

# TÍTULO: INCIDENCIAS DEL COMPORTAMIENTO NORMAL DE LA SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN LAS TECNOLOGÍAS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

**Autor:** Dr. C. Ing. Joaquín de J. Obregón-Luna  
Centro de Estudio de Energías y Procesos Industriales (CEEPI)  
Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez”, Cuba  
e-mail: [obregon@suss.co.cu](mailto:obregon@suss.co.cu)

## RESUMEN

A partir de reportes de laboratorios de investigaciones científicas y de la práctica industrial, se realizó un examen del comportamiento normal de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y sus incidencias en los procesos tecnológicos de producción de alcohol por fermentación. Se compilaron tres particularidades de conducta de este microorganismo: Los efectos Pasteur, Crabtree y Custers. Se constató que el primero ha originado, en la etapa aerobia de reproducción de la levadura en los prefermentadores de las destilerías de alcohol, que la concentración de azúcares fermentables sea del 60% al 70% del de la anaerobia fermentación alcohólica. El segundo, en tolerar que la formación de etanol de 2% a 3% v/v es normal en proceso aerobio, si es reproducción cíclica de la levadura en cubas madres hasta 4% alcohol. Además, originó el desarrollo de biotecnologías de alimentación del sustrato limitante por pulsos (*fed-batch*). El último, dictaminó la necesidad del empleo de bifluoruro de amonio o antibióticos si en el sustrato fermentado manifiesta 0,8% w/v o más de acidez, así como su empleo operacional sistemático cuando se recircula la biomasa de levadura a la fermentación alcohólica industrial por el proceso Melle-Boinot. Se precisó que el conocimiento de estas características de la *Saccharomyces cerevisiae*, por parte de los académicos y productores, es una necesidad en la obtención de los mejores resultados de viabilidad técnico-económica.

**Palabras clave:** efecto Pasteur | efecto Crabtree | efecto Custer | fermentación alcohólica | *Saccharomyces cerevisiae*

# TITLE: INCIDENCES OF THE NORMAL BEHAVIOR OF THE SACCHAROMYCES CEREVISIAE IN THE ALCOHOLIC FERMENTATION TECHNOLOGIES

## ABSTRACT

Starting from reports of laboratories of scientific investigations and of the industrial practice, it was carried out an examination of the normal behavior of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and their incidence in the technological processes of production of alcohol for fermentation. Three particularities of behavior of this microorganism were compiled: The Pasteur, Crabtree and Custers effects. It was verified that the Pasteur effect has originated that in the aerobic process of reproduction of the yeast in the prefermentors of the stills of alcohol, the concentration of fermentable sugars is from 60% to 70% of that of the anaerobic alcoholic fermentation process. For Crabtree effect, in tolerating that the formation of 2% to 3% v/v of ethanol is normal in aerobic process, if it is by means of the recurrent reproduction of yeast in mother tanks, up to 4% alcohol. It also originated the development of biotechnologies of feeding of the limiting mash for pulses (fed-batch). For Custers effect the necessity of the employment of ammonium bifluoride or antibiotics, if in the mash fermented apparent 0,8% w/v or more than acidity; as well as their systematic operational employment when the yeast biomass is recycled to the industrial alcoholic fermentation for the Melle-Boinot process. It was specified that the knowledge of these characteristics of the yeast, on the part of the academics and producers; it is a necessity in the obtaining of the best results of technician-economic viability.

**Key words:** alcoholic fermentation | Pasteur Effect | Crabtree Effect | Custer Effect | *Saccharomyces cerevisiae*

## INTRODUCCIÓN

La explosión productiva de bioetanol, en particular, como agrocombustible para vehículos automotores (Vertés et al., 2010), tiene un pronóstico de producción

para 2020 de unos 120 000. 10<sup>6</sup> litros (F. O. Lichts, 2008). Alcanzar esta cifra ha conllevado a desarrollar la infraestructura agroindustrial, iniciada desde fines de la década del 70 del siglo pasado, que continúa con crecimientos. Marchan a la cabeza, Brasil a partir de la caña de azúcar (Puerto Rico, 2008) y Estados Unidos del maíz (F. O. Lichts, 2008). Ambas naciones tienen una enorme extensión territorial. Los países pequeños, como los insulares del Caribe y otros de Centroamérica, con limitadas posibilidades de disponer de suficientes áreas agrícolas para estos propósitos, no pueden generalizar estas experiencias. Sin embargo, en función de las necesidades internas, de reducir las emisiones de gases de efectos invernadero y de los precios del mercado internacional del azúcar, el alcohol y los combustibles fósiles, se realizan producciones flexibles alcohol-azúcar a partir de la caña de azúcar (Obregón-Luna, 2012 a; 2012 b). Implica elaborar azúcares de alta calidad con extracciones de corrientes secundarias del proceso, como los jugos pobres de los molinos, de los filtros de cachaza y las mieles B. Desde 2003, un nuevo sustrato ha irrumpido en Cuba: los jugos de caña energética, los cuales no tienen otro empleo, con viabilidad técnico-económica, que no sea como sustrato para la fermentación alcohólica (Obregón-Luna, 2008). La co-generación eléctrica será potenciada en los próximos años, mediante inversiones ya iniciadas con capital mixto, en el desarrollo de las bioeléctricas a partir del bagazo de las cañas de azúcar y energética, más otras fuentes forestales. Se pretende que la matriz de energía del país, sea de alrededor de un 30% con energía renovable, para depender menos del petróleo importado (ATAC, 2012; EL COMERCIO, 2012; Sosin-Martínez, 2013).

Con las materias primas antes referidas, el microorganismo más empleado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, por sus bondades técnico, económica, sanitaria y ambiental; lo que facilita la industrialización de la producción de etanol (Andrietta, 2010). Más del 90% de la fermentación alcohólica mundial se realiza con esta levadura, incluidas las modificadas en su genoma (CATIC, 2011).

Las tecnologías clásicas de fermentación alcohólica industrial de Jacquemín y Melle-Boinot, se han enriquecido con otras de nuevo desarrollo. Mantienen en

común el empleo del microorganismo antes indicado (Dedini, 2010; Praj, 2012; Thomsa Destil, 2012).

En las destilerías de alcohol cubanas, la *Saccharomyces cerevisiae* se recupera en forma de polvo seco con no más de 8% de humedad y de crema (leche), como subproducto asociado rico en proteínas para la alimentación de animales monogástricos, en particular, porcino. Las paredes celulares de esta levadura son ricas en los prebióticos glucano-oligosacárido (GOS) y manano-oligosacárido (MOS) en particular, empleados en dietas de peces, aves y mamíferos en general (Agrimós, 2013; Biorigin, 2013). Por su afinidad a las fimbrias de la *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*, originan aglutinación de estas bacterias patógenas, lo cual inhibe que colonicen los intestinos de los animales que le evitan enfermedades gastrointestinales; y son arrastradas con las heces fecales fuera del tracto intestinal (Aref et al., 2012; Santurio, 2013). Sustituye soya y antibióticos veterinarios importados y, por ende, mejora la balanza de pagos del país en el contexto de la actualización de su modelo económico (PCC, 2011).

Lo anterior hizo pertinente el objetivo de este trabajo: revisar el comportamiento natural de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica y sus incidencias en las tecnologías desarrolladas.

## **DESARROLLO**

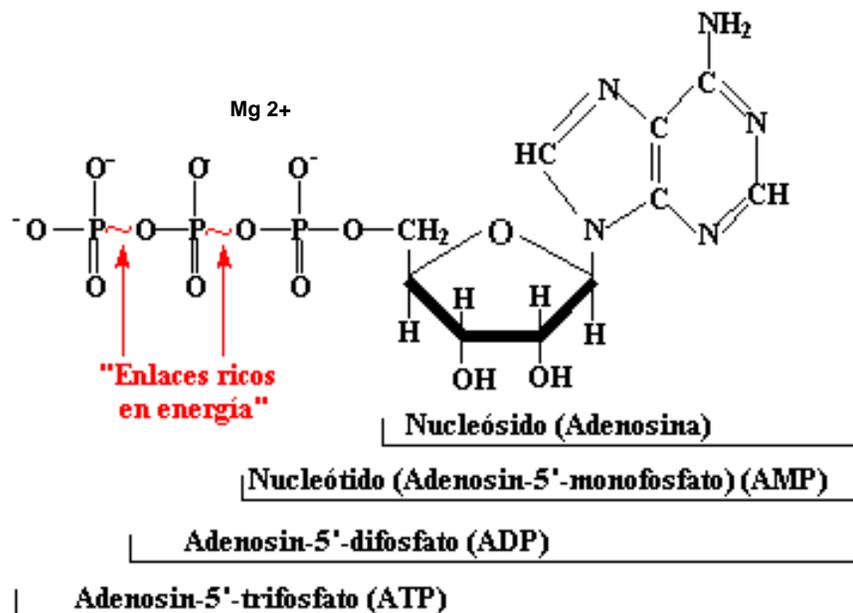
Conocer el comportamiento habitual de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un *sine qua non* para cualquier tecnología de fermentación alcohólica que la utilice, sea tradicional o de nuevo desarrollo (Bai et al., 2008). Ello permite establecer los valores de las variables de proceso que condicionan los parámetros de operación y diseños de equipos, donde tendrán lugar las transformaciones de los azúcares fermentables en el alcohol objeto de producción.

La microbiología y la bioquímica han tenido y tienen un protagonismo principal, en aclarar el porqué de la conducta normal de este microorganismo, aislado de la naturaleza, en particular, de las uvas, entre otros orígenes (Obregón-Luna, 2012 c).

Tres efectos manifiestan de forma natural este microorganismo, estos son:

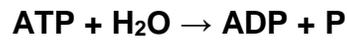
**EFFECTO PASTEUR:** Descrito hace más de un siglo como resultado de las investigaciones de este científico francés. Reveló que la levadura en las condiciones anaerobia de la fermentación alcohólica, al aplicársele aire como fuente de O<sub>2</sub>, desciende de forma abrupta la velocidad de metabolización de la glucosa, por lo que este monosacárido actúa como una suerte de inhibidor con reducción significativa de la producción de bioetanol.

Para comprender este efecto, se requiere de un análisis, al menos, de las reacciones globales en condiciones aerobias y anaerobias de la levadura facultativa *Saccharomyces cerevisiae*. En ambos procesos, este microorganismo obtiene la energía química para sus necesidades vitales, incluidos componentes de mantenimiento celular y la reproducción. Lo logra mediante la biosíntesis del trifosfato de adenosina o Adenosin-trifosfato (ATP por sus siglas en inglés), a partir del difosfato de adenosina o Adenosín-difosfato (ADP por sus siglas en inglés), ambos contenidos en el interior de las células. Para ello incorpora al ADP un radical fosfato (Pi) contenido en el sustrato con formación de un ATP. La Figura 1 ilustra las conversiones sucesivas del nucleósido adenosina en los diferentes nucleótidos.

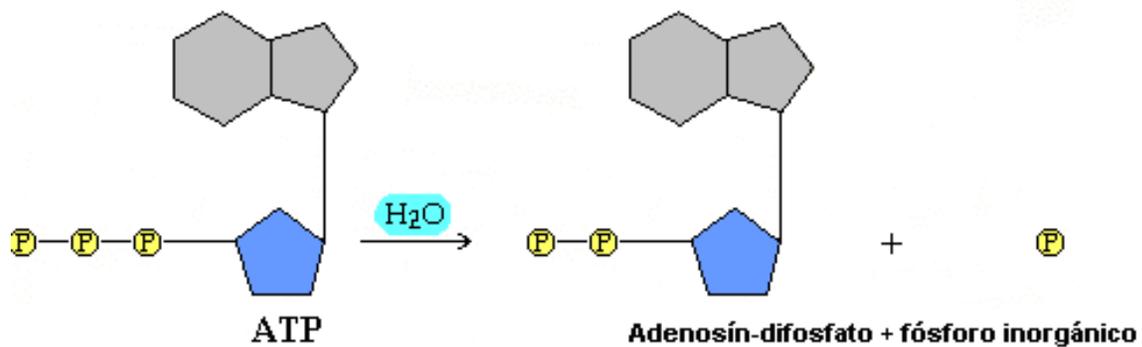


**Figura 1- Conversión del nucleósido en nucleótidos por fosforilación enzimática**

El mecanismo contrario que ocurre en la fosforilación de la glucosa, mediante “cebado” durante la glucólisis, libera un fósforo (P) inorgánico como el siguiente:

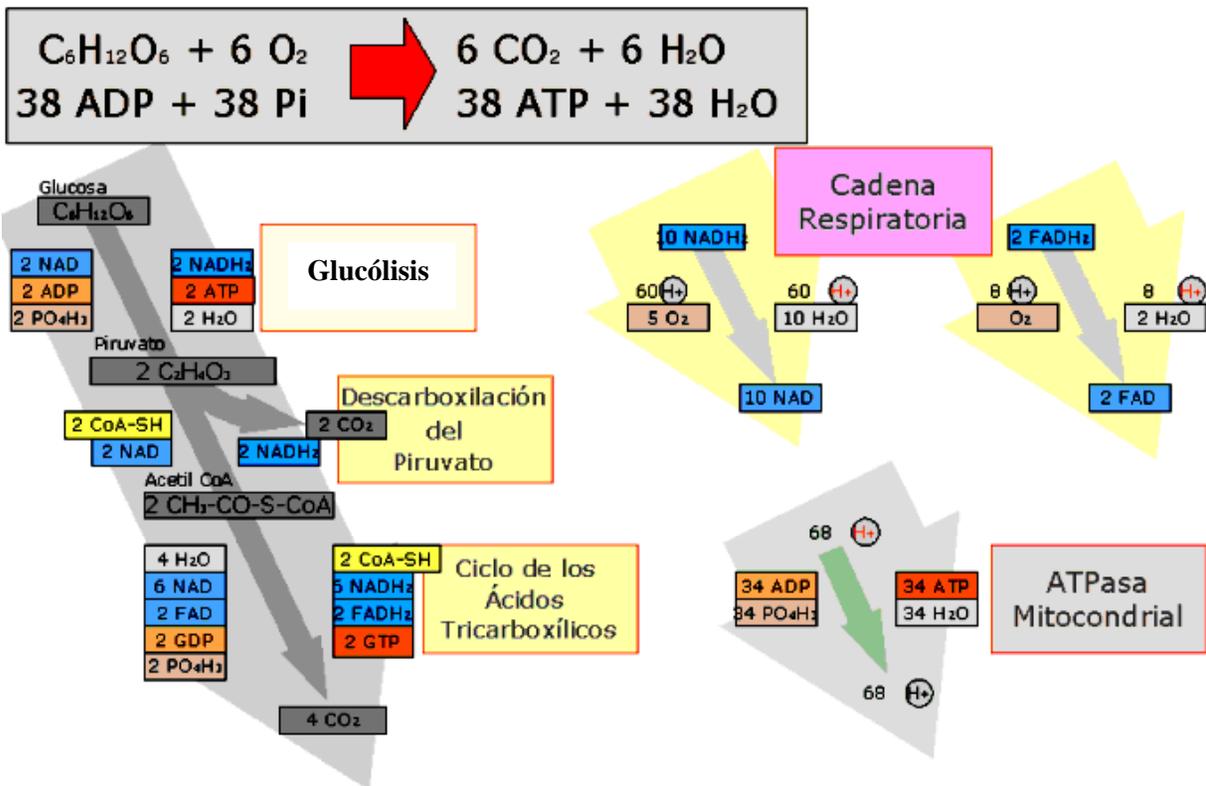


En la Figura 2 se muestra un esquema de representación química de este proceso.



**Figura 2- Proceso de hidrólisis del ATP con liberación de un P**

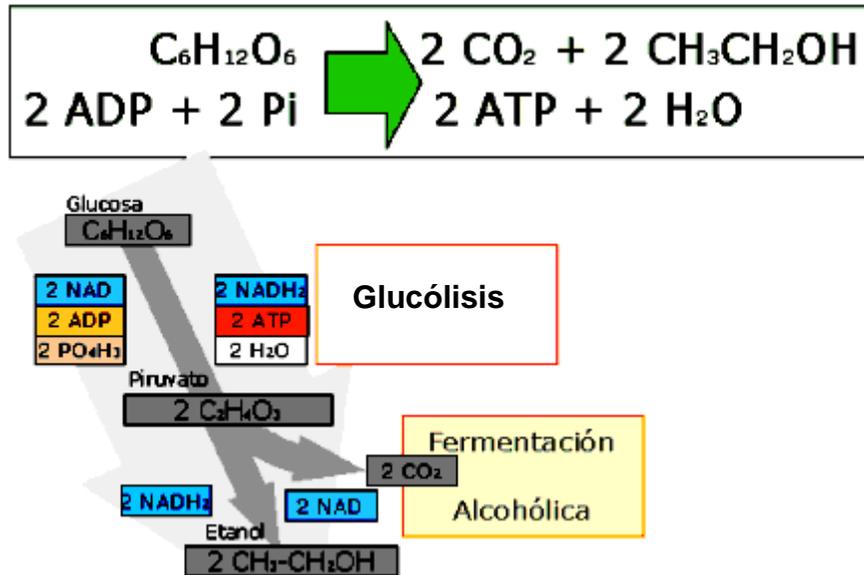
En **condiciones aerobias** la glucosa se combustiona por completo, lo que ocurre en la mitocondria de la célula. La Figura 3 representa el esquema bioquímico global.



**Figura 3- Metabolización de la glucosa en condiciones aerobias**

Durante la respiración son consumidos 2 ATP, por lo se dispone de 36 moléculas netas de ATP como energía química.

En **condiciones anaerobias** de la fermentación alcohólica, la glucosa registra una combustión parcial. La Figura 4 ilustra la reacción bioquímica global.



**Figura 4- Metabolización de la glucosa en condiciones anaerobias**

Las causas, que originan este comportamiento, pueden sintetizarse en lo siguiente:

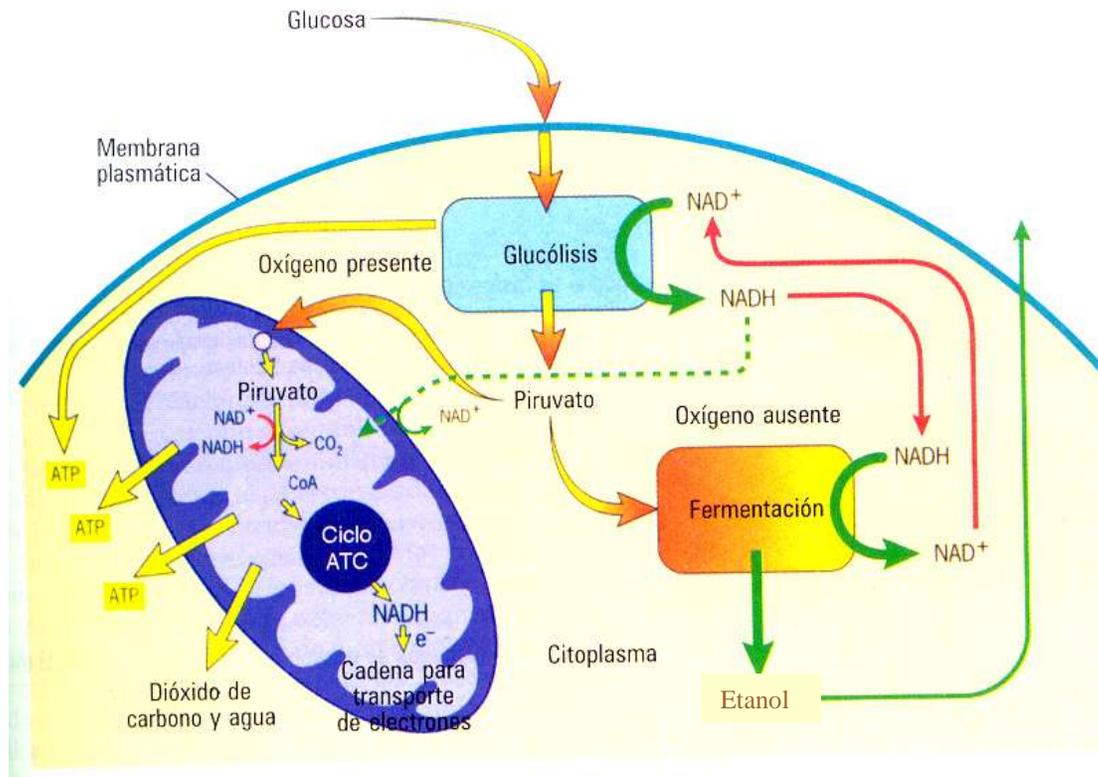
- La respiración de la levadura ocurre en condiciones aerobias en la mitocondria con las enzimas del ciclo de Krebs, y la fermentación alcohólica, en ambiente anaerobio en el citoplasma celular con otras enzimas. Ello no significa que sean rutas metabólicas excluyentes sino que coexisten en diferentes sitios de la célula de levadura.

- En condiciones anaerobias de la fermentación alcohólica se crean solo 2 ATP. La Figura 2 muestra que originan 38 ATP cuando es aerobia, de ellos, 36 ATP disponibles. Para igualar la velocidad de biosíntesis aerobia sería:  $36/2= 18$  veces mayor la metabolización anaerobia. Experimentos han demostrado que en realidad es superior al valor calculado (Bu'Lock & B. Kristiansen, 2000).

La incidencia tecnológica ha sido en la propagación aerobia de la biomasa de levadura en laboratorio y en la industria, el sustrato es diluido al 60% - 70% ( $60 \text{ g. L}^{-1}$  a  $80 \text{ g. L}^{-1}$ ) de la concentración utilizada en la fermentación alcohólica anaerobia para contrarrestar la inhibición por la glucosa.

**EFEECTO CRABTREE:** Este científico descubrió que aún con un exceso apreciable de O<sub>2</sub> mediante aeración fuerte, si la concentración de azúcares fermentables sobrepasa valores tan bajos como  $0,16 \text{ g. L}^{-1}$  en el sustrato es inevitable la

producción de alcohol por la *Saccharomyces cerevisiae*. El exceso de concentración en el sustrato puede detener la reproducción de la levadura debido al estrés osmótico que produce, pero ralentiza la fermentación alcohólica, no la detiene, como mecanismo biológico natural de mantenimiento de la viabilidad mediante recambio de componentes celulares (Tomasso, 2004). La Figura 5 ilustra las rutas metabólicas de la glucólisis.



Fuente: Adaptación de Tomasso, 2004.

### Figura 5- Rutas metabólicas de la glucólisis

Este comportamiento normal de la levadura, ha incidido en la ingeniería de proceso fermentativo alcohólico, en lo siguiente (Bai et al., 2008):

- En la producción industrial de bioetanol utilizar concentraciones de azúcares fermentables que no originen estrés osmótico a la levadura. Es variable de acuerdo al tipo de sustrato, pero no excede los 250 g. L<sup>-1</sup> con sustratos originados de la caña de azúcar.
- Aprovechar esta característica para desarrollar procesos biotecnológicos mediante la alimentación del sustrato limitante por pulsos [*fed-batch*] (Galvagno &

Cerrutti, 2012). Además, facilita la modelación matemática y los balances de materiales, al no tener que hacerlo con todos y cada uno de los componentes del sustrato, sino solo con el limitante.

- Aparte de la menor concentración del sustrato en la etapa de propagación de la levadura, valores del 2% al 3% de alcohol en volumen resultan razonables en la etapa de propagación industrial de la levadura (Bu'Lock & Kristiansen, 2000).

- Existen firmas fabricantes de destilerías completas que admiten hasta 4% alcohol, para la propagación de la biomasa de la levadura en cubas madres mediante doblaje cíclico (Thomsa Destil, 2012).

*EFECTO CUSTERS.* Fue descrito desde 1940 para la levadura salvaje *Brettanomyces intermedius*, entre otras, como infección al proceso fermentativo alcohólico. Manifiesta un efecto *Pasteur* negativo, o sea, que la aplicación de aire al sustrato no inhibe o reduce la formación de alcohol sino que la estimula, pero además, exacerba la producción de ácido acético. Sus incidencias en las tecnologías han sido:

- Contaminación causal, entre otros factores, de los problemas confrontados con el proceso Biostil de una prestigiosa firma sueca (Jay & Cruz, 1998).

- Empleo de unas 35 p.p.m. de bifluoruro de amonio o diferentes antibióticos en el sustrato para la propagación de la levadura, cuando el sustrato fermentado registre valores de 0,8 w/v o más de acidez (Jacques et al., 2003).

- Cuando se recupera la levadura de la fermentación alcohólica para recircularla por el proceso Melle-Boinot, es práctica el empleo sistemático de antibióticos para bloquear infecciones con normas establecidas para esta operación industrial (González & Garit, 2010).

- En las levaduras secas se activan comerciales, existen cepas sensibles y resistentes. Evidencia la necesidad de conocer al detalle las características particulares de cada una de ellas.

## CONCLUSIONES

- La revisión del comportamiento normal de la *Saccharomyces cerevisiae*, en la fermentación alcohólica, evidenció que la misma manifiesta conductas específicas de este microorganismo, identificadas como los efectos Pasteur, Crabtree y Custers.
- El efecto Pasteur incidió en las tecnologías fermentativas alcohólicas, en que generalizó la implementación de la propagación aerobia de la biomasa de levadura, con una concentración de azúcares fermentables en el sustrato menor en 30% a 40%, con relación al utilizado en la fermentación anaerobia.
- El efecto Crabtree originó el desarrollo de tecnologías que pone límites a la concentración de azúcares fermentables en el mosto, y alimenta el mismo por pulsos *-fed-batch-*, para reducir su consumo, entre otros.
- El efecto Custers permitió caracterizar las diferentes cepas comerciales de levadura en sensibles y resistentes. Argumentó, como conveniente, el empleo del bifluoruro de amonio y antibióticos, entre otros, en el proceso fermentativo alcohólico.
- El conocimiento de estos tres factores en el mundo académico facilita más competencia profesional de los docentes, que al impartirlo a sus alumnos, les brinda conocimientos sobre las realidades concretas de la fermentación alcohólica industrial. A los productores, tener elementos de juicio para diagnosticar problemas que puedan surgir en sus fábricas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrimos (2013). El efecto [bloqueo] sobre bacterias indeseables. [Versión electrónica]. Disponible en: <http://www.3tres3.com>
2. Andrietta, S. R. (2010). *Engenharia de Fermentação*. Presentación Power Point, 23 Diapositivas. Brasil.

3. Aref, A. et al. (2012). The Efficacy of dietary Prebiotic *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall on Growth indices, Survival Rate and Carcass proximate Composition in *Fingerling Acipenser nudiventris*. AQUA 2012, p. 5, Irán. Internet.
4. ATAC (2012). *50 Congreso de la Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba*. Comisión 2: Energía. Exposiciones y debates, Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba.
5. Bai, F., Anderson W. & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advance*, 26 (1), 89-105.
6. Biorigin (2013). *Lámina Técnica-ActiveMOS*. Disponible en: [www.biorigin.com.br](http://www.biorigin.com.br)
7. Bu'Lock, J.C & Kristiansen, B. (2000). *Biotecnología básica*. Zaragoza, España: Editorial Acribia S. A.
8. CATIC (2011). CATIC BEIJING COMPANY. *300,000 L/D Molasses Fuel Alcohol*. Technical Proposal & Business Quotation. Catalogue, p.34.
9. Dedini (2010). Informaciones varias. Disponible en: [www.dedini.com.br](http://www.dedini.com.br)
10. EL COMERCIO (2012). *Cuba inaugurará en 2012 su primera planta bioeléctrica*. Disponible en: [http://www.elcomercio.com/sociedad/Cuba-inaugurara-primera-planta-bioelectrica\\_0\\_613738669.html](http://www.elcomercio.com/sociedad/Cuba-inaugurara-primera-planta-bioelectrica_0_613738669.html)
11. F.O Lichts. *Products & Services* (2008). World Ethanol & Biofuels Report. USA.
12. Galvagno, M. A. & Cerrutti, P. (2012). *Aumento de la actividad panificadora de levaduras comerciales por aplicación de condiciones de estrés durante su propagación*. Mundo Alimentario, Marzo/Abril. Disponible en: [www.mundoalimentario.com.mx](http://www.mundoalimentario.com.mx)
13. González, C. & Garit, C. (2010). *Experiencia brasileña de fermentación alcohólica*. Presentación Power Point, 66 diapositivas. Ministerio del Azúcar (MINAZ), Cuba.

14. Jaques, K, Lyons, T. P. & Kelsall, D. R. (2003). *The Alcohol Textbook*. Printed by The Midlands Book Typesetters. Nottingham University, U.K. 4<sup>th</sup>. Edition.
15. Jay, J. & Cruz, F. (1998). Investigacioness, tecnologías y sistemas para la producción de alcohol. *CubaAzúcar*, XVII (4), 31-33. ISSN: 0590- 2916.
16. Obregón-Luna, J. J. (2008). *Estudio para la obtención de bioetanol a partir de jugos de caña energética como componente del substrato*. Tesis doctoral Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba. Disponible en: <http://revistas.mes/elibro/tesis/cienciastecnicas>
17. Obregón-Luna, J. J. (2012a). Producción flexible azúcar-alcohol a partir de la caña (I). Metodología de caracterización algorítmica de los L bioetanol/ t caña de azúcar. *Ingeniería Química*, 506, p.102-104; España: Editorial Alción S.A., mayo, 2012. ISSN: 0210-2064.
18. Obregón-Luna, J. J. (2012b). Producción flexible azúcar-alcohol a partir de la caña (II). Estimación del bagazo sobrante como agrocombustible y materia prima. *Ingeniería Química*, 508, p.90-92; España: Editorial Alción S.A., julio-agosto, 2012. ISSN 0210-2064.
19. Obregón-Luna, J. J. (2012c). *Manual del bioetanol a partir de la caña de azúcar*. Capítulo III: Microbiología básica de la fermentación alcohólica, p.64. Proyecto no financiado en ejecución. Centro de Estudio de Energías y Procesos Industriales (CEEPI), Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez”, Cuba.
20. PCC (2011). *Lineamientos de la política económica y social del Partido y la Revolución*, p.38.
21. Praj (2012). Informaciones varias. Disponible en <http://www.praj.net>
22. Puerto Rico, J. A. (2008). *Programa de Biocombustíveis no Brasil e na Colômbia: uma análise da implantação, resultados e perspectivas*. Universidade de São Paulo. Tesis doctoral.
23. Santurio, J. M. (2013). *El momento y lugar de los prebióticos*. Centro de Pesquisas en Microbiología (CEPEN-LAPEMI), Universidad Federal de Santa María, Brasil.

24. Sosin-Martínez, E. (2013). Actualidad de las energías renovables en Cuba. *Semanario Económico y Financiero de Cuba*. ISSN 1563-8340.
25. Tomasso, M. (2004). *Glicólisis y Fermentación Alcohólica*. Escuela de Vitivinicultura, Pdte. Tomás Berreta, Presentación Power Point, 16 diapositivas.
26. Thomsa Destil (2012). *Destilería. Licorería. Química Fina*. Disponible en: [www.tomsa.es](http://www.tomsa.es)
27. Vertés, A., Qureshi, N., Blaschek, H. P. & Yukawa, H. (2010). *Biomass to Biofuels: Strategies for Global Industries*. Ed. John Wiley & Sons, Ltd. USA. ISBN: 978-04-0470-51312-5. 284-291.