realizó la siguiente modificación:

Todas las suspensiones celulares, en agua destilada, se ajustaron a pH 7.0

Se fueron tomando sucesivas medidas del pH durante 135 minutos a intervalos de 15 minutos.

Se realizaron las experiencias sobre unas suspensiones celulares que contenían concentraciones finales del 10% de etanol (v/v).

En todos los ensayos se midió también la variación del pH sobre una suspensión celular control carente de etanol.

Los resultados se representan en las tablas 33, 34, 35, 36 y 37 y en las figuras 36, 37, 38, 39 y 40.

Estabilización del pH en *S. cerevisiae*

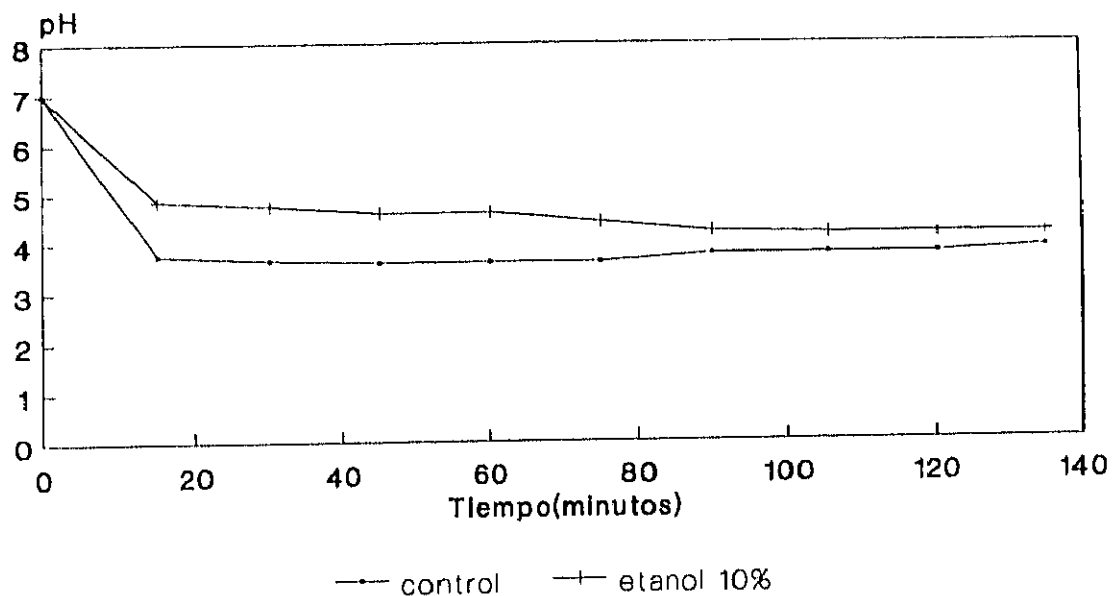


Figura 36.

Tiempos (minutos)	concentraciones de etanol	
	control	10 % (v/v)
0	7.0	7.0
15	3.75	4.85
30	3.65	4.75
45	3.60	4.60
60	3.60	4.40
75	3.60	4.30
90	3.75	4.20
105	3.75	4.15
120	3.75	4.05
135	3.85	4.15

Tabla 33.- Estabilización del pH en *S. cerevisiae*

La tabla presenta los valores de pH obtenidos en contacto con el etanol, en las concentraciones descritas.

Estabilización del pH en *C. utilis*

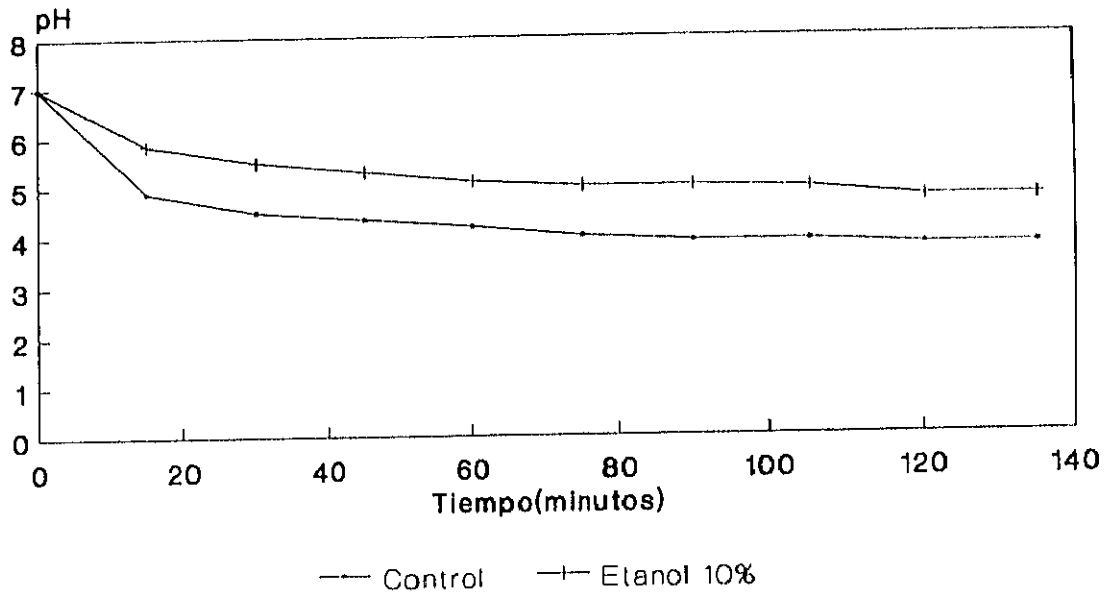


Figura 37.

Tiempos (minutos)	concentraciones de etanol	
	control	10 % (v/v)
0	7.0	7.0
15	4.9	5.85
30	4.5	5.5
45	4.35	5.3
60	4.2	5.1
75	4.0	5.0
90	3.9	5.0
105	3.9	4.9
120	3.8	4.75
135	3.8	4.75

Tabla 34.- Estabilización del pH en *C. utilis*

La tabla presenta los valores de pH obtenidos en contacto con el etanol, en las concentraciones descritas.

**Estabilización del pH en
*C. pseudotropicalis***

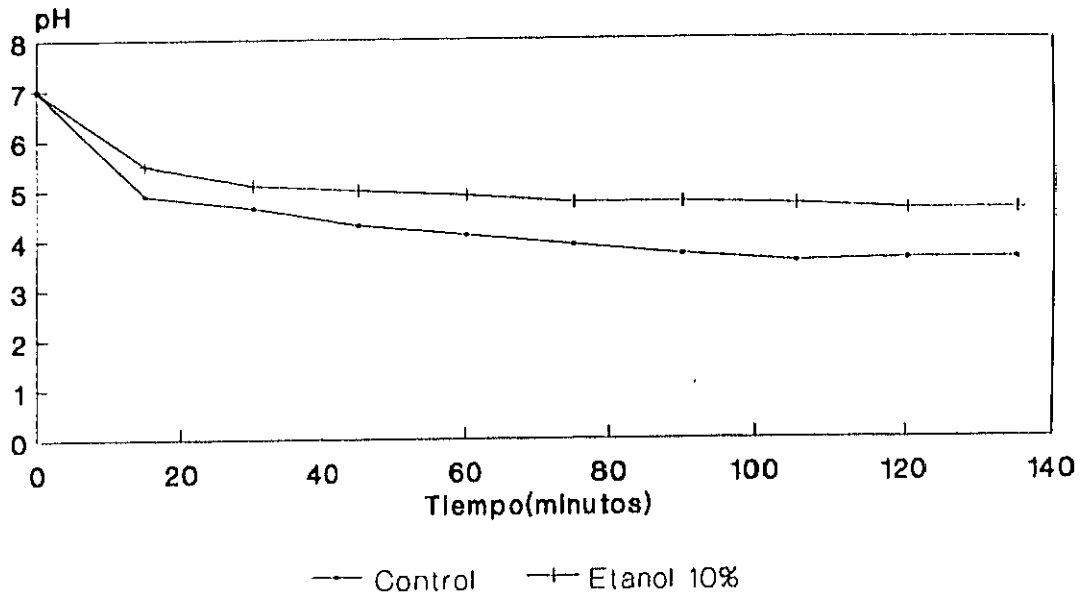


Figura 38.

Tiempos (minutos)	Concentraciones de etanol	
	control	10 % (v/v)
0	7.0	7.0
15	4.9	5.5
30	4.65	5.1
45	4.3	5.0
60	4.1	4.9
75	3.9	4.75
90	3.7	4.75
105	3.55	4.7
120	3.6	4.6
135	3.6	4.6

Tabla 35.- Estabilización del pH en *C. pseudotropicalis*

La tabla presenta los valores de pH obtenidos ,estando las células en contacto con el etanol en las concentraciones descritas.

Estabilización del pH en *P. stipitis*

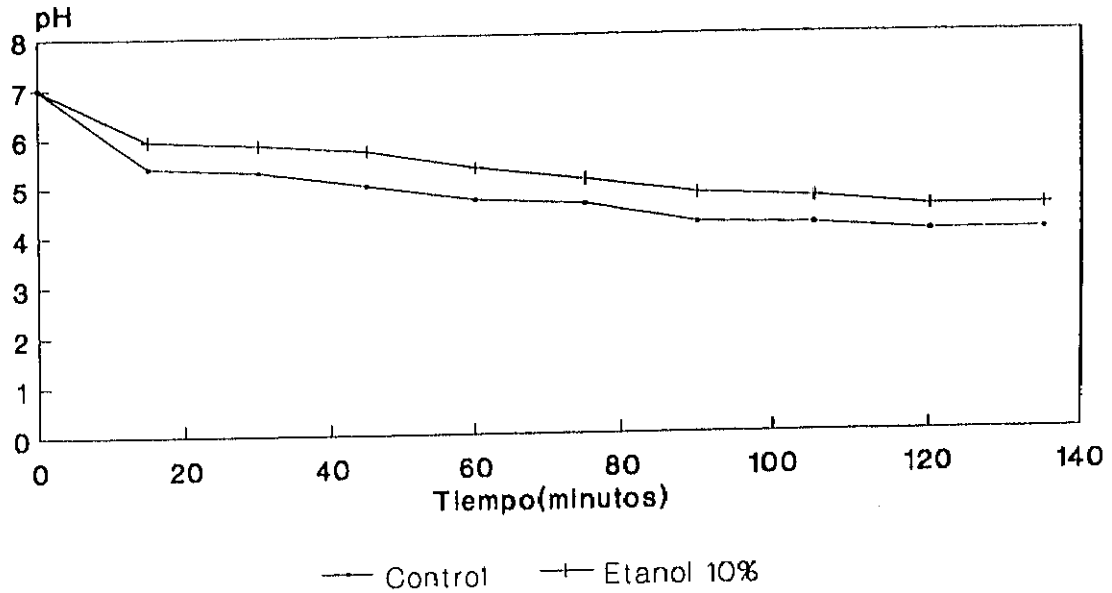


Figura 39.

Tiempos (minutos)	Concentraciones de etanol	
	control	10 % (v/v)
0	7.0	7.0
15	5.4	5.95
30	5.3	5.85
45	5.0	5.7
60	4.7	5.35
75	4.6	5.1
90	4.2	4.8
105	4.15	4.7
120	4.0	4.5
135	4.0	4.5

Tabla 36.- Estabilización pH en *P. stipitis*

La tabla presenta los valores de pH obtenidos al poner las células en contacto con el etanol en las concentraciones descritas.

Estabilización del pH en
K. marxianus

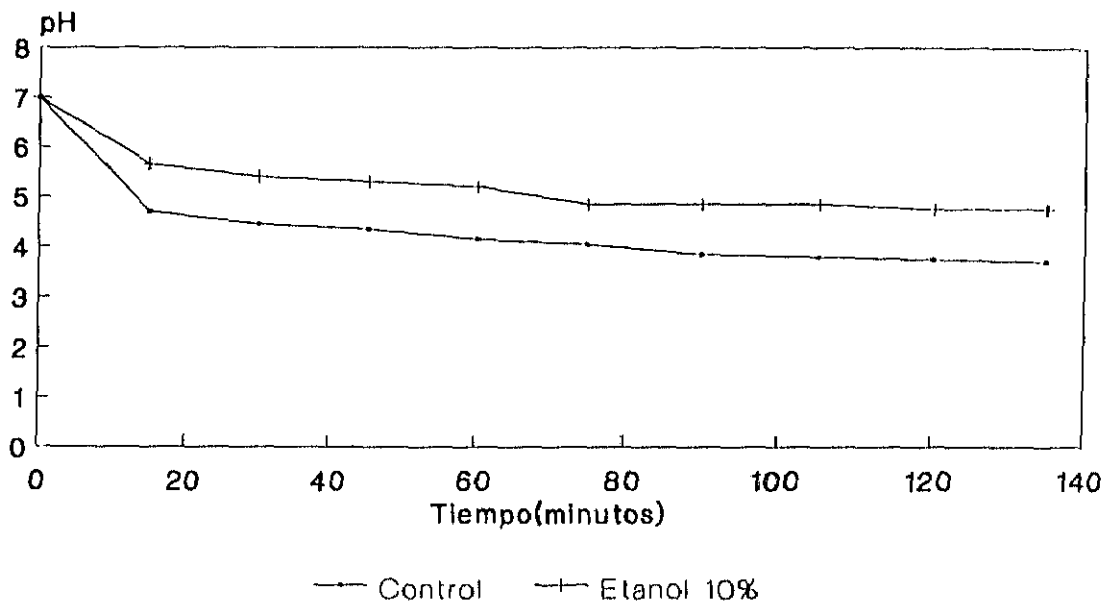


Figura 40.

Tiempos (minutos)	Concentraciones de etanol	
	control	10 % (v/v)
0	7.0	7.0
15	4.9	6.1
30	4.7	6.0
45	4.4	5.9
60	4.3	5.7
75	4.2	5.6
90	4.15	5.3
105	4.05	5.1
120	4.0	5.0
135	4.0	5.0

Tabla 37.- Estabilización pH en *K. marxianus*

La tabla presenta los valores de pH obtenidos al poner en contacto las células con el etanol, en las concentraciones descritas.

III.3.6.- Comparación de los resultados obtenidos.

Los valores obtenidos en los pH extracelulares a lo largo de 135 minutos, nos permiten comparar los tiempos necesarios para obtener una estabilización del pH extracelular en las cinco estirpes ensayadas.

Los resultados obtenidos quedan expresados en la tabla 38.

Estirpes	Control	Etanol 10.0 %
<i>S. cerevisiae</i>	45	105
<i>C. utilis</i>	120	120
<i>C. pseudotropicalis</i>	105	120
<i>P. stipitis</i>	120	120
<i>K. marxianus</i>	120	120

Tabla 38.- Tiempo mínimos para la estabilización del pH extracelular

III.3.6.- Alteración por etanol de la actividad ATP-asa de la membrana plasmática. Cálculo de las tasas extrusión activa de protones, a través de la membrana

Siguiendo la metodología empleada por Loureiro-Dias y Peinado (1984), manteníamos cultivos celulares en contacto con etanol durante 60 minutos. Posteriormente se recogían las células por centrifugación, eliminando así el etanol tras varios lavados en agua destilada, y una suspensión celular concentrada de estas levaduras tratadas, se energizaba con 100.0 μ l de glucosa 1.0 M.

La extrusión activa de protones inmediata, se media mediante un electrodo de pH conectado a un registrador y la variación de estos valores se recogía gráficamente de manera continua hasta su estabilización.

La concentración de etanol utilizada en todos los ensayos fué del 10.0 %. En todas las estirpes estudiadas se realizó un ensayo control sin tratamiento con etanol.

Las curvas de acidificación correspondientes a las cinco estirpes ensayadas se representan gráficamente en las figuras 41, 42, 43, 44, y 45.

La tasa de extrusión activa de protones se mide calculando la pendiente, sobre el registro gráfico de la acidificación, de una porción rectilínea de la curva (20 segundos). (Cartwright y col. (1986).

La tasa de extrusión activa de protones vendría expresada en nmoles de protones/segundo.

La biomasa celular utilizada en todos los ensayos fué de 5 mg peso seco/ml, por lo tanto calcularíamos la tasa específica de extrusión activa de protones y la expresaríamos finalmente en: nmoles de H^+ /mg peso celular/min.

Los valores de las tasas específicas de extrusión (K_p) vienen representados en la tabla 39 y en la figura 46.

Curvas de acidificación en
S. cerevisiae

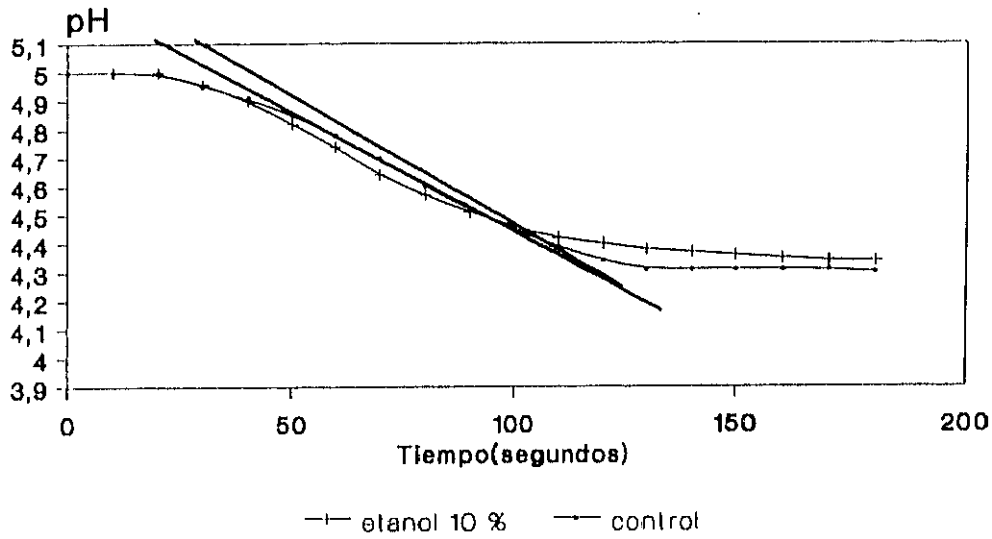


Figura 41.

Curvas de acidificación en
C. utilis

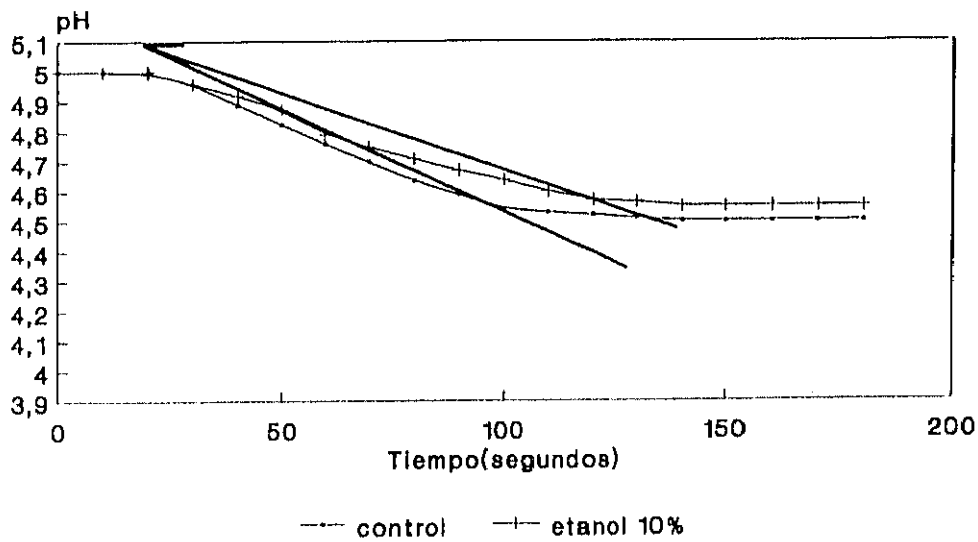


Figura 42.

Curvas de acidificación en
C. pseudotropicalis

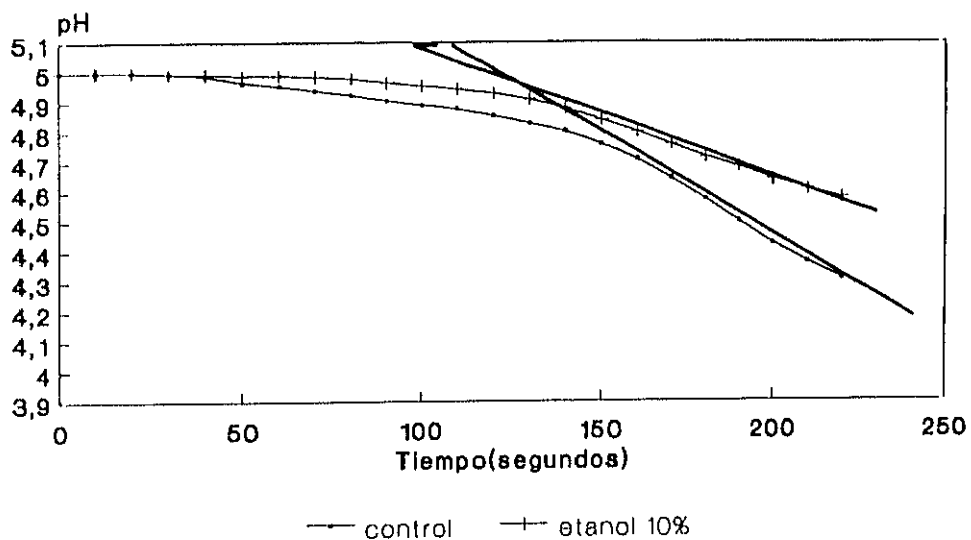


Figura 43.

Curvas de acidificación en
P. stipitis

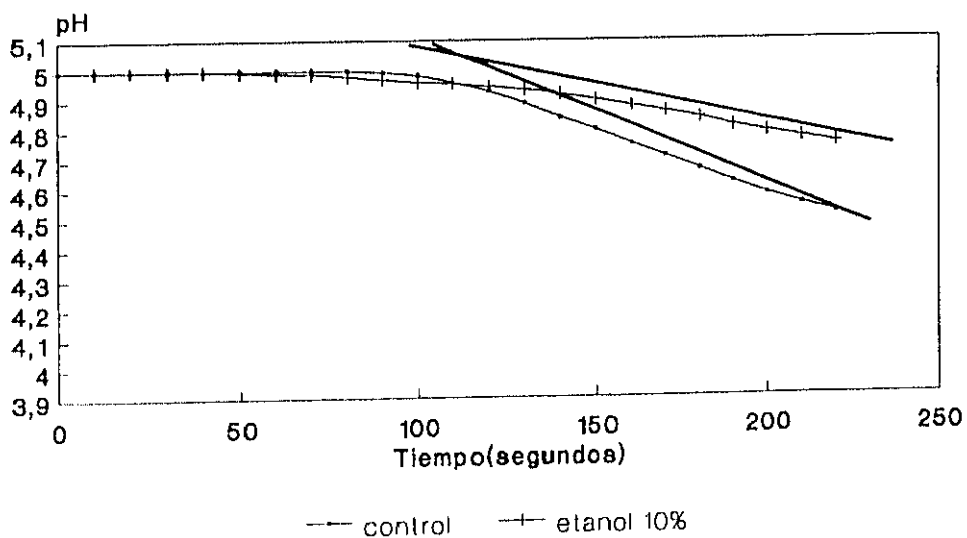


Figura 44.

Curvas de acidificación en
K. marxianus

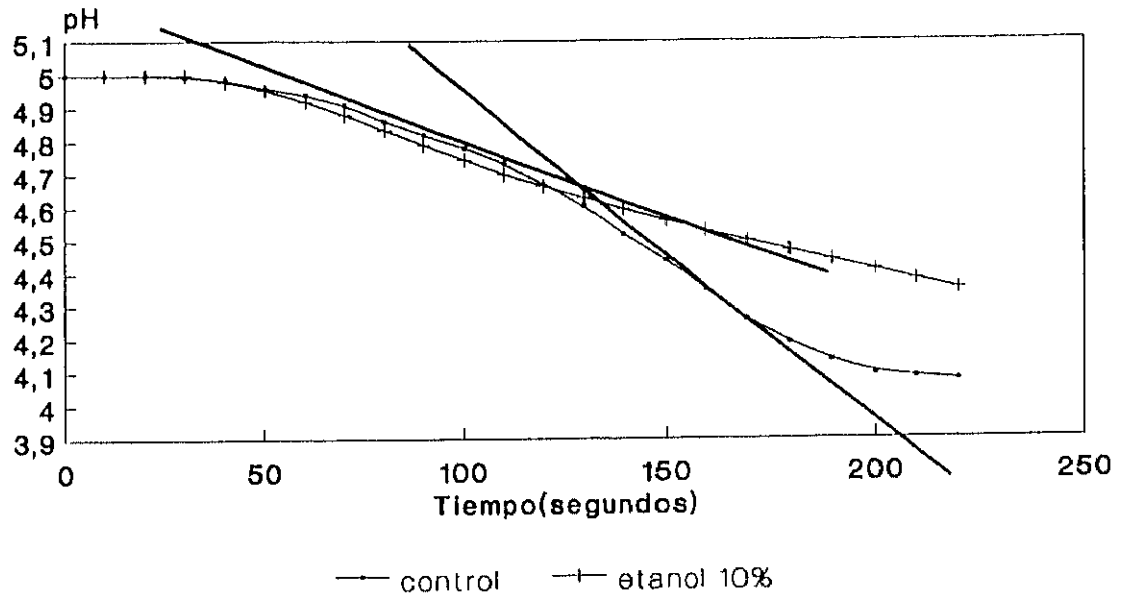


Figura 45.

Inhibición por etanol de las tasas de extrusión activa de protones (K_p)

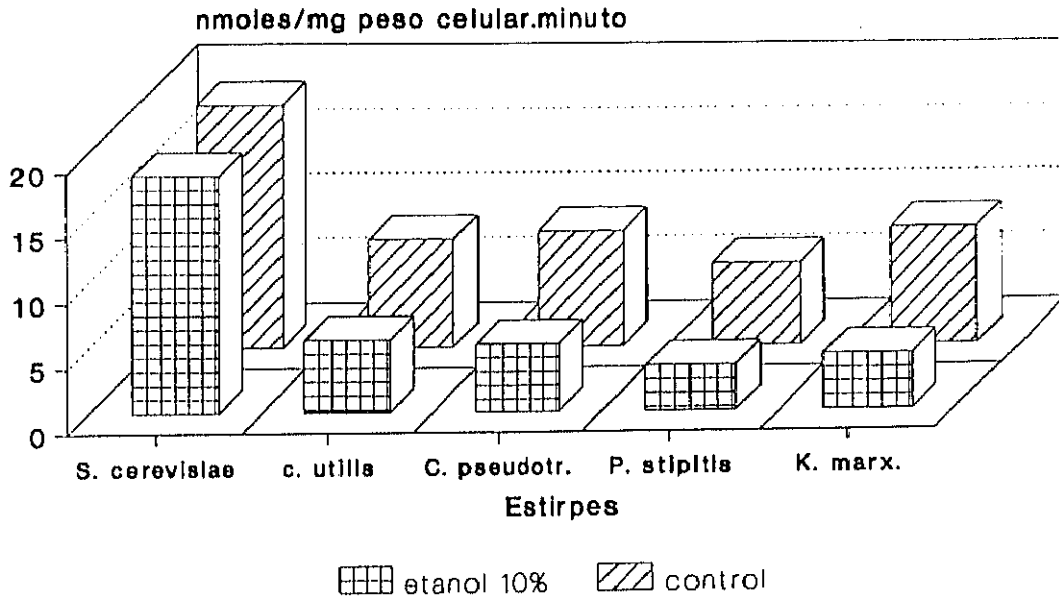


Figura 46.

Estirpes	Control	Etanol 10 %
<i>S. cerevisiae</i>	18.72	18.18
<i>C. utilis</i>	8.28	5.57
<i>C. pseudotropicalis</i>	8.82	5.22
<i>P. stipitis</i>	6.30	3.49
<i>K. marxianus</i>	9.00	4.30

Tabla 39.- Tasas específicas de extrusión activa de protones (K_p)

Los valores de K_p vienen expresados en nmoles de protones/mg peso células/minuto.

III.3.7.- Comparación entre las tasas de extrusión activa de protones (K_p) en las cinco estirpes ensayadas.

Según la propuesta de Jimenez y van Uden (1985) para el cálculo de K (constante exponencial del flujo pasivo de protones) la tasa K_p no varía o permanece prácticamente constante por el tratamiento con etanol en sus estirpes.

Según nuestros resultados experimentales las tasas K_p de nuestras estirpes si tendrían sus valores alterados en las proporciones que exponemos en la tabla 40.

<u>Estirpes</u>	<u>Control</u>	<u>Etanol 10%</u>	<u>Inhibición</u>
<i>S. cerevisiae</i>	18.72	18.18	2.88 %
<i>C. utilis</i>	8.28	5.57	32.72 %
<i>C.pseudotropicalis</i>	8.82	5.22	40.81 %
<i>P. stipitis</i>	6.30	3.49	44.60 %
<i>K. marxianus</i>	9.00	4.30	52.22 %

Tabla 40.- Inhibición* de las tasas específicas de extrusión (K_p)** debidas a la acción del etanol.

$$*\% \text{ de inhibición} = (1 - K_p \text{ con etanol al } 10\% / K_p \text{ control}) \times 100$$

**nmoles de protones/mg peso celular/minuto.

III.4.- CÁLCULO DE LA TOLERANCIA AL ETANOL MEDIANTE EL ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ALTERACIONES DE LOS FLUJOS DE SALIDA DE LOS COMPUESTOS INTRACELULARES QUE ABSORBEN A 260 NM , DEBIDO A LA ACCIÓN DEL ETANOL.

Salgueiro y cols. (1988), comprobaron en *Saccharomyces* que el etanol actuaba estimulando la velocidad y cuantía de la salida al exterior celular de compuestos intracelulares que absorben a una longitud de onda de 260 nm. y que dicha estimulación era función de la concentración de etanol.

El método propuesto por estos autores consiste en la medida de la concentración extracelular de estos compuestos en una suspensión de levaduras a lo largo del tiempo.

Según este método, la estimulación de dicho flujo de salida por etanol, es exponencial y existe una relación entre la tasa de salida de los productos intracelulares que absorben a 260 nm y la tolerancia al etanol, definida mediante una constante exponencial de estimulación (E).

III.4.1.- Estudio de la salida de los compuestos intracelulares que absorben a 260 nm, en presencia de etanol.

Siguiendo las técnicas propuestas por Salgueiro y col.(1988) se procedía a preparar una suspensión celular concentrada (5×10^7 células/ml) sobre tampón fosfato/fosfórico.

Esta suspensión celular se repartía en frascos de vidrio de 500 ml de tapon de rosca, conteniendo cada uno 100 ml de suspensión.

Se les añadía etanol hasta concentraciones finales de 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 % (v/v). Se mantenía un frasco control carente de etanol. Se mantenía en agitación orbital (200 r.p.m.) y temperatura constante 28 °C, durante 90 minutos.

Se tomaban muestras de 5.0 ml de cada frasco, cada 15 minutos, se centrifugaba y se leía la densidad óptica del sobrenadante, en espectrofotómetro UV a 260 nm.

Los resultados de las lecturas espectrofotométricas se presentan en las tablas: 41, 42, 43, 44 y 45 y en las figuras 47, 48, 49, 50 y 51.

Salida de compuestos A260 en *S. cerevisiae*

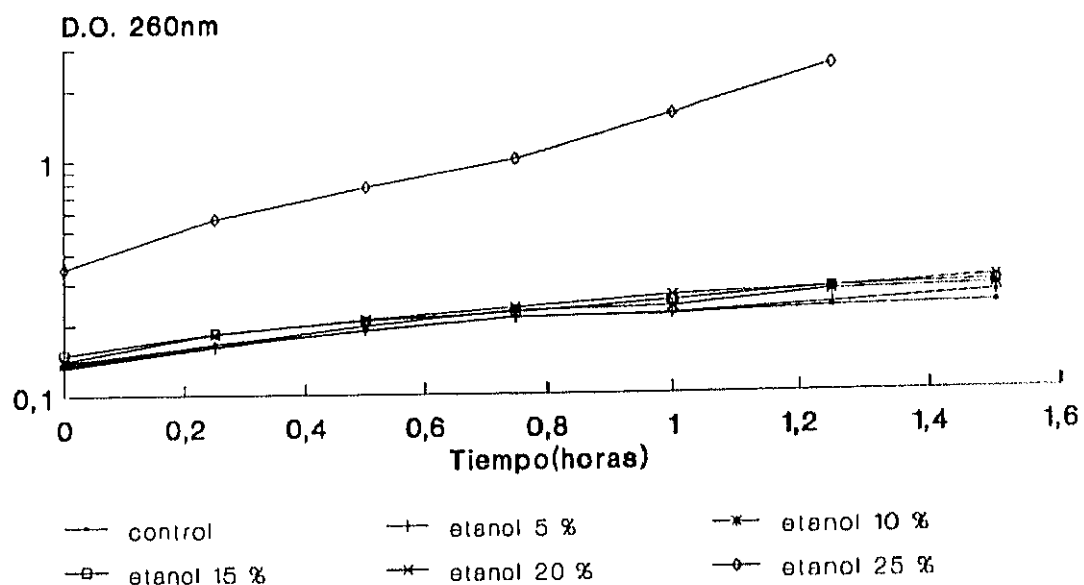


Figura 47.

Tiempo (horas)	Concentraciones de etanol % (v/v)					
	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
0.0	0.134	0.131	0.138	0.149	0.141	0.348
0.25	0.165	0.160	-----	0.184	0.182	0.565
0.5	0.187	0.189	0.197	0.207	0.210	0.771
0.75	0.214	0.213	0.228	0.224	0.235	1.011
1.0	0.216	0.220	0.234	0.249	0.262	1.562
1.25	0.230	0.238	0.270	0.278	0.278	2.500
1.5	0.235	0.261	0.278	0.289	0.303	-----

Tabla 41.- Salida de compuestos intracelulares que absorben a 260 nm en *S. cerevisiae*

Los valores vienen expresados en unidades de absorbancia.

Salida de compuestos A260 en *C. utilis*

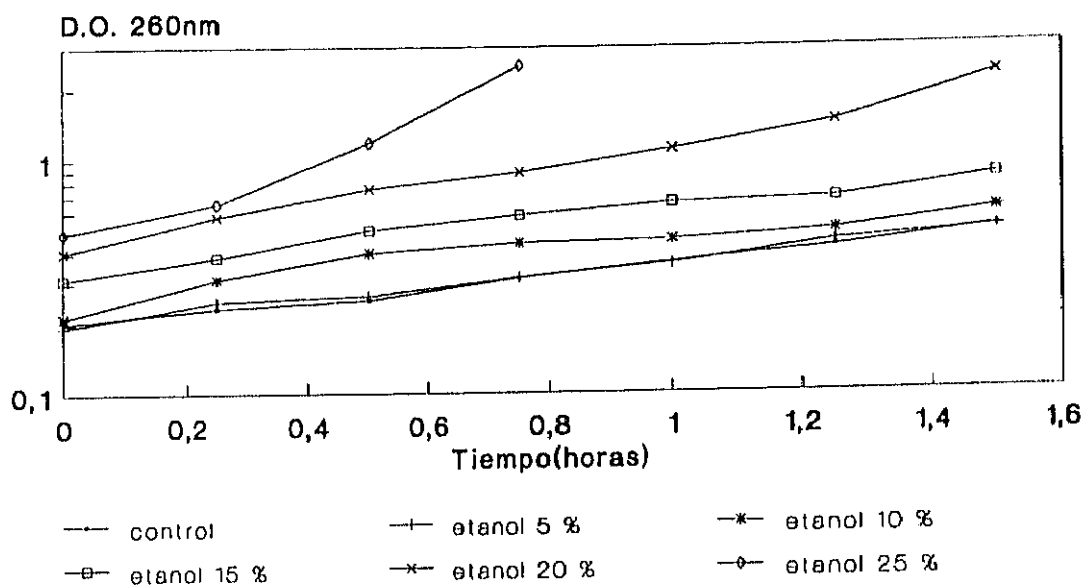


Figura 48.

Tiempo (horas)	Concentraciones de etanol % (v/v)					
	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
0.0	0.202	0.193	0.213	0.311	0.406	0.489
0.25	0.233	0.249	----	0.385	0.578	0.655
0.5	0.252	0.263	0.402	0.504	0.757	1.187
0.75	0.312	0.315	0.441	0.581	0.882	2.500
1.0	0.366	0.359	0.455	0.656	1.105	-----
1.25	0.419	0.446	0.497	0.682	1.435	-----
1.5	0.503	0.499	0.600	0.836	2.265	-----

Tabla 42.- Salida de compuestos intracelulares que absorben a 260 nm en *C. utilis*.

Los valores vienen expresados en unidades de absorbancia.

Salida de compuestos A260 en
C. pseudotropicalis

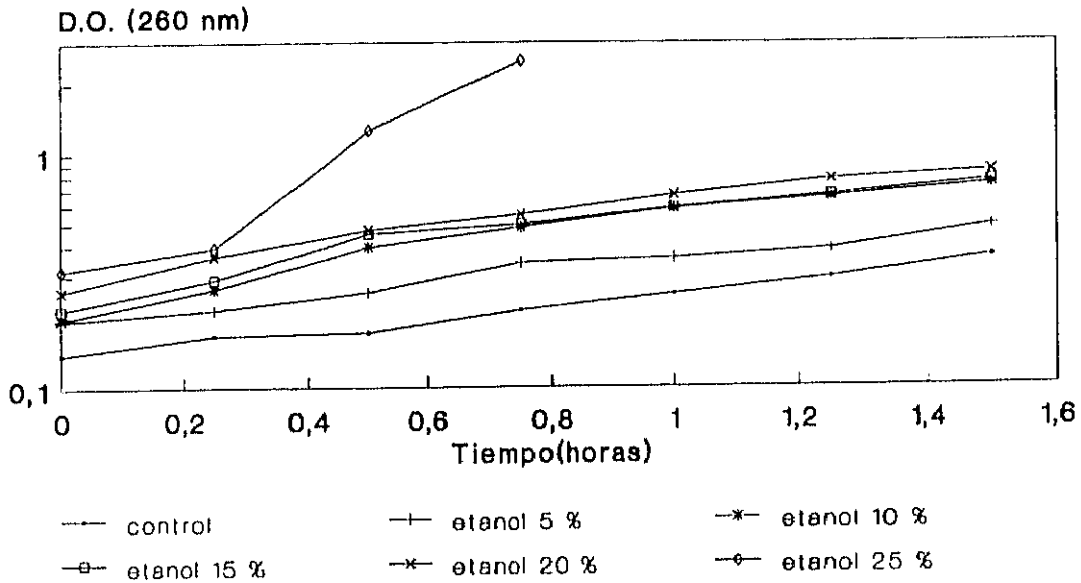


Figura 49.

Tiempo (horas)	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
0.0	0.138	0.192	0.195	0.214	0.257	0.315
0.25	0.166	0.214	0.263	0.288	0.362	0.394
0.5	0.171	0.254	0.397	0.453	0.471	1.263
0.75	0.212	0.338	0.481	0.496	0.547	2.500
1.0	0.248	0.354	0.580	0.587	0.663	----
1.25	0.291	0.387	0.647	0.663	0.774	----
1.5	0.357	0.485	0.731	0.757	0.833	----

Tabla 43.- Salida de compuestos intracelulares que absorben a 260 nm en *C. pseudotropicalis*.

Los valores vienen expresados en unidades de absorbancia.

**Salida de compuestos A260 en
*P.stipitis***

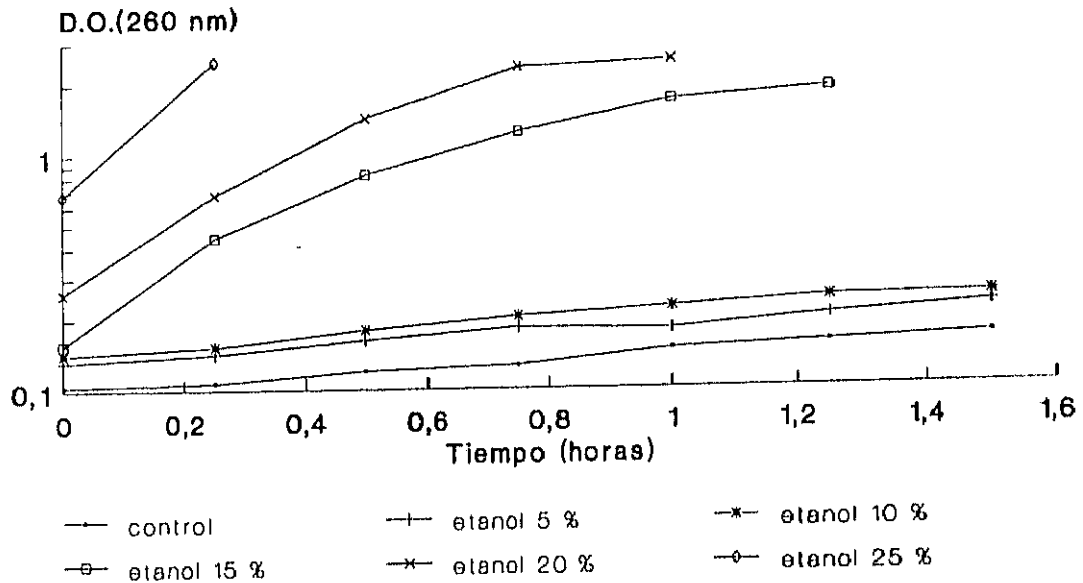


Figura 50.

Tiempo (horas)	Concentraciones de etanol % (v/v)					
	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
0.0	0.104	0.132	0.142	0.156	0.259	0.674
0.25	0.107	0.142	0.153	0.445	0.676	2.500
0.5	0.120	0.163	0.180	0.821	1.430	----
0.75	0.126	0.183	0.204	1.243	2.345	----
1.0	0.147	0.179	0.222	1.691	2.500	----
1.25	0.156	0.203	0.242	1.875	----	----
1.5	0.165	0.223	0.245	----	----	----

Tabla 44.- Salida de compuestos intracelulares que absorben a 260 nm en *P. stipitis*.

Los valores vienen expresados en unidades de absorbancia.

Salida de compuestos intracelulares A260 en *K. marxianus*

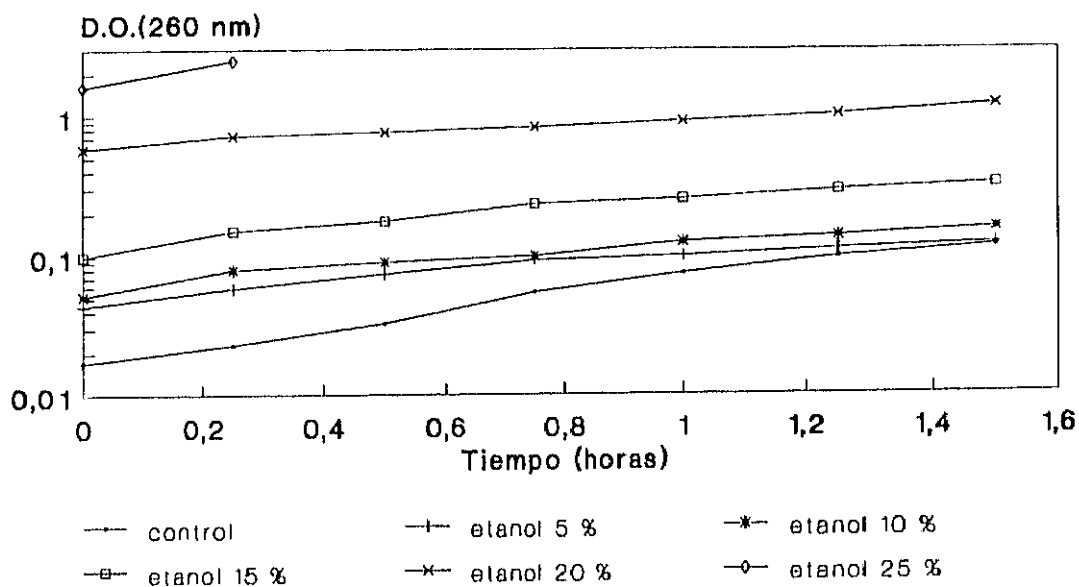


Figura 51.

TIEMPOS (horas)	Concentraciones de etanol % (v/v)					
	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
0.0	0.017	0.044	0.052	0.100	0.584	1.613
0.25	0.023	0.059	0.080	0.152	0.721	2.500
0.5	0.033	0.075	0.091	0.179	0.767	----
0.75	0.075	0.093	0.100	0.236	0.827	----
1.0	0.075	0.100	0.126	0.255	0.912	----
1.25	0.098	0.112	0.139	0.294	1.017	----
1.5	0.117	0.122	0.157	0.325	1.194	----

Tabla 45.- Salida de compuestos intracelulares que absorben a 260 nm en *K. marxianus*.

Los valores vienen expresados en unidades de absorbancia.

III.4.2.- Medida de la viabilidad celular mediante determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina.

Para confirmar que el incremento de densidad óptica no era debido a un proceso autolítico inducido por etanol, se procedió a determinar la actividad de la fosfatasa alcalina en los sobrenadantes, como indicador de la viabilidad celular.

De los sobrenadantes obtenidos hemos valorado la actividad enzimática siguiendo la metodología descrita. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 420 nm. Se realizó una recta patrón de PNP para su valoración figura 52.

Se ha considerado el valor de unidad enzimática a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 nmol de p-nitro fenol por ml/min en las condiciones de reacción.

Los resultados obtenidos se exponen en las tablas 46, 47, 48, 49 y 50.

Recta patrón de p-nitro fenol

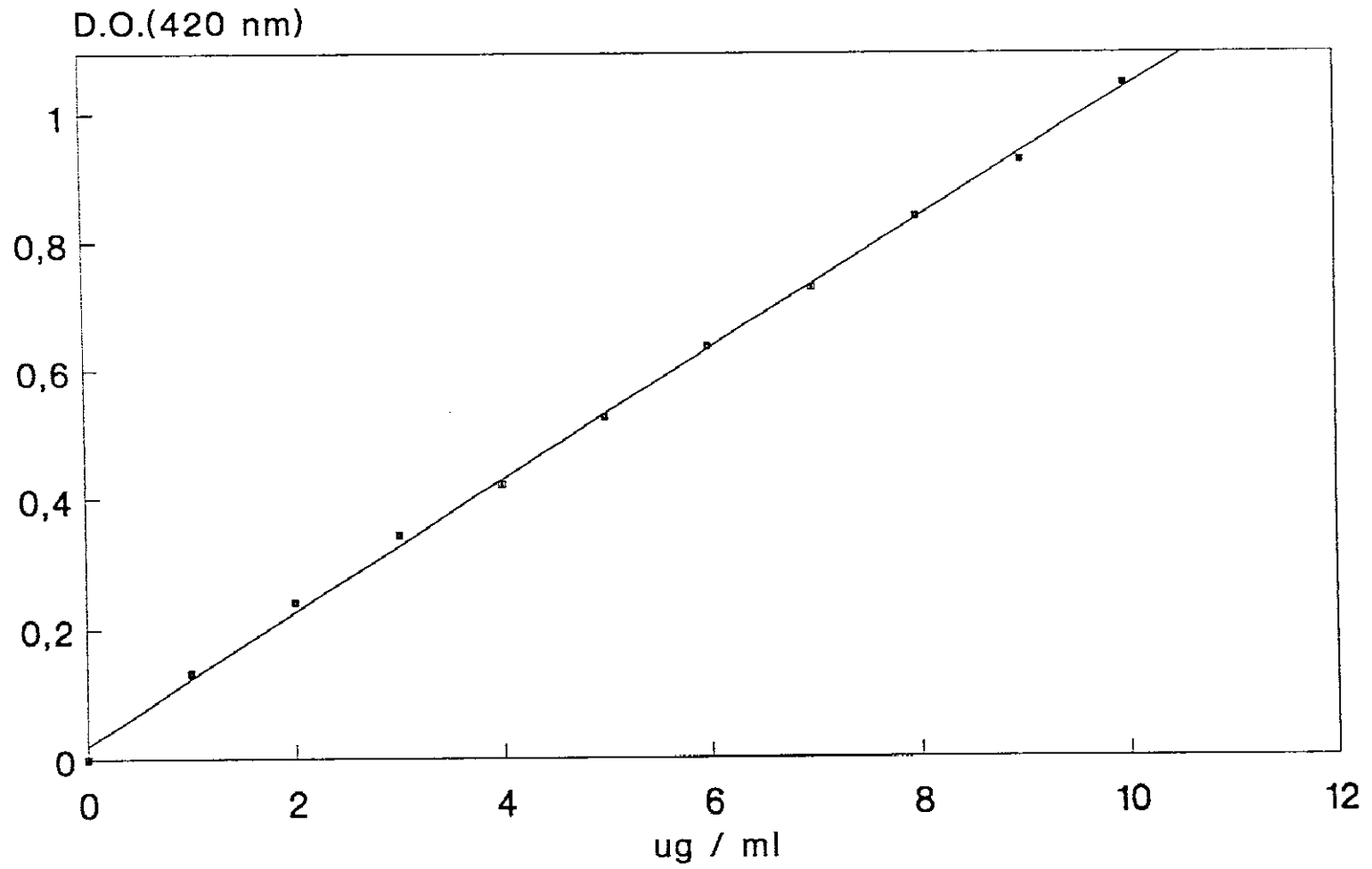


Figura 52.

Tiempo (minutos)	Concentraciones de etanol					
	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
0	2.451	2.310	2.099	3.155	2.099	3.155
30	2.310	2.310	2.451	2.803	2.099	2.648
60	2.099	2.310	2.310	2.240	1.958	3.155
90	1.958	2.333	2.648	2.592	2.099	3.155

Tabla 46.- Medida de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en *S.*

cerevisiae. (Los valores vienen expresados en unidades enzimáticas)

Tiempo (minutos)	Concentraciones de etanol					
	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
0	1.817	1.817	1.817	1.747	1.677	1.817
30	1.747	1.817	1.747	1.888	1.817	1.817
60	1.817	1.817	1.817	1.888	1.817	1.888
90	1.958	1.888	1.958	2.029	1.958	1.958

Tabla 47.- Medida de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en *C. utilis*.

(Los valores vienen expresados en unidades enzimáticas)

Tiempo (minutos)	Concentraciones de etanol					
	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
0	1.606	1.536	1.536	1.536	1.536	1.606
30	1.536	1.536	1.606	1.536	1.536	1.606
60	1.536	1.536	1.465	1.536	1.536	1.536
90	1.536	1.606	1.536	1.536	1.536	1.536

Tabla 48.- Medida de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en *C.*

pseudotropicalis. (Los valores vienen expresados en unidades enzimáticas)

Tiempo (minutos)	Concentraciones de etanol					
	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
0	1.223	1.259	1.139	1.280	1.012	1.223
30	1.329	1.139	1.012	1.097	1.026	1.094
60	1.259	1.336	1.026	1.104	10.61	1.026
90	-----	1.083	1.097	0.984	1.125	1.033

Tabla 49.- Medida de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en *P. stipitis*.

(Los valores vienen expresados en unidades enzimáticas)

Tiempo (minutos)	Concentraciones de etanol					
	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
0	1.677	1.747	1.817	1.817	1.888	1.747
30	1.677	1.677	1.677	1.226	1.677	1.747
60	1.677	1.747	1.888	1.888	1.888	1.888
90	1.888	1.888	2.240	1.888	1.888	1.747

Tabla 50.- Medida de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en *K.*

marxianus. (Los valores vienen expresados en unidades enzimáticas)

III.4.3.- MEDIDA DE LAS TASAS DE SALIDA DE LOS PRODUCTOS INTRACELULARES QUE ABSORBEN A 260 nm (K_e^X).

Según Salgueiro y cols. (1988), bajo condiciones isotérmicas, la velocidad o tasa de salida de los compuestos que absorben a 260 nm es una función exponencial de la concentración de etanol, de la siguiente forma:

$$K_e^X = K_e^{X_m} e^{E(x-x_m)}$$

Siendo:

X: las distintas concentraciones de etanol ensayadas.

X_m : concentración mínima de etanol a la que se cumple esta ecuación.

K_e^X : velocidad o tasa de salida de los compuestos que absorben a 260 nm, a una concentración de etanol (X).

$K_e^{X_m}$: velocidad o tasa de salida de los compuestos que absorben a 260 nm, a una concentración de etanol (X_m).

En su trabajo y para las estirpes de levaduras ensayadas por ellos, el valor de X_m es aproximadamente igual a 5.0 % y el valor de X que cumple esta ecuación varía entre el 5.0-15.0 %.

El valor de K_c^x es la pendiente de la recta formada por la relación entre los valores de D.O. (260 nm) medidos y los tiempos transcurridos.

Hemos calculado en nuestro trabajo el valor de esas tasas de salida K_c^x entre los valores de 5.0 y 15.0 % de etanol, para las cinco estirpes ensayadas.

Sus valores quedan expresados en la tabla 51 y en las figuras 53, 54, 55, 56 y 57.

Tasas de salida de A260 en
S. cerevisiae

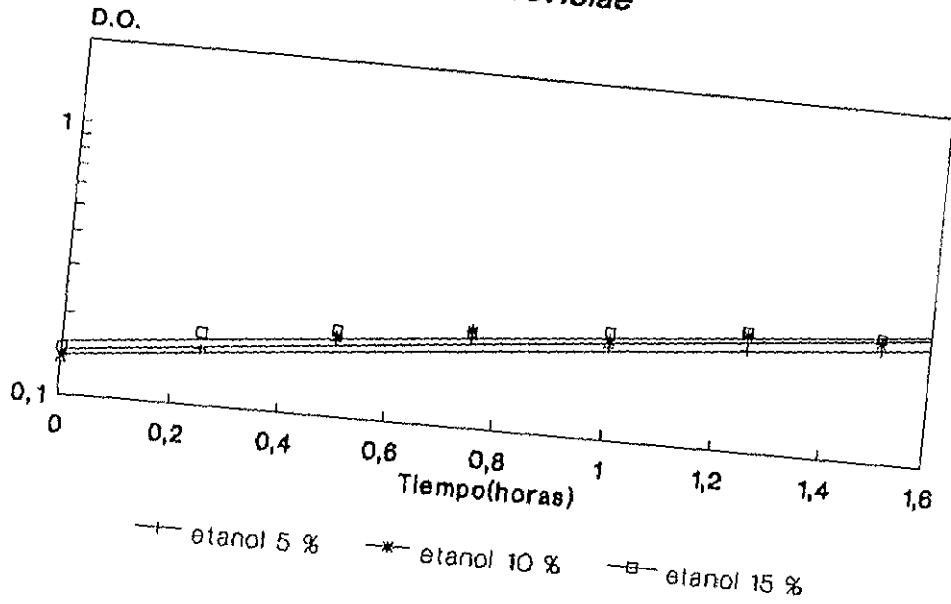


Figura 53

Tasas de salida de compuestos A260 en
C. utilis

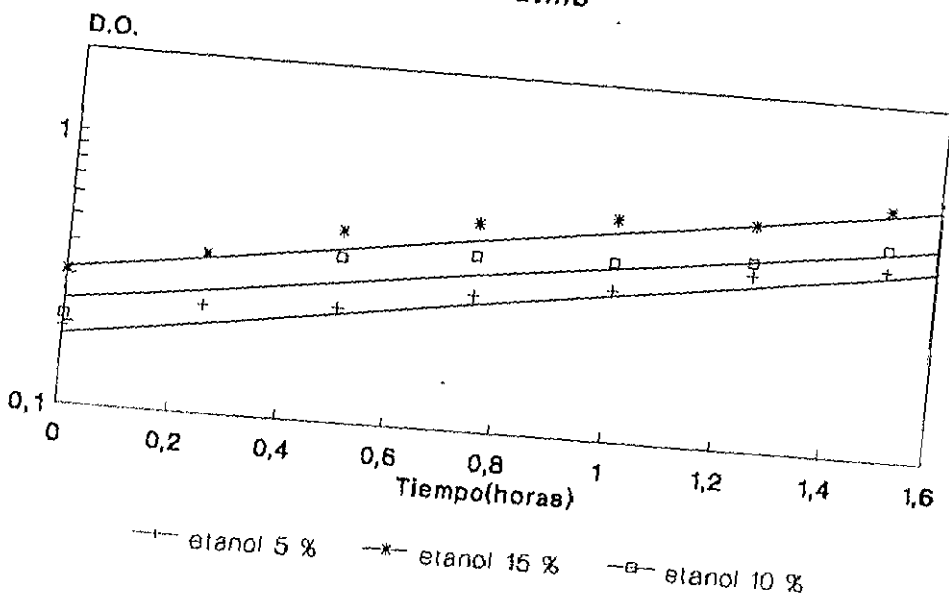


Figura 54

Tasas de salida de compuestos A260 en
C. pseudotropicalis

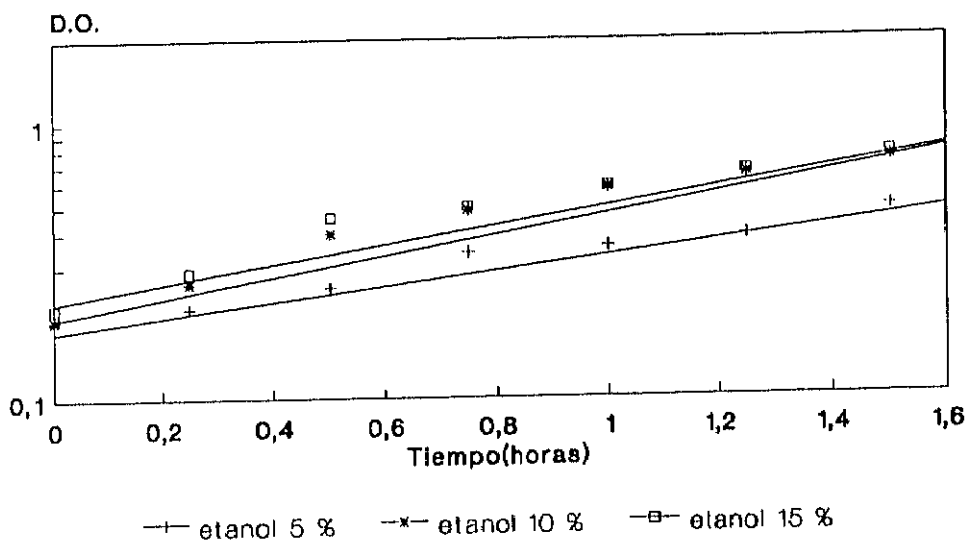


Figura 55.

Tasas de salida de compuestos A260 en
P. stipitis

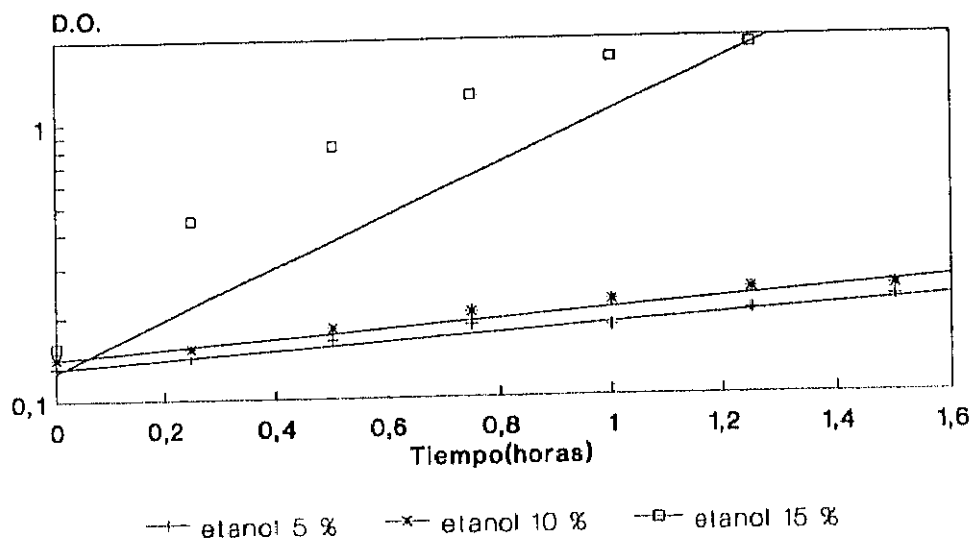


Figura 56.

Tasas de salida de compuestos A260 en
K. marxianus

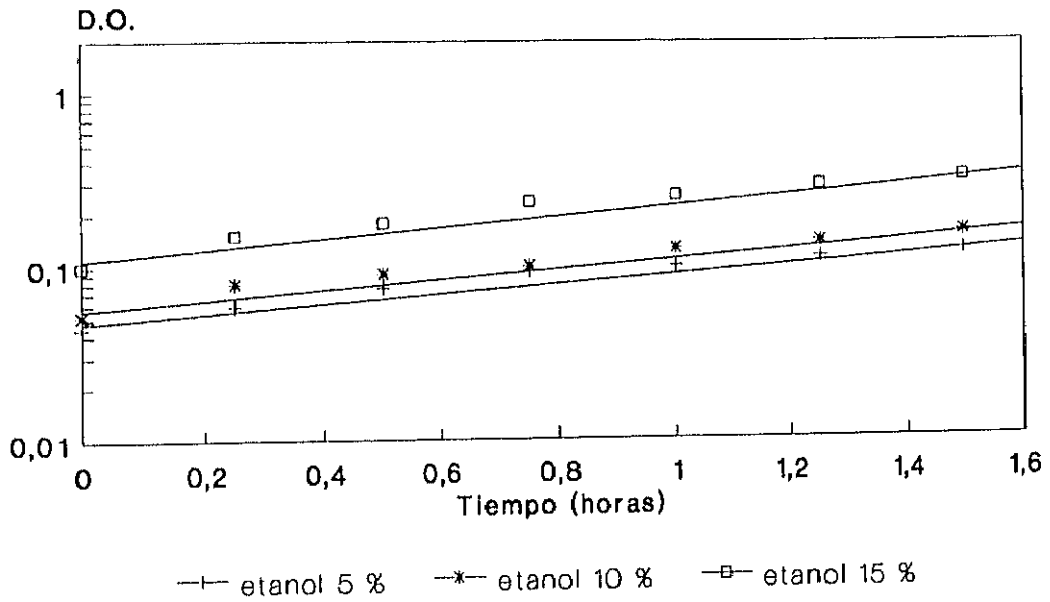


Figura 57.

Estirpes	Concentraciones etanol	Pendientes K_e^x	Coefficientes correlación
<i>S. cerevisiae</i>	5 %	0.430	0.97
	10 %	0.462	0.97
	15 %	0.428	0.98
<i>C. utilis</i>	5 %	0.618	0.99
	10 %	0.615	0.95
	15 %	0.624	0.98
<i>C.pseudotropicalis</i>	5 %	0.613	0.98
	10 %	0.877	0.97
	15 %	0.817	0.96
<i>P. stipitis</i>	5 %	0.340	0.98
	10 %	0.390	0.98
	15 %	1.925	0.95
<i>K. marxianus</i>	5 %	0.661	0.97
	10 %	0.683	0.97
	15 %	0.744	0.96

Tabla 51.- Tasas de salida K_e^x .

III.4.4.- Calculo de las constantes exponenciales de estimulación de salida de productos intracelulares que absorben a 260 nm (E).

A partir de la ecuación :

$$K_e^X = K_e^{X_m} e^{E(X-X_m)} \quad (1)$$

Salgueiro y cols. (1988) suponen que los valores de X_m y $K_e^{X_m}$ son constantes, para todas las estirpes ensayadas por ellos, siempre que las condiciones experimentales sean las mismas. Se puede escribir la ecuación (1) de la forma:

$$\log K_e^X = \log K_e^{X_m} + E(X-X_m) \log e \quad (2)$$

ó

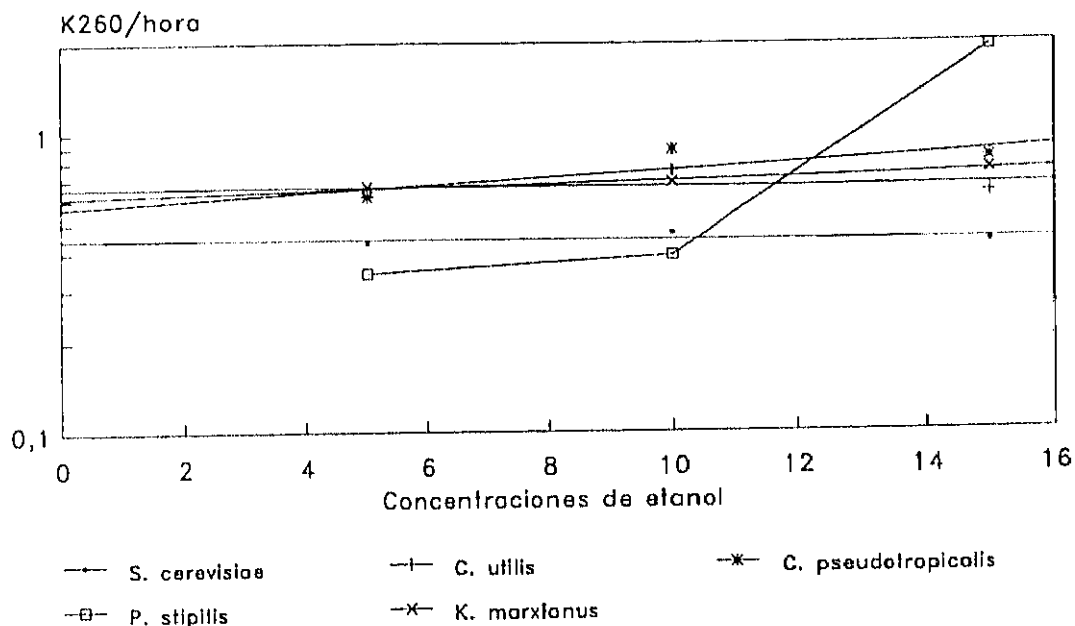
$$\ln K_e^X = \ln K_e^{X_m} + E(X-X_m) \quad (3)$$

Es decir, la ecuación (3) podría expresarse como la ecuación de una recta de la que E sería la pendiente.

Los resultados obtenidos por nosotros, en el cálculo de los valores de E para nuestras estirpes vienen expresados en la tabla 52 y en la figura 58.

El valor de E para la estirpe *P. stipitis* no se podía obtener pues los valores de K_e^X no se ajustaban a una recta.

Constantes de estimulación (E)



Figuro 5B

Estirpes	(E)
<i>S. cerevisiae</i>	-0.0004
<i>C. utilis</i>	0.0009
<i>C. pseudotropicalis</i>	0.0280
<i>P. stipitis</i>	-----
<i>K. marxianus</i>	0.0110

Tabla 52.- Constantes exponenciales de estimulación (E).

Los valores vienen expresados en molar⁻¹.

III.4.5.- Estudio comparativo entre los diferentes valores de la constante exponencial de estimulación (E) y la tolerancia al etanol, según este método.

El valor de la constante exponencial de estimulación (E) es propuesto por los autores Salgueiro y cols. (1988) como factor de correlación inversa de la tolerancia al etanol, es decir, los valores menores indicarían una mayor tolerancia al etanol.

Los autores proponen que los valores absolutos de K_e^x nos pueden servir también para comparar tolerancias entre las diferentes estirpes. El problema en la comparación de los valores de (E), era para nosotros el caso de *P. stipitis*. Hemos puesto a *P. stipitis* en último lugar por ser su K_e^x (K_e^{15}) el valor más alto de todos los resultados obtenidos.

Los resultados de este estudio comparativo quedan expresados en la tabla

Orden	Estirpes	(E)
1ª	<i>S. cerevisiae</i>	-0.0004
2ª	<i>C. utilis</i>	0.0009
3ª	<i>K. marxianus</i>	0.0110
4ª	<i>C. pseudotropicalis</i>	0.0280
5ª	<i>P. stipitis</i>	-----

Tabla 53.- Orden de tolerancia al etanol según las constantes exponenciales de estimulación (E). (Los valores vienen expresados en molar⁻¹)

III.4.6.- Comparacion entre las constantes exponenciales de estimulacion de salida de productos intracelulares que absorben a 260 nm. (E) y la inhibicion de la fermentacion.

La comparación de los resultados obtenidos en el apartado de inhibición de fermentación, con los obtenidos según el método de Salgueiro y cols. (1988) se expone en la tabla 54.

Orden	Método(Salgueiro y cols)	Método(tasas específicas de fermentación)
1ª	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
2ª	<i>C. utilis</i>	<i>C. utilis</i>
3ª	<i>K. marxianus</i>	<i>K. marxianus</i>
4ª	<i>C. pseudotropicalis</i>	<i>C. pseudotropicalis</i>
5ª	<i>P. stipitis</i>	<i>P. stipitis</i>

Tabla 54.- Comparación de las tolerancias al etanol, según el método de Salgueiro y cols. y el método de medida directa de las tasas específicas de fermentación.

III.4.7.- Alteraciones en la cinetica de salida de A_{260} a concentraciones de etanol superiores al 15 %.

Tal como se deduce de los resultados expuestos anteriormente el cálculo de (E) definido por Salgueiro y cols. se puede realizar para casi todas las estirpes estudiadas por nosotros en un rango de concentraciones entre 5.0 y 15.0 % de etanol. A concentraciones superiores, que varían según la estirpe, hemos podido observar que la cinética de salida de compuestos A_{260} experimenta un cambio importante, como consecuencia de la concentración de etanol, dependiendo de las estirpes y del tiempo de contacto. Resultando en estos casos imposible ajustar los valores de K_e^x a una recta (tabla 55).

Estirpes	Concentraciones de etanol
<i>S. cerevisiae</i>	20 %
<i>C. utilis</i>	20 %
<i>C. pseudotropicalis</i>	20 %
<i>P. stipitis</i>	10 %
<i>K. marxianus</i>	20 %

Tabla 55.- Concentraciones de etanol a partir de las cuales los valores de K_e^x no pueden ajustarse a una recta.

III.4.8.- Salida de compuestos intracelulares que absorben a 260 nm a tiempos muy cortos.

En las tablas expuestas anteriormente se presentan unos valores de densidad óptica, en lo que se considera experimentalmente tiempo cero, según el método de Salgueiro y cols.

Pero hemos de tener presente que el proceso para la valoración de esos compuestos A_{260} lleva consigo que el etanol esté un cierto tiempo en contacto con las células, unos siete minutos.

Por estas condiciones, hemos preferido llamarlas salidas a tiempos muy cortos.

Los valores de estas salidas se representan en las figuras 59, 60, 61, 62, 63 y 64.

Salida a tiempos muy cortos de compuestos A260 en *S. cerevisiae*

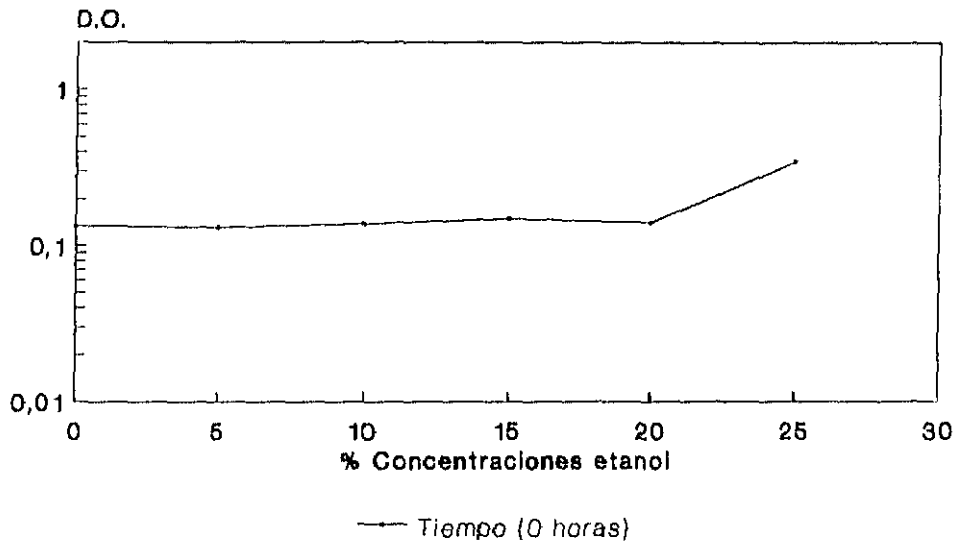


Figura 59.

Salida a tiempos muy cortos de Compuestos A260 en *C. utilis*

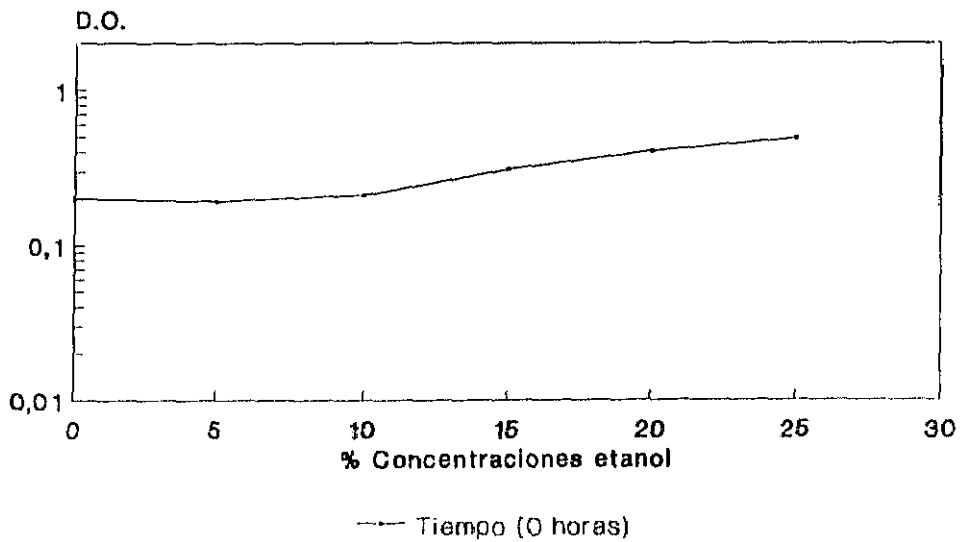


Figura 60.

Salida a tiempos muy cortos de
compuestos A260 en *C. pseudotropicalis*

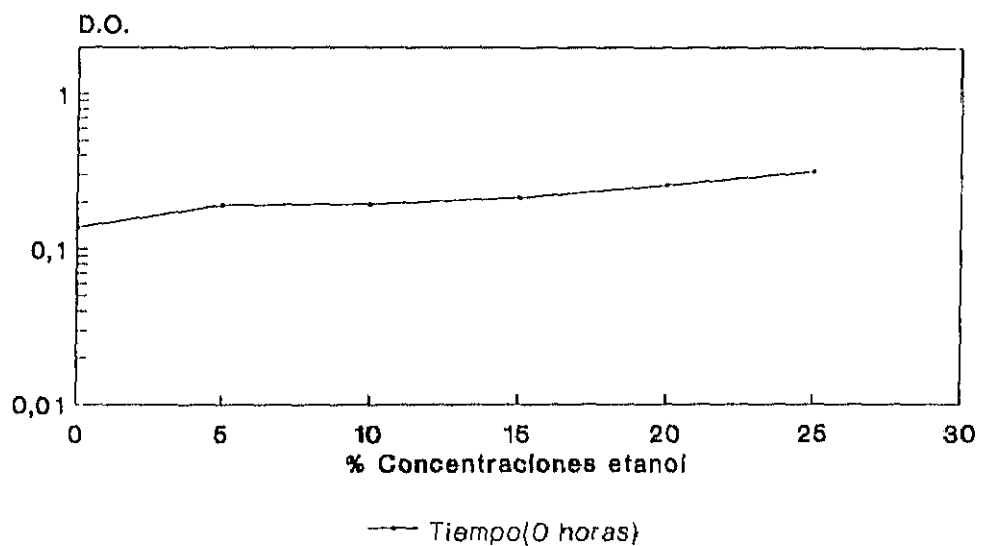


Figura 61.

Salida a tiempos muy cortos de
compuestos A260 en *P. stipitis*

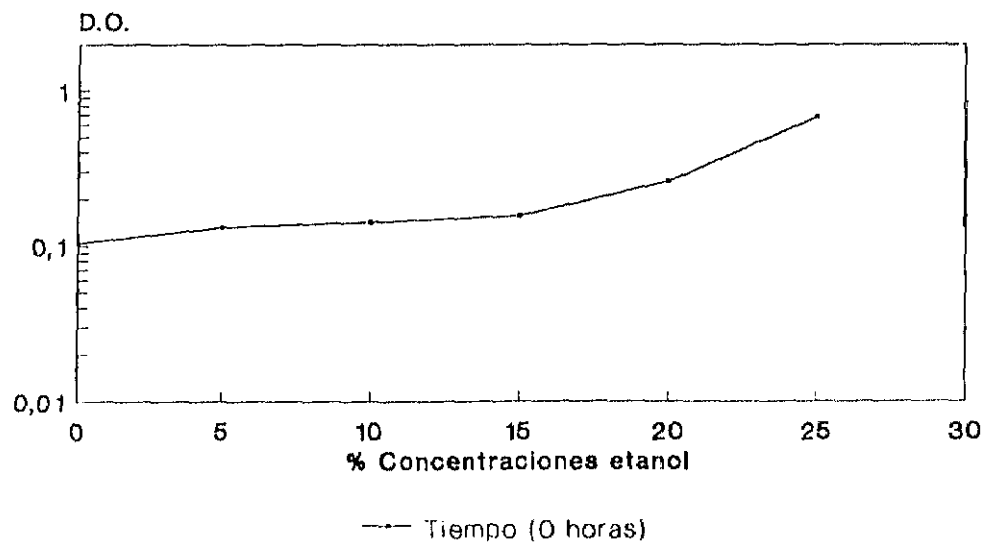


Figura 62.

Salida a tiempos muy cortos de
compuestos A260 en *K. marxianus*

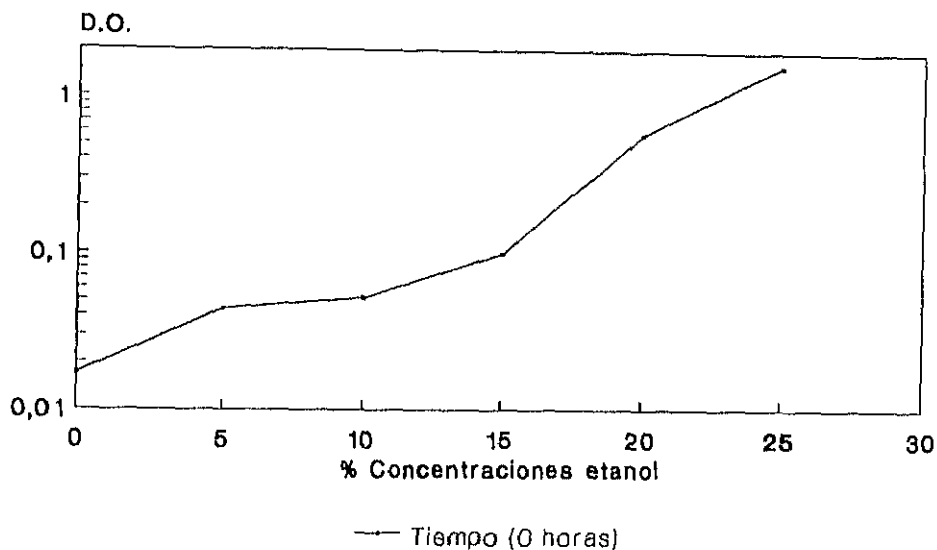


Figura 63.

Salida a tiempos muy cortos de
compuestos A260 en todas las estirpes

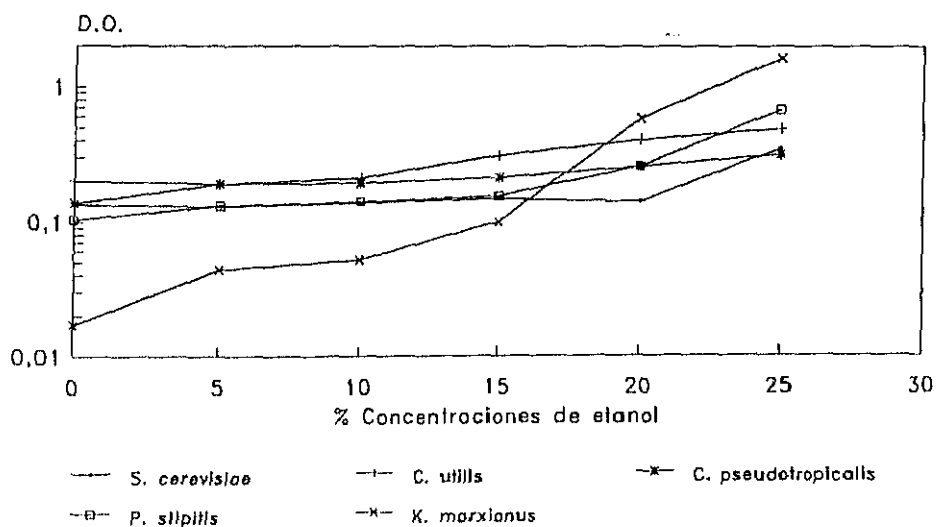


Figura 64.

III.4.9.- Valoracion espectrofotométrica del conjunto de los compuestos intracelulares que absorben a 260nm. Por lisado celular por calor.

Para conocer la densidad óptica correspondiente al contenido celular total de los compuestos que absorben a 260 nm, se sometieron las células a ebullición durante 10 minutos ocasionándose así un lisado total. El sobrenadante de este lisado se diluyó al 10% (1/10) y se leyó su absorbancia a 260 nm.

El proceso se realizó exclusivamente para *S. cerevisiae*.

El ensayo se realizó tanto sobre células control, como sobre células tratadas con etanol al 10.0 %.

Los resultados se exponen en la tabla 56.

Estos resultados nos permiten expresar la cantidad de productos intracelulares que absorben a 260 nm, que salen por efecto del etanol en porcentajes con respecto al total de ellos que contendría la célula intacta.

	Tiempo	D.O.
	(minutos)	(concentración 1/10)
Control	0	0.497
Control	90	0.502
Etanol 10 %	90	0.489

Tabla 56.- Valoración del contenido celular total de compuestos A_{260} , obtenido por medio de un lisado celular por calor.

III.4.10.- Ajuste a un modelo cinetico de salida de compuestos a_{260} .

A la vista de los resultados de los apartados III.4.7 y III.4.8 del presente trabajo, hemos ajustados los valores de salida de compuestos A_{260} a una nueva escala temporal, en la cual, el valor del tiempo representa el momento real en el cual se ha realizado la medida espectrofotométrica y no como en la representación anterior, el momento de toma de la muestra.

Las nuevas representaciones se presentan en las figuras 65,66, 67, 68 y 69.

Los valores de D.O. representados, son los mismos que los representados en las tablas 41-45, teniendo en cuenta la variación temporal descrita.

Salida de compuestos A260 a tiempos reales de contacto en *S.cerevisiae*

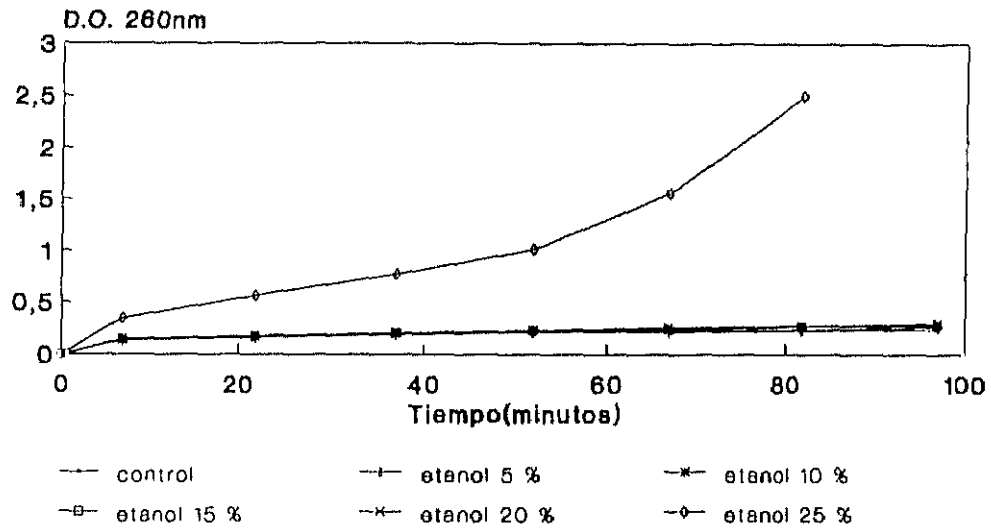


Figura 65.

Salida de compuestos A260 a tiempos reales de contacto en *C. utilis*

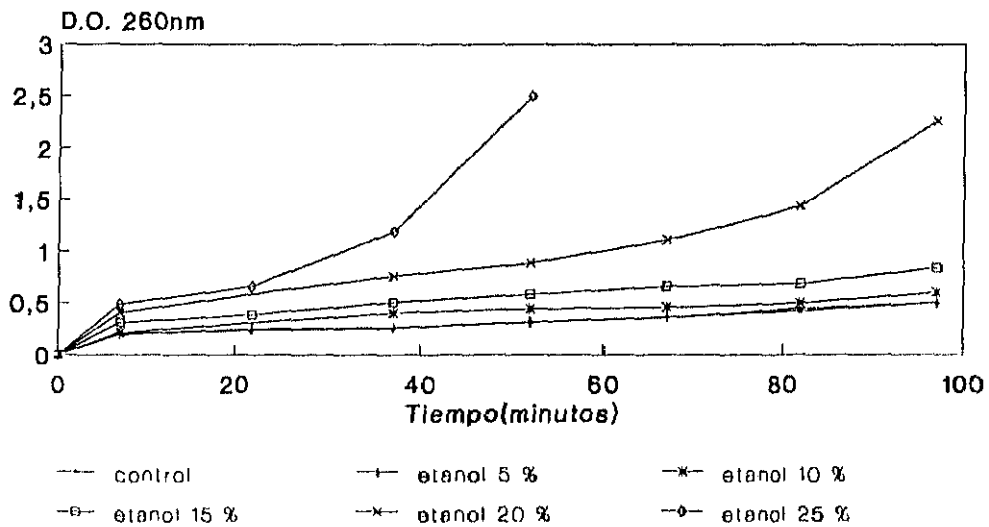


Figura 66.

Salida de compuestos A260 a tiempos reales de contacto en *C.pseudotropicalis*

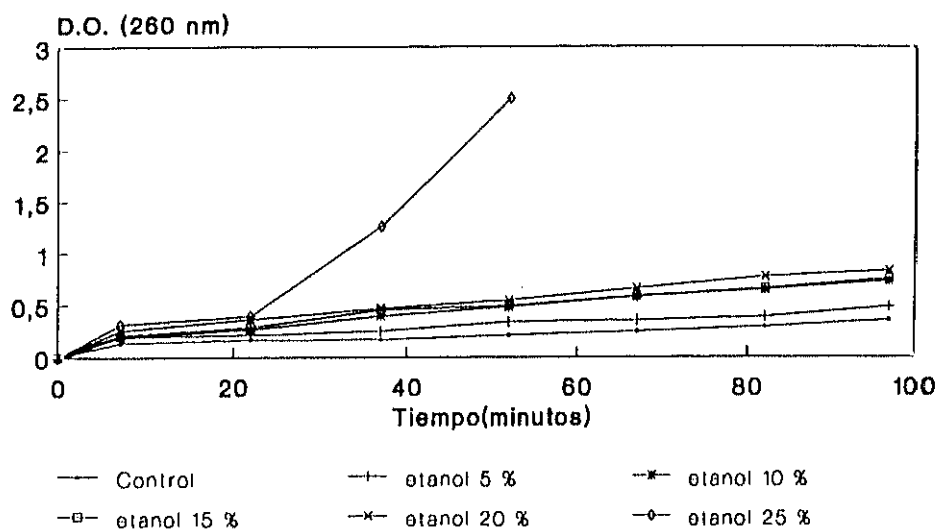


Figura 67.

Salida de compuestos A260 a tiempos reales de contacto en *P. stipitis*

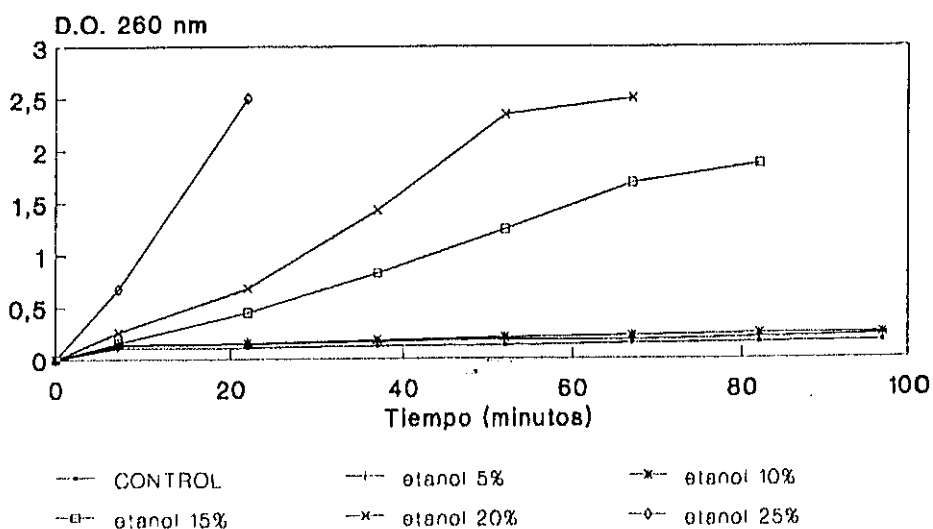


Figura 68.

Salida de compuestos A260 a tiempos reales de contacto en *K. marxianus*

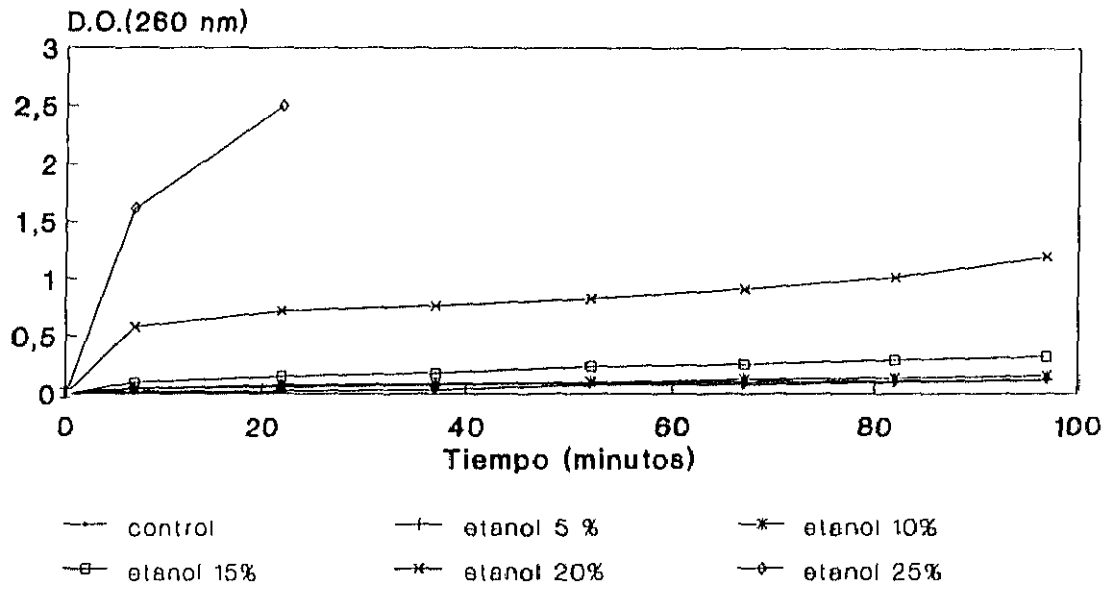


Figura 69.

DISCUSSION

IV.- DISCUSION

El interés fundamental de este trabajo ha sido estudiar , si determinados métodos, propuestos para determinar la tolerancia al etanol en levaduras, diseñados y aplicados mayoritariamente en estirpes del género *Saccharomyces*, son aplicables con idéntica validez a otros géneros de levaduras, mucho menos estudiadas y que presentan un posible interés industrial a medio plazo.

Igualmente, el presente trabajo nos permite aportar datos nuevos sobre la acción del etanol en procesos ligados a membrana, en géneros mucho menos conocidos que *Saccharomyces*.

Todas las estirpes estudiadas tienen capacidad fermentativa y su posible utilización industrial sobre sustratos fermentables nuevos presenta un gran interés.

Hemos comenzado su estudio valorando su capacidad fermentativa de una forma tradicional, por procedimientos manométricos, seguidos por numerosos autores (Brown y cols. 1981, Cartwright y cols. 1986, Dombek e Ingram 1988, Gläser y Höfer 1990).

También hemos utilizado técnicas manométricas para valorar su capacidad respiratoria.

Los resultados experimentales de las fermentaciones presentan una gran diversidad en las cinco estirpes estudiadas, como podemos ver en la tabla 16-bis y en la figura 16.

La estirpe *Saccharomyces cerevisiae* es la que presenta una mayor capacidad fermentativa, con una tasa específica de fermentación de 32.54 mmoles de CO₂/g.hora; le siguen las estirpes de *Candida utilis* y *Kluyveromyces marxianus* con unas tasas específicas de fermentación muy semejantes entre sí, de 25.14 y 25.25 mmoles de CO₂/g.hora respectivamente; algo menor resulta *Candida pseudotropicalis* con una tasa específica de 22.72 mmoles de CO₂/g.hora y muy inferior a todas ellas *Pichia stipitis* con una tasa específica de 3.33 mmoles de CO₂/g.hora.

Sus capacidades respiratorias se presentan gráficamente en la figura 17 y los valores experimentales numéricos obtenidos en la tabla 17.

Podemos ver en esta tabla que el valor de la tasa específica de respiración es máximo en *K. marxianus* con 31.46 mmoles de O₂/g.hora, es claramente menor en las estirpes de *C. utilis* y *C.pseudotropicalis* con valores de tasa específica de 23.71 y 23.78 mmoles de O₂/g.hora respectivamente, algo menor al de estas dos estirpes lo presenta *P. stipitis* con una tasa específica de 20.34 mmoles de O₂/g.hora y la estirpe que presenta unos valores inferiores con gran diferencia es *S. cerevisiae* cuya tasa específica es de 12.61 mmoles de O₂/g.hora.

Si comparamos los resultados numéricos de las tasas específicas fermentativas y respiratorias comprobamos que *S. cerevisiae* es la estirpe con un metabolismo mas definitivamente fermentativo y *P. stipitis* la que presenta un metabolismo mas claramente de tendencia respiratoria.

En las restantes estirpes no existe una decantación tan clara hacia una u otra forma de metabolismo energético, si bien *K. marxianus* aún teniendo la tasa específica respiratoria mas elevada, presenta una capacidad de fermentación (25.25 mmoles de CO₂/g.hora) relativamente alta.

Los autores Pascual y col.(1988) en un amplio trabajo en el que estudian el efecto del etanol sobre múltiples procesos celulares implicados en la fermentación , indican que para *S.cerevisie* la concentración de etanol 1.0 M tiene unos efectos mínimos, la concentración 2.0 M llega a reducir la tasa específica de fermentación al 50 % y concentraciones del 3.0 M y 4.0 M inhiben totalmente la fermentación .

Para estudiar la inhibición de la fermentación por etanol en nuestras 5 estirpes decidimos utilizar concentraciones de etanol 2.0 M, para así comparar nuestros resultados con los obtenidos por estos autores.

Debemos tener presente , que la concentración 2.0 M equivale a algo mas del 12 % de etanol, que es considerada industrialmente como una categoría de

tolerancia alta (Ranganathan y Bath 1958, Inoue y col 1962, Day y col 1975, Rose 1980, Casey y col 1986).

El tratamiento con etanol 2.0 M nos permitió evaluar la inhibición por etanol de los procesos fermentativo y respiratorio, mediante técnicas manométricas clásicas.

Los valores obtenidos expresados en las tablas 16-bis y 18 nos permiten deducir que la estirpe menos afectada en su tasa específica de fermentación ha sido *S. cerevisiae* con un 67.95 % de inhibición, algo mayor que la obtenida por los autores citados, seguida de *C. utilis* con un 84.70 % de inhibición, a continuación con valores semejantes *K. marxianus* y *C. pseudotropicalis* con un 92.97 % y 94.27 % respectivamente; en último lugar se encontraba *P. stipitis* que presentaba una inhibición total de su capacidad fermentativa.

De los resultados obtenidos podemos deducir que solamente la estirpe de *S. cerevisiae* presentaría una tolerancia que siguiendo a los autores propuestos podríamos considerar alta.

Las restantes estirpes ven inhibida su capacidad fermentativa en valores muy superiores al 50 % y en un caso la inhibición llegaba al 100 %, por lo que podemos deducir que su tolerancia al etanol no se puede considerar alta, siguiendo el criterio

de los autores ya citados, que implica la definición de tolerancia al etanol basada en la inhibición de la fermentación.

La tasa específica de respiración también se encuentra alterada en presencia de etanol.

La estirpe menos afectada fué también en este caso *S.cerevisiae* con un 19.78 % , seguida de *K. marxianus* con un 30.03 % , *C. utilis* con 45.50 % y finalmente *P. stipitis* y *C.pseudotropicalis* con inhibiciones del 71.93 y 78.89 % respectivamente.

Podemos comprobar que el efecto inhibitorio del etanol no es igual en la capacidad fermentativa y en la respiratoria ,siendo siempre menor el efecto sobre la capacidad respiratoria que sobre la fermentativa como señalan autores como Pascual y col (1988)

La estirpe de *S. cerevisiae* resultó siempre la menos afectada por el etanol en todos los procesos de obtención de energía.

De las experiencias realizadas podemos confirmar que cuatro de las estirpes de levaduras ensayadas no se encuentran en el grupo de alta tolerancia al etanol, siguiendo el criterio de los autores ya citados.

Para una evaluación mas precisa del efecto inhibitorio del etanol sobre sus tasas específicas de fermentación efectuamos otros ensayos, en los cuales las concentraciones de etanol estaban comprendidas entre 0.0 y 10.0 % (v/v), es decir, estudiaríamos lo que industrialmente se consideran tolerancias bajas (3.0-6.0 %) y moderadas (6.0-8.0 %), D'Amore y Stewart (1987).

Decidimos estudiar la capacidad de fermentación debido al interés industrial, claramente predominante por la fermentación.

Otro punto que nos pareció necesario tener en consideración fué la composición del medio en el que se desarrollaban los ensayos, pues según algunos autores como Janssens y col.(1983), Casey y col.(1985), D'Amore y Stewart (1987), la composición del medio es un punto importante a tener en cuenta al estudiar el efecto inhibitorio del etanol.

Siguiendo los trabajos de Brown y col.(1981) y Gläser y Höfer (1990) realizamos, en las nuevas experiencias, las valoraciones manométricas con una suspensión celular de las estirpes estudiadas, en tampón fosfato y añadíamos como fuente carbonada exclusivamente glucosa 100 mM.

Los resultados obtenidos en estos nuevos ensayos se muestran en la Tabla 25, y nos permiten confirmar el orden de inhibición de la fermentación por el etanol de las

estirpes estudiadas, ya que coincide con el orden obtenido sobre el medio YPD, como se observa en la tabla 28.

Sin embargo también podemos comprobar que las tasas específicas de fermentación son sensiblemente menores, como podemos ver en la tabla 27.

En *S. cerevisiae* la tasa específica baja de 32.54 mmoles de CO₂/g.hora a solo 5.58 mmoles de CO₂/g.hora. Descensos aún mayores presentan *C. utilis* (2.70 mmoles de CO₂/g.hora) *C. pseudotropicalis* (1.38 mmoles de CO₂/g.hora) y *K. marxianus* (2.16 mmoles de CO₂/g.hora), siendo el caso de *P. stipitis* el más acusado pues llega a perder totalmente la capacidad fermentativa.

En la estirpe *P. stipitis*, la capacidad de fermentación desaparecía absolutamente trabajando en las las condiciones descritas.

Estos resultados nos permiten apoyar lo expuesto por Casey y col.(1984), que en la capacidad fermentativa de una levadura influye tanto una deficiencia nutricional, como la propia toxicidad del etanol producido.

Podemos deducir por tanto que el orden de inhibición de la capacidad fermentativa por etanol de las estirpes estudiadas no se ve influido por el medio sobre el que se ha realizado el ensayo.

Sin embargo los valores de las tasas específicas de fermentación, si se ven marcadamente afectadas según sea la composición nutricional de ese medio.

Los ensayos manométricos presentan una serie de inconvenientes, unos son la necesidad de tomar un gran número de medidas y con una gran minuciosidad, otro la utilización de un aparato (respirómetro) del que no siempre se dispone en una industria , así como personal que conozca y utilice estas técnicas, etc.

Por esas razones algunos investigadores han buscado procedimientos mas rápidos y sencillos para conocer la tolerancia al etanol de una estirpe de levadura

Pero en la actualidad no existe un método válido y aceptado de manera universal para conocer dicha tolerancia , en gran medida debido a la falta de estudios sobre diferentes géneros de levaduras, pues la mayoría de los trabajos que se realizan se hacen exclusivamente sobre diferentes estirpes del género *Saccharomyces*.

Los métodos basados en la alteración por etanol de la membrana plasmática nos han parecido los que presentaban un mayor interés práctico , por su variedad ,su razonado soporte teórico y su aplicación sencilla.

Hemos elegido dos métodos para poder realizar un estudio comparativo con los resultados obtenidos por nosotros en la valoración de la capacidad fermentativa.

El primer método sería el propuesto por Jimenez y van Uden (1985). Es un método rápido para medir la tolerancia al etanol, basado en las variaciones del pH extracelular debidas al efecto del etanol sobre la permeabilidad de la membrana citoplásmica al flujo pasivo de protones.

Según los autores, la adición de glucosa a una suspensión acuosa de células de levaduras energizadas induce una extrusión protónica y una consiguiente bajada del pH extracelular.

Las curvas de acidificación características presentan una forma ya descrita por Singler y col (1981) y una estabilización de los valores de pH externo finales al cabo de un cierto tiempo.

Los valores finales de pH son el resultado de la extrusión activa de protones, contrarrestada por el flujo pasivo de protones hacia el interior celular, cuando ambos flujos opuestos de protones se hallan en equilibrio.

En presencia de etanol, las curvas presentan una forma semejante, pero los valores finales de pH aumentan al hacerlo la concentración de etanol.

Leao y van Uden (1984), consideran al etanol como un estimulador exponencial del flujo pasivo de protones, y por tanto, los valores de pH finales aumentarán en su presencia.

Los autores proponen la siguiente ecuación :

$$\text{pH final} = \log C_0 - \log K_p + KX \log e$$

Consideran que en las condiciones descritas, y para las estirpes estudiadas por ellos, los efectos del etanol en la extrusión protónica, sobre el rango de los valores del pH final son mínimos, es decir, K_p se puede considerar una constante, y por tanto, la diferencia $\log C_0 - \log K_p$, también es constante. Es decir, la relación entre la concentración de etanol (X) y el pH final sería lineal o casi lineal.

En estas condiciones, los valores de la constante de estimulación del flujo pasivo de protones debida al etanol, (K), resultan ser las pendientes de las rectas obtenidas representando los valores finales de pH frente a las concentraciones de etanol.

Siguiendo la metodología propuesta por los autores, obtuvimos los resultados que se exponen en la Tabla 30 y en la Figura 35, de lo que se deduce que el orden

relativo de tolerancia al etanol, según este método, sería el siguiente: *S. cerevisiae*, seguida de *C. utilis*, *C. pseudotropicalis*, *P. stipitis* y finalmente *K. marxianus*.

Estos resultados, como podemos comprobar en la Tabla 32, no son coincidentes con los obtenidos valorando la inhibición de la actividad fermentativa (tasa específica de fermentación). La discrepancia en el orden de tolerancia al etanol, según el método de valoración, nos llevó a realizar los siguientes ensayos para así comprobar si se cumplían en todas las estirpes, los supuestos del método propuesto por Jimenez y van Uden, que son los siguientes:

1. La estabilización del pH extracelular tiene lugar a los 75 minutos.
2. Constancia de la tasa de extrusión activa de protones, a las concentraciones de etanol ensayadas.

De los resultados obtenidos en la comprobación del primer punto, presentados en la Tabla 38, hemos comprobado que no son suficientes 75 minutos para la estabilización del pH extracelular, en cuatro de las estirpes estudiadas. Solamente *S. cerevisiae* presentaba un tiempo de estabilización semejante al descrito por los autores. Mauricio y Salmon (1992), en una reciente revisión del método, observan un tiempo de estabilización de 60 minutos para especies de *Saccharomyces*.

Todas las demás estirpes estudiadas por nosotros, presentan tiempos de estabilización semejantes entre sí, en torno a los 120 minutos.

Así pues, el género *Saccharomyces*, presenta un tiempo de estabilización del pH extracelular mas corto que el resto de los géneros estudiados. Este es un dato importante a la hora de aplicar este método de valoración de tolerancia en levaduras diferentes de *Saccharomyces*.

De los resultados obtenidos en la comprobación del segundo supuesto, presentados en las Tablas 39 y 40 y en la Figura 46, podemos deducir que solamente la estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* ensayada, presenta constancia en la tasa específica de extrusión de protones (K_p), a las concentraciones de etanol probadas, pues la actividad ATP-asa de membrana, valorada como velocidad de acidificación extracelular, solo resulta inhibida un 2.88%. Para todas las demás estirpes estudiadas, los valores de inhibición de dicha tasa son mas elevados: 32.72% en *C. utilis*, 40.81 en *C. pseudotropicalis*, 44.66 % en *P. stipitis* y 52.22% en *K. marxianus*.

Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Gläser y Höfer (1990) en la levadura *Metschnikowia reukafii*, que presenta un 30% de inhibición de la actividad ATP-asa, con etanol 0.5 M.

Los resultados obtenidos por nosotros indican que serían necesarias algunas modificaciones en el método propuesto por Jimenez y van Uden (1985), para que pueda aplicarse con carácter general a la determinación de la tolerancia a etanol de una levadura.

Autores como Cartwright y col. (1986,1987), también han observado inhibición de la tasa específica (K_p) por etanol, rebatiendo así la hipótesis de Jimenez y van Uden (1985), de que sea la estimulación del flujo pasivo de protones, la causa suficiente para explicar la debilitación del gradiente transmembrana debido al etanol.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Cartwright y col., apoyando la hipótesis de que, excepto en *S.cerevisiae*, la K_p disminuye debido a la alteración de la ATP-asa de membrana. Así, el aumento del pH final por etanol, sería debido no solo al incremento de permeabilidad de la membrana a los protones, sino también a la inhibición de la extrusión activa por este alcohol.

El segundo método estudiado ha sido el propuesto por Salgueiri y col. (1988), basado en la alteración, por etanol, de la permeabilidad de la membrana plasmática a compuestos intracelulares que absorben a 260 nm .

La liberación al medio externo de compuestos intracelulares nitrogenados durante la fermentación alcohólica por levaduras, es un fenómeno conocido y descrito

hace muchos años (Deslisle y col., 1961; Lewis, 1964). Estos compuestos contribuyen al aroma y sabor de los productos finales de fermentación obtenidos.

Lee y Lewis (1968) publicaron en este año 2 artículos en los que realizaron la identificación de los compuestos intracelulares A_{260} liberados, así como un estudio del mecanismo de liberación de estos compuestos.

Ya Delisle (1961) había mostrado que algunas de las sustancias liberadas eran aminoácidos, y que la fracción que absorbía en ultravioleta (260 nm) correspondía a material nucleotídico de bajo PM, que era liberado por células viables de levaduras, y no tenía su origen en fenómenos de autólisis.

Lewis (1963) comprobó que la liberación de nucleótidos era estimulada en condiciones que favorecían la fermentación y el crecimiento, y que ese material liberado no era utilizado de nuevo por la célula.

Lee y Lewis (1968) al realizar la identificación, por cromatografía, del material A_{260} liberado en la fermentación, concluyeron que era un 60% nucleótidos y un 40% nucleosidos y bases libres.

Al llevar a cabo la identificación de los nucleótidos presentes en el medio de fermentación extracelular, observaron que mayoritariamente detectaban NAD^+ , y en

menor proporción CMP, GMP, AMP y UMP, así como ADP, y en mucha menor cantidad los nucleótidos difosfato. Sin embargo cuando las células se encontraban suspendidas en agua destilada, los nucleótidos presentes en el sobrenadante eran mayoritariamente NAD y CMP, y en una proporción mucho menor AMP.

Franco y col. (1985), estudiando el proceso en *S. cerevisiae* GB 2333 en fermentación en cultivo continuo, detectaron la presencia de ADP, ATP y algunos intermediarios del TCA, no encontrando relación entre las condiciones de crecimiento en el fermentador y el material liberado.

En las células suspendidas en agua destilada, al parecer, no aparecían ni nucleosidos ni bases libres, sin embargo, en el medio con glucosa sí podían detectarse los cuatro nucleosidos, las cuatro bases y una quinta base que es la hipoxantina.

Lee y Lewis (1968) observaron que el material liberado A_{260} era fundamentalmente NAD y nucleótidos monofosfato procedentes del pool intracelular.

Dado que los nucleótidos son sintetizados como 5'-monofosfato, estos autores sugieren que la salida tiene lugar previamente a la síntesis de RNA.

En cuanto al mecanismo de salida de estas sustancias A_{260} , Lee y Lewis (1968) comprobaron que era consecuencia de un cambio en la barrera de permeabilidad de la membrana citoplasmática, pues la cuantía de la salida se veía influida de manera importante por los siguientes factores:

- a) Presencia de agentes protectores de membrana como Ca^{++} .
- b) Agentes destructores de la membrana, como el butanol y los detergentes.
- c) Temperatura
- d) pH del medio

En la bacteria *Zymomonas mobilis*, Osman e Ingram (1985) describieron la salida inducida por etanol de cofactores y coenzimas indispensables para la fermentación, entre ellos el Mg^{++} .

Así pues, se ha descrito el efecto del etanol en la salida de compuestos intracelulares A_{260} en varias estirpes de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* (Salgueiro y col., 1988); *Candida parapsilosis* (Ibrahim y col., 1987) etc., y también en bacterias productoras de etanol, como *Zymomonas mobilis* (Osman e Ingram, 1985).

En todos los casos estudiados el etanol estimula la salida de compuestos intracelulares A_{260} considerada en su conjunto.

En cuanto al material intracelular vertido al exterior en presencia de etanol, varía según las estirpes y las condiciones de actuación del alcohol. Así, en *C. parapsilosis* se identificaron ácidos nucleicos y material proteico (Ibrahim y col., 1987).

También se ha descrito la salida al exterior de iones: Mg^{2+} en *Z. mobilis* (Osman e Infrac, 1985) y K^+ en *M. renkaufii* (Glasser y Hoffer, 1990).

Una vez comprobado que la salida de compuestos intracelulares A_{260} era consecuencia de una alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, era lógico suponer que los agentes que actuaran sobre la membrana tuvieran un efecto estimulador sobre este fenómeno.

Así, están descritos varios agentes que estimulan esta salida en levaduras, como por ejemplo fitoalexinas (Amin y col., 1988) y algunos iones (Oshumi y col., 1988).

El etanol, al actuar sobre la permeabilidad de la membrana, era esperable que estimulara la salida de este tipo de compuestos.

Salgueiro, Sa-Correia y Novais (1988), estudiando determinación de tolerancia a etanol, relacionaron ésta con la cinética de salida de compuestos intracelulares A_{260} , incluyendo así este fenómeno dentro de una serie de procesos cuya velocidad resulta alterada por etanol, tales como crecimiento celular o transporte de nutrientes, sugiriendo también que la inhibición en la actividad fermentativa puede ser atribuida, en parte, a la salida de estos compuestos intracelulares.

Estos autores correlacionan la resistencia de la membrana plasmática a la permeabilización por etanol, definida por la velocidad de salida de compuestos A_{260} en dos estirpes de *Saccharomyces* y una de *Kluyveromyces* con su tolerancia a etanol, determinada previamente por métodos convencionales. Sus resultados llevan a la conclusión de que la velocidad de salida de compuestos intracelulares A_{260} , (K_{260}), aumenta exponencialmente con la concentración de etanol. Según esto, definen E, constante de estimulación exponencial, válida solamente para un rango de concentraciones entre 5.0 y 15.0 % de etanol, según los propios autores.

Al aplicar el método de Salgueiro y col. (1988) a las cinco estirpes de levaduras estudiadas por nosotros hemos podido observar lo siguiente:

En el rango de concentraciones definido por los autores, los valores obtenidos de E no presentan diferencia importantes entre sí. Sin embargo, la

inhibición de la fermentación a esas mismas concentraciones sí es apreciable para algunas de nuestras estirpes.

En algunas estirpes, como *Pichia stipitis* o *Kluyveromyces marxianus*, cuya fermentación es muy sensible al etanol, el aumento en la concentración de éste no repercute significativamente en la estimulación de la velocidad de salida de compuestos intracelulares A_{260} , pero sí en los valores absolutos de D.O. del sobrenadante, lo que significa que hay un aumento neto de la intensidad de la salida.

En la primera lectura experimental (tiempo cero experimental), en la que, en tiempo real, han transcurrido 7 minutos de contacto con el etanol, en *Kluyveromyces marxianus* aparecen valores de D.O. muy superiores a los del control, (Figura 63) apreciándose un incremento de los mismos al ir aumentando la concentración de etanol. Este fenómeno es lo que hemos llamado salida inicial, o salida a tiempos de contacto con etanol muy cortos.

Esto nos lleva a pensar que hay una salida de compuestos intracelulares A_{260} muy rápida en los primeros momentos de contacto con el etanol, más rápida que en el resto del intervalo de toma de muestras. O lo que es lo mismo, que la K_{260} no es constante en el tiempo.

Esto explicaría la estimulación tan escasa de la K_{260} a lo largo de la toma de muestras observada en algunas estirpes cuya tolerancia al etanol es baja.

A concentraciones de etanol del 15.0% en adelante, se observa, en las estirpes estudiadas, un nuevo aumento en la velocidad de la salida de compuestos intracelulares A_{260} , que depende, para cada estirpe, de la concentración de etanol y del tiempo de contacto con éste.

Este aumento de K_{260} se produce:

En *Saccharomyces cerevisiae* a 25.0% de etanol y a 52 minutos de contacto, en *Candida utilis* a 20.0 % de etanol y 82 minutos de contacto, en *Candida pseudotropicalis* a 25.0 % de etanol y 22 minutos de contacto, en *Kluyveromyces marxianus* a 20.0 % de etanol y 7 minutos de contacto y finalmente, en *Pichia stipitis* a 15.0% de etanol y 7 minutos de contacto.(Figuras 65, 66, 67, 68 y 69)

Todo esto nos lleva a plantearnos que la K_{260} propuesta por Salgueiro y col. (1988), quizá no sea el parámetro más adecuado para relacionarlo con la concentración de etanol, pues tal como hemos observado, no siempre resulta claramente estimulado por etanol, aunque la salida de compuestos intracelulares A_{260} , en sí misma, si dependa de la concentración de alcohol añadido.

Por otra parte, hemos podido observar que existen dos situaciones en las que se pueden dar altas velocidades de salida: En los momentos iniciales de contacto con el etanol, y a dosis altas, a partir de un tiempo de contacto propio de cada estirpe.

La cinética de salida de compuestos intracelulares A_{260} descrita por Lee y Lewis (1968), está de acuerdo a lo observado por nosotros, referente a que la velocidad de salida no es constante en el tiempo, sino que tiende a disminuir, en el intervalo de concentraciones en que la constante E es aplicable.

En ese intervalo de concentraciones, el etanol al alterar la permeabilidad selectiva de la membrana, estimularía la salida al exterior celular de compuestos A_{260} , y las concentraciones intra y extracelulares de los mismos tenderían al equilibrio.

Por ello, proponemos la idea de un modelo cinético, basado en fenómenos de difusión, que se expresaría así:

$$C_{ex} = C_{in} \cdot (1 - e^{-K \cdot t})$$

donde, C_{ex} y C_{in} representan las concentraciones extra e intracelular respectivamente, de compuestos intracelulares A_{260} , y la constante K es dependiente de la concentración de etanol.

CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES.

1. Utilizando el criterio de inhibición de la fermentación, de las estirpes estudiadas, solamente *Sacharomyces cerevisiae* se incluye en el grupo de levaduras de alta tolerancia al etanol, pues a concentración 2M de este alcohol, conserva un 33.05 % de su tasa específica de fermentación. Las otras cuatro estirpes estudiadas quedarían incluidas en el grupo de tolerancia media-baja a etanol.

2. La tasa específica de respiración resulta disminuida por etanol en todas las levaduras estudiadas, siendo esta disminución menos drástica que la de la tasa específica de fermentación, pues en ninguna de las estirpes superó el 80 %.

3. El valor de la tasa específica de fermentación es dependiente de las características nutricionales del medio, presentando valores absolutos superiores en células creciendo sobre YPD que que la suspensión celular en tampón fosfato y glucosa. No obstante, el orden relativo de sensibilidad a la inhibición por etanol sobre la tasa específica de fermentación es el mismo en ambas condiciones.

4. Las estirpes *Candida utilis*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia stipitis* muestran una inhibición, por etanol a 10%, considerable de la tasa de extrusión activa de protones, en las condiciones estudiadas, probablemente debido al efecto de este alcohol sobre la funcionalidad de la ATP-asa de membrana.

No ocurre así en la estirpe de *Saccharomyces cerevisiae*, que, en las condiciones descritas, presenta una tasa de extrusión activa de protones prácticamente inalterada a 10 % de etanol.

5. La estabilización del pH extracelular, consecuencia del equilibrio entre la extrusión activa y el influjo pasivo de protones, solamente se alcanza a los 75 minutos en *Saccharomyces cerevisiae*, en las condiciones estudiadas. El resto de las estirpes, en las mismas condiciones, presentan tiempos de estabilización superiores.

6. El método de cuantificación de tolerancia a etanol por incremento del influjo pasivo de protones no es aplicable, tal como está descrito por Jimenez y van Uden, a cuatro de las estirpes estudiadas por nosotros, debido a que en ellas, en las condiciones descritas, no se cumplen los requisitos en que se basa el método, a saber:

a). Constancia de la tasa de extrusión activa de protones.

- b). Tiempo de estabilización del pH extracelular en células previamente energizadas.

7. En *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida pseudotropicalis* y *Kluyveromyces marxianus*, para concentraciones de etanol comprendidas entre 5 y 10 % (v/v), se cumple que la cinética de salida de compuestos intracelulares A_{260} puede considerarse de primer orden en el intervalo de tiempo comprendido entre la primera toma de muestras (tiempo 0 experimental) y los 90 minutos. En *Pichia stipitis* esto ya no se cumple a 15 % de etanol.

8. Las constantes de estimulación exponencial de salida de compuestos intracelulares A_{260}, E , de las cuatro estirpes en que este parámetro puede calcularse, presentan diferencias poco importantes, lo que indica que las velocidades de salida de estos compuestos no resultan estimuladas activamente por etanol, en los intervalos de concentración de alcohol y tiempo en que se define esta constante.

No obstante, el orden de sensibilidad a etanol definido por la constante E , es coincidente con el obtenido en la inhibición de la tasa específica de fermentación.

9. Las cinco estirpes de levaduras estudiadas presentan un aumento de la $D.O._{260}$ inicial relacionado con el incremento en la concentración de etanol. Este efecto, provocado por tiempos de contacto con etanol muy cortos, es máximo para *Kluyveromyces marxianus* y mínimo para *Saccharomyces cerevisiae*, en la que solo aparece estimulación a 25 % de etanol.

10. En todas las estirpes estudiada, en las condiciones descritas, hemos observado que existe una concentración de etanol, propia de cada estirpe, que, a partir de un tiempo de contacto diferente para cada estirpe, provoca un aumento brusco de la velocidad de salida de compuestos intracelulares A_{260} .

Pichia stipitis es la estirpe mas sensible a este efecto y *Saccharomyces cerevisiae* la mas resistente, considerando el conjunto de concentración de etanol y tiempo de contacto.

11. Los resultados obtenidos, en nuestras condiciones de trabajo, nos permiten afirmar que la velocidad de salida de compuestos intacelulares A_{260} no es constante en el tiempo.

En las fases iniciales la velocidad de salida es superior a la observada a partir de los 7 minutos de contacto con el etanol. Esta velocidad inicial resulta estimulada por el aumento en la concentración de etanol.

A concentraciones altas de etanol (superiores a 15 %) hemos observado en todas las estirpes un nuevo aumento en la velocidad de salida de estos compuestos.

12. El método de cuantificación de tolerancia a etanol basado en la estimulación de la velocidad de salida de compuestos intracelulares A_{260} , propuesto por Salgueiro y col., puede no ser adecuado como método general para levaduras porque el incremento en dicha velocidad, en las condiciones descritas por los autores, en algunas estirpes no refleja el efecto de permeabilización por etanol de la membrana plasmática. Esta permeabilización resulta mas patente, para algunas estirpes, en la estimulación de la velocidad inicial o en la cuantía de la propia salida.

BIBLIOGRAFIA

VI.- BIBLIOGRAFIA.

AGUILERA,A. & BENITEZ,T.(1986): Ethanol-sensitive mutants of Saccharomyces cerevisiae.
Arch. Microbiol.,143, 337-344.

AGUILERA,A. & BENITEZ,T:(1985): Role of mitochondria on ethanol tolerance of Saccharomyces cerevisiae.
Arch. Microbiol. 142, 389-92.

AIBA, S. & SHODA, M. (1969): Reassessment of the product inhibition of alcohol fermentation.
J. Ferment. Technol., 47, 790-801.

ALEXANDER,M.A.; CHAPMAN,T.W. & JEFFRIES,T.W.(1989): Continuous-Culture Responses of Candida sheatae to Shifts in Temperature and Aeration: Implicationjhs for Ethanol Inhibition.
Appl. Environ. Microbiol., 55,9, 2152-54.

ALTERTHUM,F.; DOMBEK,K.M. & INGRAM, L.O.(1989): Regulation of Glycolytic Flux and Ethanol Production in Saccharomyces cerevisiae: Effects on Intracellular Adenine Nucleotide Concentrations on the In Vitro Activities of Hexokinase, Phosphofructo Kinase, phosphoglycerate Kinase, and Pyruvate Kinase.
Appl. Environ. Microbiology, 55 n° 5, 1312-14.

AMIN,M.; KUROSAKI,F.& NISHI,A. (1988): Carrot phytoalexin alters the membrane permeability of Candida albicans and multilamellar liposomes.
J. Gen. Microbiol.,134,241-246.

ANACLETO,J. & VAN UDEN,N. (1982): Kinetics and activation energetics of death in Saccharomyces cerevisiae induced by sulfur dioxide.
Biotech. and Bioeng.,24, 2477-2486.

ANAND,S. & PRASAD,R. (1989): Rise in Intracellular pH Concurrent with "Start" Progression of Saccharomyces cerevisiae.
J.Gen. Microbiol., 135 2173-79.

ANDERSON,P.J.;McNEIL,K.E. & WATSON,K. (1988): Isolation and identification of thermotolerant yeasts from Australian sugar cane mills.
J. Gen. Microbiol.,134, 1691-1698.
Appl. Environ. Microbiol., 56,7, 2114-19

- BARNETT, J.A. & SIMS, P. (1982): The requirement of Oxygen for the Active Transport of Sugars into Yeasts.
J. Gen. Microbiol., 128, 2303-12.
- BEAVEN, M.J.; CHARPENTIER, C. & ROSE, A.H. (1982): Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in Saccharomyces cerevisiae NCYC 431.
J. Gen. Microbiol., 128, 1447-1455.
- BAZUA, C.D. & WILKE, C.R. (1977): Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*.
Biotechnol. Bioeng. Symp., 7, 105-118.
- BENITEZ, T.; DEL CASTILLO, L.; AGUILERA, A.; CONDE, J. y CERDA-OLMEDO, E. (1981): Selection of wine yeasts for growth and Fermentation in the Presence of Ethanol and Sucrose.
Appl. Environ. Microbiol., 45, 5, 1429-36.
- BLITTERSWIJK, W.J.; VAN DER MEER, B.W. & HILKMAN, H. (1987): Quantitative Contributions of Cholesterol and the individual Classes of Phospholipids and their degree of Fatty Acyl (un)Saturation to Membrane Fluidity Measured by Fluorescence Polarization.
Biochemistry, 26, 1746-56.
- BROWN, S.W.; OLIVER, S.G.; HARRISON, D.E.F.; & RIGHELATO, R.C. (1981): Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: Differences in the magnitude and complexity of the effect.
European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 11, 151-155
- BRUINENBERG, P.M.; VAN DIJKEN, J.P. & SCHEFFERS, W.A. (1983): An Enzymic Analysis of NADPH Production and Consumption in Candida utilis.
J. GEN. Microbiol., 129 965-71.
- BRUINENBERG, P.M.; VAN DIJKEN, J.P. & SCHEFFERS, W.A. (1983): A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts.
J. Gen. Microbiol., 129, 953-964.
- CAMONGRAND, N.M.; CHEYRON, A.; HENRY, M.F. & GUERIN, M.G. (1988): The alternative respiratory pathways of the yeast Candida parapsilosis: oxidation of exogenous NAD(P)H.
J. Gen. Microbiol., 134, 3195-3204.
- CARTWRIGHT, C.P., ROSE, A.H.; CALDERBANK, J.; & KEENAN, M.H.J. (1989): Solute transport. En: The Yeasts". Vol 3. 2ª edición.

- CARTWRIGHT,C.P.; VEAZEY,F.J. & ROSE,A.H. (1987): Effect of ethanol on activity of the plasma-membrane ATPase in, and accumulation of glycine by, Saccharomyces cerevisiae.
J. Gen. Microbiol.,133, 857-865.
- CARTWRIGHT,C.P.; JUROSZEK,J.R.; BEAVAN,M.J.; RUBY,F.M.S.; DE MORAIS,S.M.F. & ROSE,A.H. (1986): Ethanol dissipates the proton- motive force across the plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae.
J. Gen. Microbiol.,132, 369-377.
- CASEY,G.P. & INGLEDEW,W.M. (1986): Ethanol tolerance in yeasts.
Crit. Rev. Microbiol.,13, 219-290.
- CASTILLO (del) AGUDO,L. (1985):
Current Microbiol.,12, 41-44.
- COOTE,P.J.; COLE,M.B. & JONES,M.V.(1991):Induction of increased thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae may be triggered by a mechanism involving intracellular pH.
J. Gen. Microbiol. , 137 1701-08.
- COZZONE,A.J. (1988): Protein phosphorylation in prokaryotes.
Ann. Rev. Microbiol.,42, 97-125.
- CHANG,E.C. & KOSMAN,D.J. (1990): O₂-dependent methionine auxotrophy in Cu,Zn superoxide dismutase-deficient mutants of Saccharomyces cerevisiae.
J. Bacteriol.,172,1840-1845.
- D'AMORE,T. & STEWART,G.G. (1987): Ethanol tolerance of yeast.
Enzyme and Microbial Technology,9,322-330.
- D'AMORE,T.; PANCHAL,C.J. & STEWART,G.G. (1988): Intracellular ethanol accumulation in Saccharomyces cerevisiae during fermentation.
Appl.Environ. Microbiol.,54,110-114.
- DAY, A.; ANDERSON, E. & MARTIN, P.A. (1975): Ethanol tolerance of brewing yeasts.
Proc. 15th Conv. Eur. Brew. Cong., IRL Press, Oxford, 377-391.
- DEKEN,R.H. (1966):The Crabtree effect: a regulatory system in yeast.
J.Gen.Microbiol.,44, 149-156.
- DOMBEK, K.M. & INGRAM, L.O. (1987): Ethanol production during batch fermentation with Saccharomyces cerevisiae: changes in glycolytic enzymes and internal pH.

Appl. Environ. Microbiol., 53, 1286-1291.

DOMBEK, K.M. & INGRAM, L.O. (1986): Determination of Intracellular concentration of Ethanol in Saccharomyces cerevisiae during Fermentation. Appl. Environ. Microbiology, 51, n°1, 197-200.

DOMBEK, K.M. & INGRAM, L.O. (1988): Intracellular accumulation of AMP as a cause for the decline in rate of ethanol production by Saccharomyces cerevisiae during batch fermentation. Appl. Environ. Microbiol., 54, 98-104.

DOMBEK, K.M. & INGRAM, L.O. (1986): Magnesium Limitation and Its Role in Apparent Toxicity of Ethanol during Yeast Fermentation. Appl. Environ. Microbiology, 52, n°5, 975-81.

DOMBEK, K.M. & INGRAM, L.O. (1987): Ethanol production during Batch Fermentation with Saccharomyces cerevisiae: Changes in Glycolytic Enzymes and Internal pH. Appl. Environ. Microbiol., 53, 6, 1286-91.

EDDY, A.A. (1982): Mechanisms of solute transport in selected Eukariotic microorganisms. Advances in Microbial Physiology, 23, 2-78.

EILAM, Y. & CHERNICHOVSKY, D. (1988): Low concentrations of trifluoperazine arrest the cell division cycle of Saccharomyces cerevisiae at two specific stages. J. Gen. Microbiol., 134, 1063-1069.

ESSER, K.; SCHMIDT, U. & STAHL, U. (1982): Ethanol and biomass production of wild strains and respiratory deficient mutants of Saccharomyces cerevisiae under anaerobic and aerobic conditions. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 16

FERNANDEZ, R.; HERRERO, P.; FERNANDEZ, E.; FERNANDEZ, T.; LOPEZ-BOADO, Y.S. & MORENO, F. (1988): Autophosphorylation of yeast hexokinase PII. J. Gen. Microbiol., 134, 2493-2498.

FIECHTER, A.; FUHRMANN, G.F. & KAPPELI, O. (1981): Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. Advances in Microbial Physiology, 22, 123-183.

FIETCHER, A.; KAPPELI, O. & MEUSSDOERFFER, F. (1989): Batch and Continuous Culture. En: The Yeasts. Vol III. 2nd. Edition. Ed. Rose, A.H. & Harrison, J.J.. Acc. Press.

FRANCO,C.M.; SMITH,J.E. & BERRY,E. (1985): Factores influencing leakage of intermediates from yeast growth in continuous culture. Transactions of the British Mycological Society,85,279-283.

GANCEDO,C. & SERRANO,R.(1989): Energy-Yielding Metabolism. En: The Yeasts. Vol III. 2nd. edition. Ed. by: Rose,A.H. & Harrison,J.. Acc. Press.

SLININGER,P.J.; BRANSTRATOR,L.E.; BOTHAST,R.J.; OKOS,M.R.; & LADISSCH,M.R. (1991): Growth, Death, and Oxigen Uptake Kinetics of Pichia stipitis on xylose. Biotechnol.& Bioeng., Vol. 37, 973-80.

GHOSE, T.K. & TYAGI, R.D. (1979): Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. Biotechnol. Bioeng., 21, 1401-1420.

GHOSE, T.K. & TYAGI, R.D. (1979): Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. I. Batch versus continuous system. Biotechnol. Bioeng., 21, 1387-1393.

KALMOKOFF, M.L. (1985): Evaluation of ethanol tolerance in selected *Saccharomyces* strains. M. Sc. thesis, University of Saskatoon.

GLÄSER,H.U. & HÖFER,M. (1990): Effect of ethanol on cell growth, metabolism and cation fluxes in the yeast Metschnikowia renkanfii. J.Gen.Microbiol.,136, 1265-1270.

GODIA,F.; CASAS,C. & SOLA,C. (1988): Batch alcoholic fermentation modelling by simultaneous integration of growth and fermentation equations. J.Chem.Technol.Biotechnol.,41, 155-165.

HOMANN,M.J.;POOLE,M.A.; GAYNOR,P.M.; CHI-TANG,H. & CARMAN,G.M. (1987): Effect of growth phase on phospholipid biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. J.Bacteriol.,169, 533-539.

GRAY, W.D. & SOVA, C. (1969): Effects of alcohol on yeast hexokinase. Mycopathol. Mycol. Appl., 37, 70-78.

GRAY, W.D. (1941): Studies on the alcohol tolerance of yeasts. J. Bacteriol., 42, 561-574.

- HOPPE, G.K. & HANSFORD, G.S. (1984): The effect of micro-aerobic conditions on continuous ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 6, 681-685.
- HOSAKA, K.; MURAKAMI, T.; KODAKI, T.; NIKAWA, J. & YAMASHITA, S. (1990): Repression of choline kinase by inositol and choline in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 172, 2005-2012.
- IBRAHIM, M.A.K., ABDUL-NOUR, A. & COL. (1987): Leakage of intracellular components from *Candida parapsilosis*. I. Effect of ethanol. *Journal of Biological Sciences Research*, 18, 103-112.
- IGLESIAS, R.; FERRERAS, J.M.; ARIAS, F.J.; MUÑOZ, R.; & GIRBES, T. (): Effect of Continued Exposition to Ethanol on Activity of the Ammonium and Fructose Transport Systems in *Saccharomyces cerevisiae*, var. ellipsoideus. *Biotechnol. & Bioeng.* Vol 37, 389-391.
- INGRAM, L.O. & BUTKE, T.M. (1984): Effects of ethanol on micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.*, 25, 253-300.
- INGRAM, L.O. (1984): Effects of Alcohols on Micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*, 25, 253-300.
- INOUE, T.; TAKAOKA, Y. & HATA, S. (1962): Studies on sake yeasts. V. Conditions which affect the tolerance of yeast to alcohol. *J. Ferment. Technol.*, 40, 511-516.
- JAIN, V.K. & MISHRA, V.K. (1989): Kinetics of growth and continuous ethanol production by immobilized growing yeast cells. *Journal of Microbial Biotechnology*, 4, 103-109.
- JANSSENS, J.H.; BURRIS, N.; WOODWARD, A. & BAILEY, R.B. (1983): Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 598-602.
- JIMENEZ, J. & VAN UDEN, N. (1985): Use of Extracellular Acidification for the rapid Testing of Ethanol Tolerance in Yeasts. *Biotechnol. & Bioeng.*, Vol XXVII.
- JIMENEZ, J. & BENITEZ, T. (1988): Selection of ethanol-tolerant yeast hybrids in pH-regulated continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 917-922.

- JONES,R.P. & GREENFIELD,P.F.(1987): Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane.
Yeast.,3, 223-232.
- JUROSZEK,J.R.;FEUILLAT,M. & CHARPENTIER,C. (1987): Effect of ethanol on the glucose-induced movements of protons across the plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae NCYC 431.
Can. J. Microbiol. 33,93-97.
- KANELLAKI,M.; KOUTINAS,A.A.; NICOPOULOU,M.; PAPADIMITRIOU,A. & LYCOURGHOTIS,A.(1989): Ethanol production by saccharomyces cerevisiae promoted by γ -alumina.
Biotechnol. & Bioeng.,34, 121-125.
- KASHLET,E.K.(1985): The Proton Motive Force in Bacteria: A Critical Assessment of Methods.
Ann. Rev. Microbiol. 39,219-42.
- KILIAN,S.G.,DU PREEZ,J.C. & GERICKE,M.(1989): The effects of ethanol on growth rate and passive proton diffusion in yeasts.
Appl. Microbiol. Biotechnol.,32, 90-94.
- KOLODINSKY,J. & COL.(1985): Effect of some quaternarybenzylammonium salts of physiology of yeast Saccharomyces cerevisiae.
Acta Microbiologica Polonica 33, 119-130.
- KONING, W.de;GROENEVELD,K.; BERDEN,J.A. & VAN DAM,K.(1991): Changes in the activities of key enzymes of glycolysis during the cell cycle in yeast: a rectification.
J. Gen. Microbiol.,137, 971-976.
- KOSARIC,N.; WIECZOREK,A. & KLIZA,S.(1983):Ethanol Production from Fodder Beets.
Biotechnol. & Bioeng. , Vol. XXV, 1737-45.
- KOSARIC,N.; NG,D.C.M.; RUSSELL,I. & STEWART,G.S.(1980): Ethanol production by fermentation: an alternative liquid fuel.
Adv. Appl. Microbiol.,26, 147-227
- KOTYK,A.(1989): Proton extrusion in yeast.
Methods enzymol.,174, 592-603.
- KOUKOU,A.I.; TSOUKATOS,D. & DRAINAS,C.(1990): Effect of ethanol on the phospholipid and fatty acid content of Schizosaccharomyces pombe membranes.
J.Gen.Microbiol.,136, 1271-1277.

- KRULWICH, T.A.; QUIRK, P.K. & GUFFANTI, A.A. (1990): Uncoupler-Resistant Mutants of Bacteria. *Microbiological Reviews*, 54, 1, 52-65.
- LAGUNAS, R. & GANCEDO J.M. (1973): Reduced Pyridine-Nucleotides Balance in Glucose Growing *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 37, 90-94.
- LAGUNAS, R. & RUIZ, E. (1988): Balance of production and consumption of ATP in ammonium-starved *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 2507-2511.
- LALUCE, C.; PALMIERI, M.C. & LOPES da CRUZ, R.C. (1990): Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2114-19.
- LANG, J.M. & CIRILLO, V.P. (1987): Glucose transport in kinaseless *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *J. Bacteriol.*, 169, 2932-2937.
- LEAO, C. & VAN UDEN, N. (1884): Effects of Etanol and Others Alkanols on Passive proton influx in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocuin. Biophys. Acta*, 774, 43-48.
- LEAO, C. & VAN UDEN, N. (1982): Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. & Bioeng.*, 24, 2601-2604.
- LEAO, C. & VAN UDEN, N. (1984): Effects of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomices cerevisiae*. *Biotech. & Bioeng.*, 26, 403-405.
- LEAO, C. & VAN UDEN, N. (1982): Effects of ethanol and other alkanols on the kinetics and the activation parameters of thermal death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. & Bioeng.*, 24, 1581-1590.
- LEE, T.C. & LEWIS, M.J. (1968a): Identifying nucleotidic materials released by fermenting brewer's yeast. *J. Food Sci.* 33, 119-123.
- LEE, T.C. & LEWIS, M.J. (1968b): Mechanism of release of nucleotidic material by fermenting brewer's yeast. *J. Food Sci.*, 33, 124-128.

LESUISSE,E. & LABBE,P.(1989): Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast Saccharomyces cerevisiae.
J.Gen.Microbiol.,135, 257-263

LI,G.C.;SHIU,E.C. & HAHN,G.M.(1980): Similarities in cellular inactivation by hyperthermia or by ethanol.
Radiation Research ,82, 257-268.

LOPEZ-BOADO,Y.S.; HERRERO,P.; FERNANDEZ,T.; FERNANDEZ,R. & MORENO,F.(1988): Glucose-stimulated phosphorylation of yeast isocitrate lyase in vivo.
J.Gen.Microbiol.,134, 2499-2505.

LOUREIRO-DIAS Y PEINADO,J.M.(1984): Transport of maltose in Saccharomyces cerevisiae. Effect of pH and potassium ions.
Biochem. J. ,222, 293-98.

LOUREIRO-DIAS,M.C. y SANTOS,H (1990).: Effects of ethanol on saccharomyces cerevisiae as monitored by in vivo ³¹P and ¹³C nuclear magnetic resonance.
Arch. Microbiol. , 153 384-91.

LOUREIRO-DIAS,M.C. Y PEINADO,J.M.(1982).: Effect of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of Saccharomyces cerevisiae.
Biotechnology Letters, 4, 11, 721-24.

LOUREIRO,V. & FERREIRA,H.G. (1983):On the Intracellular Accumulation of Ethanol in Yeast.
Biotechnol. & Bioeng., XXV, 2263-69.

LOUREIRO,V. & FERREIRA,H.G.(1983): On the intracellular accumulation of ethanol in yeast.
Biotech. & Bioeng.,25, 2263-2269.

LUONG,J.H.T.(1985): Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation.
Biotechnol. Bioeng. vol. XXVII, 280-85.

MAIORELLA,B.L.; BLANCH,H.W. & WILKE,C.R. (1984): Feed Component Inhibition in Ethanolic Fermentation by Saccharomyces cerevisiae.
Biotechnol. & Bioeng., Vol. XXVI, 1155-66.

MARGARITIS,A. & BAJPAL,P.(1982): Continuous Ethanol Production From Jerusalem Artichoke Tubers. II. Use of Immobilized Cells of Kluyveromyces marxianus.
Biotechnol. & Bioeng., XXIV, 1483-93.

MARGARITIS,A. & BAJPAL,P. (1982): Continuous Ethanol Production From Jerusalem Artichoke Tubers. I. Use of Fre Cells of Kluyveromyces marxianus. Biotechnol. & bioeng., XXIV, 1473-82.

MARGARITIS,A. & BAJPAL,P.(1982): Etahnol Production from Jerusalem Artichoke Tubers (*Heliantus tuberosus*) Using Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces rosei. Biotechnol. and Bioeng., ,Vol.XXIV,941-53.

MARWAKA,S.S. & KENNEDY,J.F.(1985): Studies on the structural features of sodium alginate entrapped Kluyveromyces marxianus NCYC 179 cells used for alcohol production from whey permeate. British Polymer Journal,17, 46-50.

McGOLDRICK,E.M. & WHEALS,A.E.(1989): Controlling the growth rate of Saccharomyces cerevisiae cells using the glucose analogue D-glucosamine. J.Gen.Microbiol.,135, 2407-2411.

MAURICIO,J.C. & SALMON,J.M. (1992): Rapis spectrophotometric determination of the exponential constant of ethanol-enhanced proton diffusion in yeasts. Biotechnology Techniques, 6,1, 27-32.

MAZON,M.J.; BEHRENS,M.; PORTILLO,F.; & PIÑON,R. (1989): cAMP and RAS-independent Nutritional Regulation of Plasma Membrane H⁺-ATP-ase Activity in Saccharomyce cerevisiae. J. Gen. Microbiology, 135, 1453-60.

McKERSIE, ; CROWE, & CROWE, (1989): Free fatty effects on leakage, phase properties and fusion of fully hidrated model membranes. Biochim.Biophys.Acta,982, 156-160.

MILLAR, D.G.; GRIFFITHS-SMITH, K.; ALGAR, E. & SCOPES, R.K. (1982): Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. Biotechnol. Lett., 4, 601-606.

MINIER,M. & GOMA,G.(1982): Ethanol production by extractive fermentation. Biotech. & Bioeng.,24, 1565-1579.

MISHRA,P. & PRASAD,R.(1988): Role of phospholipids head groups in Ethanol Tolerance of Saccharomyces cerevisiae. J.Gen. Micrbiol.,134,3205-11.

- MOTA, M.; STREHAIANO, P. & GOMA, G. (1984): Studies on the conjugate effects of substrate (glucose) and product (ethanol) on cell growth kinetics during fermentation of different yeast strains.
J. Inst. Brew., 90, 360-366.
- RANGANATHAN, B. & BAHT, J.V. (1958): Ethanol tolerance of some yeasts.
J. Indian Inst. Sci., 40, 105-115.
- MOULIN, G.H.; BOZE, H. & GALZY, P. (1984): Inhibition of alcoholic fermentation.
Biotechnol. Bioeng., 25, 365-382.
- MOULIN, G.; BOZE, H. & GALZY, P. (1980): Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol.
Biotechnol. Bioeng., 22, 2375-2379.
- MOUNTAIN, H.A. & SUDBERY, P.E. (1990): Regulation of the Saccharomyces cerevisiae WH12 gene.
J. Gen. Microbiol., 136, 727-732.
- MOUNTAIN, H.A. & SUDBERY, P.E. (1990): The relationship of growth rate and catabolite repression with WH 12 expression and cell size in Saccharomyces cerevisiae.
J. Gen. Microbiol., 136, 733-737.
- NABAIS, R.C.; SA-CORREIA, I., VEIGAS, C. & NOVAIS, J. (1988): Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of Saccharomyces bayanus and alcoholic Fermentation by Yeasts.
Appl. Environ. Microbiol., 54, 10, 2439-46.
- NAGODAWITHANA, T.W.; & STEINKRAUS, K.H. (1976): Influence of the rate of Ethanol Production and Accumulation on the Viability of Saccharomyces cerevisiae in "Rapid Fermentation".
Appl. Environ. Microbiology, 31, n° 2, 158-62.
- NOVAK, M.; STREHAIANO, P. MORENO, M, & GOMA, G. (1981): Alcoholic Fermentation: On the Inhibitory Effect of Ethanol.
Biotechnol. & Bioeng., Vol. XXIII, 201-11.
- NOBEL, J.G. del; KLIS, F.M. & COL. (1990): An assays of relative cell wall porosity in Saccharomyces cerevisiae, Kluveromyces lactis y Schizosaccharomyces pombe.
Yeast, 6, 483-490.

OKOLO, B.N.; JOHNSTON, J.R. & BERRY, D.R. (1990): Kinetics of alcohol tolerance of distillery yeast.

Enzyme and Microbiol. Technology, 12, 783-788.

NOJIRO, K. & OUCHI, K. (1962): The fermenting ability of the sake yeast and its alcohol tolerance. I. The relationship between the fermenting ability and alcohol tolerance.

J. Soc. Brew. (Japan), 57, 824-830.

OLIVERO, I.; RUIZ-MACIAS, C.; CHORDIA, A. & PEINADO, J.M. (1982): Effect of external pH on the growth of Saccharomyces cerevisiae fermenting maltose in batch and continuous culture.

Biotech. & Bioeng., 24, 2725-2729.

ONGJOCO, R.; SZKUTNICKA, K. & CIRILLO, V.P. (1987): Glucose transport in vesicles reconstituted from Saccharomyces cerevisiae membranes and liposomes.

J. Bacteriol., 169, 2926-2931.

OSHUMI, Y.; KITAMOTO, K. & AURAKU, Y. (1988): Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion.

J. Bacteriol., 170, 2678-2682.

OSMAN, Y.A. & INGRAM, L.O. (1985): Mechanism of ETHANOL inhibition of Fermentation in Zymomonas mobilis CP4.

J. Bacteriol., 164 1, 173-80.

PAMPULHA, M.E. & LOUREIRO-DIAS, M.C. (1989): Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast.

Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 547-550.

PANARETOU, B. & PIPER, P.W. (1990): Plasma-membrane ATP-ase actions affects several stress tolerances of Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe as well as the extent and duration of the heat shock response.

J. Gen. Microbiol., 136, 1763-70.

PASCUAL, C.; ALONSO, A.; GARCIA, I.; ROMAY, C. & KOTYK, A. (1988): Effect of Ethanol on Glucose Transport, Key glycolytic Enzymes and Proton Extrusion in Saccharomyces cerevisiae.

Biotechnol. and Bioeng., vol. 32, 374-78.

PEINADO, J.M.; & LOUREIRO-DIAS (1986): Reversible loss of affinity induced by glucose in the maltose-H⁺ symport of Saccharomyces cerevisiae.

Biochim. Biophys. Acta, 856, 189-92

- PEINADO, J.M.; CAMEIRA-DOS-SANTOS, & LOUREIRO-DIAS, M.C. (1988), : Regulation of Transport of Glucose in Candida utilis. J.Gen. Microbiol., 134, 195-201.
- PILKINGTON, B.J. & ROSE, A.H. (1988): Reactions of Saccharomyces cerevisiae y Zygosaccharomyces bailli to sulphite. J.Gen.Microbiol., 134, 2823-2830.
- PLESSET, J.; LUDWIG, J.R.; COX, B.S. & McLAUGHLIN, C.S. (1987): Effect of cell cycle position on thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae. J.Bacteriol., 169, 779-784.
- POSTMA, E. & VAN DEN BROEK, P.J.A. (1990): Continuous-culture study of the regulation of glucose and fructose transport in Kluyveromyces marxianus CBS 6556. J.Bacteriol., 172, 2871-2876.
- POSTMA, E. & VAN DEN BROEK, P.J.A. (1990): Continuous-Culture Study of the Regulation of Glucose and Fructose Transport in Kluyveromyces marxianus CBS 6556. J. Bacteriol., 172, 6, 2871-76.
- POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W.A. & VAN DIJKEN, J.P. (1989): Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ. Microbiol., 55, 468-477.
- QUAIN, D.E. & HASLAM, J.M. (1979): The effects of catabolite derepression on the accumulation of steryl esters and the activity of b-hydroxymethylglutaryl-CoA reductase in Saccharomyces cerevisiae. J.Gen.Microbiol., 111, 343-351.
- RAHN, O. (1929): The decreasing rate of fermentation. J. Bacteriol., 18, 207-226.
- RAMOS, S.; BALBIN, M.; RAPOSO, M.; VALLE, E. & PARDO, L.A. (1989): The Mechanism of Intracellular Acidification Induced by Glucose in Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol., 135, 2413-22.
- ROMAN G.N.; JANSEN, N.B. & TSAO, G.T. (1984): Ethanol inhibition of D-xylose fermentation by Saccharomyces pombe. Biotechnol. Lett., 6, 7-11.

- ROSA, M.F. & SA-CORREIA, I. (1991): In Vivo Activation of Plasma Membrane ATPase of Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ. Microbiol., 57, 3, 830-35.
- ROSE, A. (1989): Responses to the Chemical Environment. En: The Yeasts. Voll.: Yeasts and environment. 2nd. edition. Ed. Rose, A.H. & Harrison, J.J.. Acc. Press.
- SA-CORREIA, I. & VAN HUDEN, N. (1983): Temperature profiles of ethanol tolerance: effect of ethanol on the minimum and maximum temperatures for growth of the yeast Saccharomyces cerevisiae and kluveromyces fragilis. Biotechnol. Bioeng., 25, 1665-1667.
- SÁ-CORREIA, I.; SALGUEIRO, S.P.; VIEGAS, C.A. & NOVAIS, J.M. (1988): Leakage induced by ethanol, octanoic and decanoic acids in Saccharomyces cerevisiae. Yeast, 5, 123-127.
- SÁ-CORREIA, I. (1986): Synergistic effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on the kinetics and the activation parameters of thermal death in Saccharomyces bayanus. Biotech. & Bioeng., 28, 761-763.
- SALGUEIRO, S.P.; SÁ-CORREIA, I. & NOVAIS, J.M. (1988): Ethanol-induced leakage in Saccharomyces cerevisiae: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. Appl. Environ. Microbiol., 54, 903-909.
- SERRANO, R. (1988): Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. Biochimica et Biophysica Acta, 947, 1-28.
- SPENCER, J.F.T. (1983): Genetic Improvement of Industrial Yeasts. Ann. Rev. Microbiol., 37, 121-42.
- SYCHROVA, H. & KOTYK, A. (1985): Conditions of activation of yeast plasma membrane ATPase. FEBS Letters, 183, 21-24.
- THEVELEIN, J.M.; BEULLEUS, M.; HOUSHOVEN, F.; HOEBEECK, G.; DETREMERIE, K.; DEN HOLLANDER, J.A. & JANS, A.W.H. (1987): J. Gen. Microbiol., 133, 2191-2196.
- THEVELEIN, J.M.; BEULLENS, M.; HOUSHOVEN, F.; HOEBEECK, G.; DETREMERIE, K.; GRIEWEL, B.; DEN HOLLANDER, J.A. & JANS, A.W.H. (1987):

Regulation of the cAMP level in the yeast Saccharomyces cerevisiae: the glucose-induced cAMP signal is not mediated by a transient drop in intracellular pH. *J.Gen.Microbiol.*,133, 2197-2205.

THOMAS,D.S. & ROSE,A.H.(1979): Inhibition effect of ethanol on growth and solute accumulation by Saccharomyces cerevisiae as effected by plasmamembrane lipid composition. *Arch.Microbiol.*,122, 49-55.

THOMAS,D.S.; HOSSACK,J.A. & ROSE,A.H.(1978): Plasma membrane composition and ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae. *Arch.Microbiol.*,117, 239-245.

TODA,K; ASAKURA,T. & OHTAKE,H.(1987): Inhibitory effect of ethanol fermentation. *J.Gen.Microbio.*,33, 421-428.

TORRICO,D. & ACEVEDO,F. (1988):Effect of agitation and Tween 80 addition in the continuous alcohol fermentation. *MIRCEN Journal*,4, 393-99.

TROYER, J.R. (1953): A relation between cell multiplication and alcohol tolerance in yeasts. *Mycologia*, 45, 20-39.

TZAGOLOFF,A. & DIECKMANN,C.L. (1990): PET Genes of Saccharomyces cerevisiae. *Microbiological Reviews*,54, 9, 211-25.

UMBREIT,W.W.; BURRIS,H.R. & STAUFFER,J.F.(1964): *Manometric techniques*. 4^a Ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis. Minesota. USA.

UMESH-KUMAR,S; NAGARAJAN,L; REHANA,F. & NAND,K.(1990): The effect of ethanol on cell wall antigens of Saccharomyces cerevisiae and specific isolation of high ethanol producing strains of this yeast, making use of a serological technique. *Antonie van Leeuwenhoek*,58, 57-66.

URIBE,S.,RANGEL,P.,ESPINOLA,G. & AGUIRRE,G.(1990): Effects of ciclohexane, an Industrial Solvent, on the yeast Saccharomyces cerevisiae and on Isolated Yeast Mitochondria.

VAN ZYL,C.; PRIOR,B.A.; KILIAN,S.G. & KOCK,J.L.(1989): D-Xylose utilization by Saccharomyces cerevisiae. *J.Gen.Microbiol.*,135, 2791-2798.

VAN DOORN,J.; SCHOLTE,M.E.; POSTMA, P.W.; VAN DRIEL,R. & VAN DAM,K.(1988): Regulation of trehalase activity during the cell cycle of Saccharomyces cerevisiae.

J.Gen.Microbiol.,134, 785-790.

VAN UDEN,N.(1985): Ethanol Toxicity and Ethanol Tolerance in Yeasts. Annual Reportes on Fermentation Processes, Vol 8, 11-58.

VAN UDEN, N.; LEAO,C.y PEINADO,J.M.(1985) : Efectos tóxicos del etanol y otros alcanoles en levaduras: Mecanismos básicos subyacentes. Bioqúmica de sistemas especiales. En:

VAN URK,H; POSTMA,E.; SCHEFFERS,A.; & VAN DIJEN,J.P. (1989): Glucose transport in Crabtree positive and Crabtree negative Yeasts. J. Gen. Microbiol.,135, 2399-2406.

VAN URK,H.; VOLL,W.S.L.; SCHEFFERS,W.A.& VAN DIJEN,J.P. (1990): Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes un Crabtree-Positive and Crabtree-Negative yeasts. Appl. Environ. Microbiol.,56 ,1,281-87.

VIEGAS,C.A. & SA-CORREIA,I.(1991): Activation of plasma membrane ATP-ase of saccharomyces cerevisiae by octanoic acid. J.Gen. Microbiol., 137, 645-51.

VIEGAS,C.A.; ROSA,M.F.; SA-CORREIA,I. & NOVAIS,J.(1989):Inhibition of Yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. Appl. Environ. Microbiol.,55,1, 21-28.

VILJOEN,B.C.; KOCK,J.L.F. & BRITZ,T.J.(1988): The significance of long-chain fatty acid composition and other phenotypic characteristics in determining relationships among some Pichia and Candida species. J.Gen.Microbiol.,134, 1893-1899.

WEITZEL,G.; PILATUS,U. & RENSING,L. (1985): Similar dose response of heat shock protein synthesis and intracellular pH change in yeast. Exp. Cell. Res., 159, 252-56.

WHITE, F.H. (1978): Ethanol tolerance of brewery yeasts. Proc. 15th Conv. Inst. Brew. (Aust. and N.Z. Sect.), Walter, L.S.,Ed., Institute of Brewing, Sydney, 133-146.

WHITE,M.J.; HAMMOND,R.C. & ROSE,A.H.(1988): Effect of glucose and long-chain fatty acids on synthesis of long-chain alcohols by Candida albicans. J.Gen.Microbiol.,134, 2131-2137.

ZEUTHEN,M.L.; DABROWA,N.; ANIEBO,C.M. & HOWARD,D.H. (1988): Ethanol Tolerance and the Induction of Stress Proteins by Ethanol in Candida albicans. J. Gen. Microbiol.,134,1375-84.

ZIKMANIS,P.B.; KRUCE,R.V.; AUZINA,L.P.; MARGEVICA,M.V. & BEKER,M.J.(1988): Intensification of alcoholic fermentation upon dehydration-rehydration of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Appl.Microbiol.Biotechnol.,27, 507-509.

ZINES, D.O. & ROGERS, P.L. (1971): A chemostat study of ethanol inhibition Biotechnol. Bioeng., 13, 293-297.