



# PRESENCIA DE ETANOL EN FERMENTACIONES DE LEVADURAS CRABTREE POSITIVAS: HAGAMOS DEL ENEMIGO UN ALIADO

Las levaduras *Saccharomyces* constituyen un género de especial relevancia en alimentación, principalmente en panificación, cervecería y vinificación. Desde tiempos inmemoriales la levadura ha resultado ser clave en estos tres ámbitos, aun cuando no se conocieran sus mecanismos de actuación hasta alcanzarse el siglo XIX y ni tan siquiera los alimentos relacionados con la misma se produjeran a escala industrial durante la mayor parte de la Historia de la Humanidad.



DAVID BARRERAS MARTÍNEZ,  
área de Biotecnología, Instalaciones Industriales Grau.

Pero no solamente las *Saccharomyces* tienen un papel destacable en la industria alimentaria, sino que también en la industria biofarmacéutica se revelan como un género muy interesante por su potencial probiótico, así como por ser levaduras muy estudiadas desde el punto de vista científico. *Saccharomyces*, a su vez, puede ser un sustituto eficaz de los sistemas de expresión de otros hongos, como *Pichia pastoris*, ampliamente utilizados en la producción de fármacos, que presentan, además, el inconveniente de estar sujetos a sólidas patentes, lo que los convierte en excesivamente costosos.

Hasta ahora todo parecen ser ventajas a la hora de dar un uso industrial a las *Saccharomyces*, aunque también debemos hacer mención al bajo rendimiento celular y, por lo tanto, al bajo rendimiento en expresión de metabolitos de interés asociado, que se obtiene en la producción de estas levaduras como consecuencia de sus limitaciones en relación a la fermentación aerobia.

## El efecto Crabtree

Las *Saccharomyces* son levaduras Crabtree positivas, es decir, siempre que haya en el medio una concentración



PDC: piruvato descarboxilasa. ALD: acetaldehído deshidrogenasa. ACS: acetil-CoA sintetasa. ADH: alcohol deshidrogenasa. PDH: complejo de la piruvato deshidrogenasa; formado por PDC, ALD y ACS.

Figura 1. El by-pass de la PDH.

excesiva de azúcares fermentables (glucosa, fructosa o sacarosa) se produce un cambio metabólico de la vía respiratoria a la fermentativa, independientemente de la presencia de oxígeno, lo que conduce a la formación de etanol y a una reducción del rendimiento celular. El llamado efecto Crabtree (Crabtree, 1929) se da cuando el flujo glicolítico excede a la capacidad máxima respiratoria de las células y está causado por una saturación del metabolismo oxidativo.

El producto final obtenido en la glucolisis, es decir, el piruvato, puede ser respirado o fermentado (véase figura 1). Para el caso de *Saccharomyces cerevisiae* el piruvato ingresará en la vía respiratoria si la concentración de

glucosa en el medio es inferior a 0.15 g/L, o si la velocidad de dilución es inferior a 0.22 H<sup>-1</sup> (Rehm y Reed, 1991), siempre y cuando se den condiciones adecuadas de aerobiosis. Con concentraciones mayores de glucosa, el piruvato será metabolizado por la vía fermentativa, independientemente de la presencia de oxígeno. Esta especie de *by-pass* que aparece al final de la glucólisis y que lleva a una vía respiratoria o fermentativa, es la denominada ruta metabólica de la piruvato deshidrogenasa.

Si la levadura sigue la ruta respiratoria el acetaldehído formado a partir del piruvato pasará a acetato y seguidamente a acetil-CoA. Éste último ingresará en el ciclo de Krebs, que junto con la cadena de transporte de electrones producirá el máximo rendimiento energético.

Cabe destacar, insistimos, que la ruta metabólica de la piruvato deshidrogenasa tiene una capacidad limitada. Para el caso de *S. cerevisiae*, si en el medio se encuentran presentes concentraciones de glucosa superiores a 0.15 g/L, valor al que ya hemos hecho referencia, se producirá una saturación de la ruta de la piruvato deshidrogenasa y el piruvato será desviado por otra vía, la de la alcohol deshidrogenasa. Esto determinará el inicio de la fermentación alcohólica. El rendimiento energético obtenido en este caso será mucho menor que el de la vía respiratoria y coincidirá con producido por la glucólisis.

### Producción industrial de levaduras *saccharomyces*

Los procesos de *fed-batch* (discontinuo alimentado) están diseñados para evitar los inconvenientes de la fermentación aerobia de la glucosa, es decir, el objetivo es que la levadura consuma el sustrato siguiendo la ruta respiratoria y, por lo tanto, se obtenga el máximo rendimiento. Teóricamente se pueden obtener resultados satisfactorios, para *S. cerevisiae*, siempre y cuando no se sobrepasen flujos de alimentación de 0.22 H<sup>-1</sup>, valor al que ya hemos hecho alusión anteriormente. Pero en la práctica esto no resulta tan sencillo. La fermentación aerobia de la glucosa no es un problema exclusivo de los procesos de *batch*. En los cultivos discontinuos alimentados debe de existir un flujo adecuado, como bien sabemos, que permita crecer a la máxima velocidad y que a la vez impida el metabolismo fermentativo. Debemos de conocer el sustrato alimentado, el sustrato residual y la concentración de biomasa en cada instante. Solamente si existe un control muy preciso del proceso se podrán alcanzar los objetivos marcados.

El asunto puede complicarse aún más cuando se trabaja con levaduras recombinantes. En este caso el flujo de alimentación límite entre la respiración y la fermentación puede adquirir valores muy por debajo del teórico 0.22 H<sup>-1</sup>, haciendo prácticamente imposible trabajar a un caudal adecuado para conseguir una buena velocidad de



crecimiento y a la vez evitar la fermentación de la glucosa.

En resumen, en los procesos de *batch* las levaduras del género *Saccharomyces* metabolizan la glucosa por la vía fermentativa, produciendo etanol, como hemos podido ver anteriormente. Este producto será consumido al final del *batch*, cuando la levadura haya agotado la glucosa, si se dan condiciones de aerobiosis. Una vez que la levadura esté adaptada al crecimiento en etanol, puede aprovecharse esta capacidad del género *Saccharomyces* para iniciar un *fed-batch* empleando esta fuente de carbono. De esta forma podrían evitarse los problemas que derivan de la fermentación de la glucosa.

Con el objeto de mejorar en la producción de levaduras *Saccharomyces* los rendimientos en biomasa y la expresión de metabolitos asociada, conociendo, además, que éstas se adaptan perfectamente al crecimiento en etanol, se puede dirigir el metabolismo de este microorganismo hacia la vía respiratoria pura, es decir, aquella que emplea etanol como fuente de carbono, evitándose así los inconvenientes que derivan de la utilización de glucosa como sustrato, por ser ésta fermentable. En definitiva, el etanol podría emplearse de forma más eficaz como fuente de energía de levaduras *Saccharomyces* que los azúcares fermentables usados tradicionalmente, lográndose así mantener en todo momento la ruta respiratoria que nos permita eludir el inoportuno metabolismo fermentativo y las consecuentes bajadas de rendimiento que éste acarrea.

### Bibliografía

1. Crabtree H G. 1929. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* 23:536-545.
2. Rehm H J, Reed G. 1991 *Biotechnology. Microbial Fundamentals* 1:102-199.