

Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial

Metabolic responses to stress by yeasts of industrial importance

Patricia Vital López^{1*}, Claudia Patricia Larralde Corona¹

Vital López, P., Larralde Corona, C. P. Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Número 67: 86-91, enero-abril 2016.

RESUMEN

La producción de metabolitos y biomasa de levaduras a nivel industrial está generalmente sujeta a condiciones estresantes de cultivo, principalmente en cuanto a la concentración de oxígeno disuelto, presión osmótica, temperatura, pH y compuestos tóxicos como el etanol. Al ser las levaduras organismos unicelulares, los mecanismos para enfrentar estas situaciones de estrés se basan en cambios fisiológicos y de composición, así como toda una gama de respuestas de su metabolismo. En este trabajo se hace una revisión de las respuestas metabólicas en levaduras durante la producción a escala industrial de bebidas como el vino, así como las investigaciones básicas realizadas para elucidar las respuestas fisiológicas comunes usadas por estos microorganismos, con especial énfasis en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que es por mucho la más importante a nivel industrial.

ABSTRACT

The production of metabolites and biomass on yeasts is performed usually under stressing conditions, mainly the ones concerning dissolved oxygen, osmotic pressure, temperature, pH and toxic compounds, amongst others. Due to their unicellular nature,

Palabras clave: levadura, estrés, presión osmótica, temperatura, estrés oxidativo.

Keyword: yeast, stress, osmotic pressure, temperature, oxidative stress.

Recibido: 22 de diciembre de 2014, aceptado: 10 de noviembre de 2015

¹ Laboratorio de Biotecnología Industrial, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional.

* Autor para correspondencia: pvital1400@alumno.ipn.mx

yeasts usually rely on changes in their physiology and composition to deal with environmental stresses. In this review we analyzed the metabolic responses used by yeasts during industrial processes such as wine production, as well as research performed to elucidate their common physiological responses, and stressing the findings on *Saccharomyces cerevisiae*, which is by far the most important yeast from the industrial point of view.

INTRODUCCIÓN

En definición, según Walker (2000), las levaduras son hongos unicelulares, ascomicetos o basidiomicetos, que se reproducen vegetativamente por gemación o fisión, y tienen estadios sexuales que no forman cuerpos fructíferos. Las levaduras están presentes en nuestro ambiente natural y las plantas son nichos comúnmente para las levaduras, se localizan principalmente en la interfase entre los nutrientes solubles como los azúcares; varias levaduras se asocian al tracto digestivo y piel de animales con especies tales como *Candida pintolopesii* y *Pityrosporum spp.*, respectivamente. El suelo es también un hábitat a largo plazo para su supervivencia y lo pueden aprovechar como lugar de libre crecimiento. Las levaduras son descritas como organismos domésticos ya que se han utilizado para la producción de bebidas alcohólicas y de pan por milenios, y son explotadas para producir agentes biofarmacéuticos y otras biomoléculas. La tolerancia a los diferentes tipos de estrés durante los procesos biológicos varía de cepa a cepa y depende del tipo de estrés y la duración de la exposición a los mismos. Un esquema general de las condiciones estresantes durante un proceso fermentativo se muestra a continuación en la Figura 1.

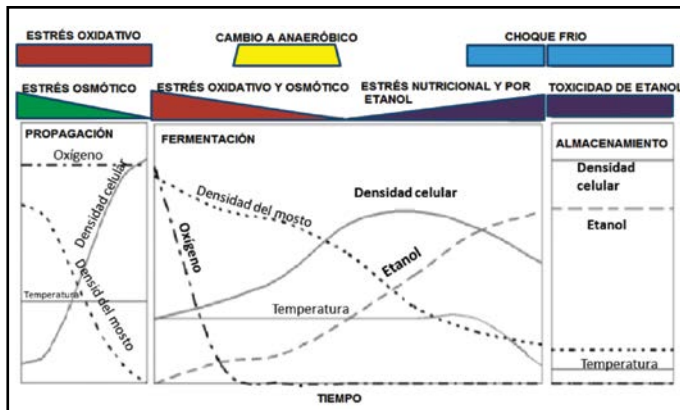


Figura 1. Representación esquemática de la naturaleza temporal y secuencial de posibles tipos de estrés encontrados por las levaduras durante la propagación, fermentación y almacenamiento. Figura adaptada de Gibson et al. (2007).

La respuesta general del metabolismo de las levaduras más abundantemente estudiadas se revisa a continuación por tipo de estrés; en la Tabla 1 se resumen los rangos que han establecido algunos investigadores para aplicar los factores de estrés y su respuesta a los mismos.

Tolerancia al estrés por temperatura

El estrés a altas temperaturas influye adversamente en la fisiología celular de la levadura y la viabilidad celular, afecta la morfología general de la célula al producir una gemación atípica y el crecimiento de la pared celular es irregular, lo que ocasiona también el aumento de tamaño de la célula, ello afecta la división y crecimiento celular. La temperatura influye en la estructura de la membrana plasmática en su función, por ejemplo, en la disminución de ácidos grasos insaturados de la membrana, además de disminuir el pH intracelular; también la represión de síntesis de muchas proteínas mitocondriales y el incremento en la frecuencia de mutaciones y daños por calor al DNA.

Algunas células de *Saccharomyces cerevisiae* pueden crecer rápidamente en temperaturas entre 25 °C y 37 °C que son aún toleradas, pero a una temperatura de 41 °C el crecimiento disminuye hasta dejar de crecer por completo a 46 °C, en esta temperatura puede observarse el incremento de las proteínas HSP104 (HSP, proteína de choque de calor), evidenciadas por un análisis tipo Western blot (Holubářová et al., 2000).

Con el objetivo de proteger a las células e inhibir los efectos de la temperatura, Sun et al. (2007) estudiaron el efecto de utilizar microcápsulas (con núcleo líquido y sólido) en la cepa silvestre *S. cerevisiae*, con lo que se obtuvo una mayor tolerancia al estrés por temperatura y la acumulación de metabolitos importantes como glicerol y trehalosa como protección, así como la aparición de la actividad de SOD (superóxido dismutasa).

Carrasco et al. (2001) observaron también la expresión de los genes HSP12 y HSP104, mientras que Garay Arroyo et al. (2004) y Gibson et al. (2007) observaron la producción de las proteínas HSP104, HSP26 y una sobrevivencia de entre 20% y 40% cuando se sometía a las levaduras a un choque térmico de 51 °C.

Tolerancia al estrés osmótico

El estrés osmótico que las levaduras pueden presentar puede deberse a la presencia de sales en el medio, en las cuales las mismas realizan su metabolismo.

En un estudio realizado con la cepa *Candida tropicalis* aislada de suelos salinos de Pakistán y una cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* se logró comparar la capacidad de síntesis de osmolitos como la trehalosa y el transporte de cationes bajo el estrés salino en donde se mostró diferente capacidad para acumular glicerol y trehalosa. Con ello se corroboró que la trehalosa actúa como protectora de membrana (García et al., 1997). Asimismo, Hounsa et al. (1998) utilizó la cepa silvestre de *S. cerevisiae* y comparó la maquinaria transcripcional con cepas modificadas para concluir con el rol de la trehalosa como metabolito osmoprotector.

De la misma forma, en un estudio comparativo de especies de levaduras de basidiomicetos se ha observado la aparición de polioles como el arabitol y el manitol a manera de osmolitos que desempeñan un papel importante en la regulación de la presión osmótica (Tekolo et al., 2010). Se sugiere que con la adición de diferentes compuestos (catequina, inositol, SO₂) tolerados por las levaduras en los medios de fermentación hay un cambio en los niveles de acumulación y rendimiento de metabolitos importantes con variación en cuanto a su presencia, mejorándolos o disminuyéndolos (Caridi, 2003).

Tabla 1. Rango de condiciones estresantes para diferentes cepas de *S. cerevisiae* y sus respuestas metabólicas

Tipo de estrés	Rangos de las condiciones estresantes (en el medio de crecimiento sólido/líquido)	Respuestas metabólicas	Referencia
Tolerancia al estrés por temperatura	Choque térmico a 41 °C	Sobreexpresión de HSP104	Holubárová et al. (2000)
	Choque térmico a 37 °C	Expresión de HSP12 y HSP104	Carrasco et al. (2001)
	Choques térmicos a 51 °C	Incremento de proteínas HSP104 y HSP26	Garay Arroyo et al. (2004) Gibson et al. (2007)
Tolerancia al estrés osmótico	NaCl y KCl (1 M), LiCl (0.2 M) y sorbitol (1.5 M)	Menor síntesis de glicerol y acumulación de trehalosa	García et al. (1997)
	Actividad de agua (a_w) de 0.98 y 0.97 con NaCl (0.61 y 0.91 Molal)	Acumulación de trehalosa	Hounsa et al. (1998)
	Se ajustó la a_w a 0.975, 0.95, 0.925, 0.90 y 0.875 con NaCl y sorbitol	Activación del transporte de membrana, acumulación de polioles como el glicerol	Tekolo et al. (2010)
	Glucosa al 2% y 20% (p/v)	Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPD2)	Jiménez Martí et al. (2011)
	Sorbitol 1M	Glicerol 3- fosfato deshidrogenasa (GDP1 y GDP2)	Kaino y Takagi (2008)
	KCl 0.7 M y 1 M	Viabilidad desde 10% hasta 40%	Zuzuarregui y del Olmo (2004)
	NaCl a 40 g/l	Disminución de la conversión de glucosa en etanol hasta 80-90%	Modig et al. (2007)
Tolerancia al estrés por etanol	Etanol de 0 a 8.73% v/v y evaluaciones por calorimetría	Cálculo del límite de resistencia de hasta 18% de etanol en algunas cepas	Antoce et al. (2011)
	Etanol en valores de 46.6, 34.4 y 24.1 g/l	Rendimientos de 0.47, 0.38 y 0.41 g de etanol/g consumido de glucosa	Benjaphokee et al. (2012)
	Adición de CaCl ₂ (0-3 mM), MgCl ₂ (0-2 mM) y etanol a 10%	Mayor tasa de crecimiento hasta de 0.44 con CaCl ₂	Ciesarova et al. (1996)
Tolerancia al estrés oxidativo	Peróxido de hidrógeno 10 mM	Expresión de los genes CTT1 y SOD1	Garay Arroyo et al. (2004)
	Peróxido de hidrógeno a 2.0 y 6.0 mM durante 2 h a 28 °C	Expresión de los genes CTT1 y SOD1	Zhao et al. (2014)

Investigaciones como la de Jiménez et al. (2011), con enfoques de transcriptómica y determinaciones de glicerol intracelular en cepas de *S. cerevisiae* utilizadas para la producción de vino, han dado pistas sobre la adaptación de cepas de levadura con este propósito en alto estrés osmótico, basado en la adaptación a los medios de crecimiento. En otros trabajos que involucran pruebas de tolerancia a dicho tipo de estrés, se observó una alta capacidad (50 y 80% de viabilidad) en dos cepas industriales de *S. cerevisiae* dentro de un grupo de cepas de laboratorio e industriales, en el cual se relaciona esta viabilidad a la síntesis de glicerol (análisis por Northern blot) (Garay Arroyo et al., 2004); se mostraron resultados similares en la producción de glicerol bajo el estrés osmótico con sorbitol en

la cepa de laboratorio *S. cerevisiae*, también se observó la síntesis de trehalosa a menor producción (Kaino y Takagi, 2008).

El estrés hiperosmótico relacionado con la presencia de sales presentes en el medio fue estudiado por Modig et al. (2007) mediante cepas de *S. cerevisiae* industriales y de laboratorio, se observó que el tiempo en la conversión la glucosa disminuye entre 80 y 90% en presencia de la condición estresante; además, aumentó el rendimiento de glicerol pero una productividad reducida en la biomasa en todas las cepas utilizadas. En contraste, cepas de Garay Arroyo et al. (2004) no mostraron diferencia en el comportamiento a este tipo de estrés.

Tolerancia al estrés por etanol

El alcohol etílico es el principal producto metabólico de las levaduras en la fermentación y es cuantitativamente el principal producto biotecnológico a escala global. Un dilema a confrontar en la tecnología de las levaduras es la acumulación del etanol durante la fermentación que actúa como estrés químico potente hacia las células de levaduras. Los principales efectos del etanol afectan la viabilidad de la célula y su crecimiento, en la biosíntesis de macromolécula y en la estructura de la membrana y su función. La identificación y caracterización de cepas de levaduras ha causado gran interés para ser utilizadas en la producción de vinos de calidad. En el trabajo de Antoce et al. (2011) se probaron 10 diferentes cepas de *Saccharomyces* seleccionadas de viñedos rumanos, en las cuales se observó mediante calorimetría y cálculo de concentración mínima inhibitoria del etanol un rango variable de resistencia, aun dentro de la colección utilizada industrialmente para la producción de vino.

Otras cepas de *S. cerevisiae* han sido modificadas genéticamente para tolerar etanol en medio ácido a temperaturas elevadas (39 y 41 °C), lo cual sugiere su potencial uso en la producción de bioetanol, debido a la fermentación a altas temperaturas (Benjaphokee et al., 2012). Ya que las levaduras difieren en la capacidad de tolerar etanol, como algunas mencionadas anteriormente, se ha observado que algunas cepas se benefician con la

presencia de sales para tener un rendimiento alto de etanol; por ejemplo, en el trabajo de Ciesarova et al. (1996) se compararon tres cepas de *S. cerevisiae*, donde se añadieron cantidades de CaCl_2 y MgCl_2 , los cuales permitían una mejor eficiencia en la producción de etanol en la adición de ambas sales, cuantificado por la producción de CO_2 .

Tolerancia al estrés oxidativo

Uno de los principales tipos de estrés químico a los que se enfrentan las levaduras, particularmente durante el crecimiento aeróbico, es debido a las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en Inglés), como los aniones de superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrogeno y el radical hidroxilo (OH^\bullet) con su estructura celular, ya que estos compuestos se pueden generar por la respiración mitocondrial, por incremento de la tensión del oxígeno disuelto del medio de crecimiento o por exposición de radiación iónica. Aunado a esto, la apoptosis celular también genera estos ROS (Perrone et al., 2008). Estos causan el daño oxidativo a proteínas, lípidos y al DNA (Moradas Ferreira et al., 1996).

Las levaduras poseen varios compuestos antioxidantes como el ácido D-eritroascórbico, la flavohemoglobina, el glutatión, las metalotioneínas, poliaminas, el ubiquinol, la trehalosa y ergosterol, además de algunos metabolitos carotenoides; además las levaduras poseen enzimas que detoxifican el oxígeno activo, tales como la Cu/Zn superóxido dismutasa, Mn superóxido dismutasa, catalasa A, catalasa T, citocromo C, peroxidasa, glutatión reductasa, tioredoxina, tioredoxina peroxidasa y tioredoxina reductasa (Jamieson, 1998; Gibson et al., 2007; Herrero et al., 2008; Kaino y Takagi, 2008).

En el trabajo de Garay Arroyo et al. (2004) se observó la expresión de los genes CTT1 y SOD1, inducidos precisamente por el estrés osmótico, y Zhao et al. (2014) obtuvieron resultados similares. En otras levaduras, como las estudiadas por Arellano Plaza et al. (2013), se observó que *Kluyveromyces marxianus* mantuvo una capacidad para resistir al estrés oxidativo causado por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en valores de 10, 50 y hasta 100 mM, mayores a los observados generalmente para *S. cerevisiae*.

Otros factores de estrés: compuestos azufrados y fenólicos

Además de la tolerancia a los diferentes tipos de estrés ya mencionados, cabe señalar a compuestos de

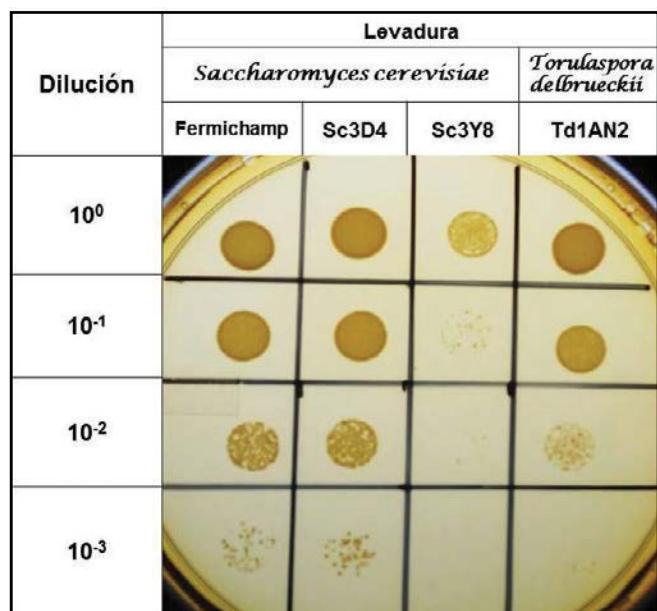


Figura 2. Efecto del peróxido de hidrógeno (15 mM) en la viabilidad de levaduras nativas del mezcal (tesis en proceso P. Vital López).

tipo azufrados y fenólicos, ya que durante la producción de bebidas como el vino, las levaduras pasan por factores estresantes con la adición de SO_2 ; además, durante el proceso de fermentación en otros tipos de bebidas, los compuestos fenólicos son primordiales para la eficiencia de este proceso. Cabe señalar que la formación de H_2S en los procesos de fermentación se debe a la degradación de cisteína presente en el medio por una enzima que tiene una actividad de la cisteína desulfhidrasa (Winter et al., 2011).

S. cerevisiae es la responsable de la producción de varios compuestos volátiles en la que durante la fermentación del vino, la reducción asimilativa de sulfato por la levadura (para biosintetizar cisteína y metionina) produce un exceso de iones HS^- , lo que genera la formación de H_2S en el vino (un problema común en bodegas), ya que si no se trata el vino resultante estará contaminado, perderá calidad y abre la posibilidad de que sea rechazado por los consumidores (Swigers y Pretorius, 2007). Otros estudios demuestran la adición de SO_2 en los vinos, que se añade como antioxidante a partir de la fermentación para la lograr el control microbiológico y del mosto mediante la limitación y/o propagación de levaduras y bacterias indeseables (Fiore et al., 2005; Vilela et al., 2013).

Por otro lado, la hidrólisis de materiales lignocelulósicos presentes también en plantas de *Agave* spp. generan una amplia variedad de compuestos inhibidores de microorganismos. Estos compuestos pueden dividirse en tres grupos: ácidos débiles, derivados del furano y compuestos fenólicos; compuestos que limitan la utilización eficiente de los hidrolizados para producción de etanol durante la fermentación (Palmqvist y Hahn Hägerdal, 2000). También se ha observado que varias levaduras pueden me-

tabilizar fenoles, cresoles, alquilfenoles y monoclorofenol, específicamente géneros como *Candida* spp. y *Trichosporon cutaneum* (Walker, 2000).

CONCLUSIONES

Las levaduras utilizadas tanto para la elaboración de bebidas alcohólicas como para la transformación de residuos lignocelulósicos están sujetas a complejos ambientes de crecimiento y expuestas a cambios temporales de la disponibilidad de oxígeno, concentraciones de solutos, pH, fuentes de carbono, temperatura, y concentraciones de etanol; por lo que el estudio puntual de la tolerancia a los diferentes tipos de estrés para cada cepa a utilizar es una necesidad insalvable para poder realizar desarrollos tecnológicos con las mismas.

En los últimos años, además de las técnicas bioquímicas clásicas e insustituibles, las creadas de la genómica y la proteómica han aportado resultados importantes para la explicación de fenómenos de expresión de genes durante los procesos de fermentación, y su aplicación a cada paso hace que aumente el conocimiento de las respuestas tan complejas en las levaduras y sus aplicaciones industriales, lo que abre la posibilidad de mejoras puntuales sobre los genomas de aquellas levaduras con gran potencial industrial, para aumentar sus rendimientos y ampliar sus capacidades metabólicas.

Agradecimientos

Las autoras desean agradecer el apoyo de los proyectos SIP2015-1149 del Instituto Politécnico Nacional y el apoyo económico asociado BEIFI-IPN para P. Vital y al proyecto CONACyT Básica 2013-221289.

LITERATURA CITADA

- ANTOCE, A. et al. Comparative study regarding the ethanol resistance of some yeast strains isolated from Romanian vineyards. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(2): 5981-5988, 2011.
- ARELLANO PLAZA, M. et al. Respiratory capacity of the *Kluyveromyces marxianus* yeast isolated from the mezcäl process during oxidative stress. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 29(7): 1279-1287, 2013.
- BENJAPHOKEE, S. et al. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. *New Biotechnology*, 29(3): 379-386, 2012.
- CARIDI, A. Effect of protectants on the fermentation performance of wine yeasts subjected to osmotic stress. *Food Technology and Biotechnology*, 41(2): 145-148, 2003.
- CARRASCO, P. et al. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology*, 175(6): 450-457, 2001.

- CIESAROVA, Z. et al. Enhancement of yeast ethanol tolerance by calcium and magnesium. *Folia Microbiologica*, 41(6): 485-488, 1996.
 - FIORE, C. et al. Comparison between yeasts from grape and agave musts for traits of technological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6): 1141-1147, 2005.
 - GARAY ARROYO, A. et al. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 734-741, 2004.
 - GARCÍA, M. et al. Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 143(4): 1125-1131, 1997.
 - GIBSON, B. R. et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(5): 535-569, 2007.
 - HERRERO, E. et al. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(11): 1217-1235, 2008.
 - HOLUBÁŘOVÁ, A. et al. A response of yeast cells to heat stress: cell viability and the stability of cytoskeletal structures. *SCRIPTA MEDICA (BRNO)*, 73(6): 381-392, 2000.
 - HOUNSA, C. et al. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*, 144(3): 671-680, 1998.
 - JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16): 1511-1527, 1998.
 - JIMÉNEZ MARTÍ, E. et al. Towards an understanding of the adaptation of wine yeasts to must : relevance of the osmotic stress response. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5): 1551-1561, 2011.
 - KAINO, T. y TAKAGI, H. Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2): 273-283, 2008.
 - MODIG, T. et al. Anaerobic glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae* strains under hyperosmotic stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(2): 289-296, 2007.
 - MORADAS FERREIRA, P. et al. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 19(4): 651-658, 1996.
 - PALMQVIST, E. y HAHN HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1): 25-33, 2000.
 - PERRONE, G. et al. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(7): 1354-1368, 2008.
 - SUN, Z. et al. Differential role of microenvironment in microencapsulation for improved cell tolerance to stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(6): 1419-1427, 2007.
 - SWIGERS, J. H. y PRETORIUS, I. S. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5): 954-960, 2007.
 - TEKOLO, O. et al. The osmotic stress tolerance of basidiomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res.*, 10(4): 482-491, 2010.
 - VILELA, A. et al. Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11): 4991-5000, 2013.
 - WALKER, G. M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd., 2000.
 - ZHAO, H. et al. Improvement of oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through global transcription machinery engineering. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(5): 869-878, 2014.
 - ZUZUARREGUI, A. y DEL OLMO, M. Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(4): 271-280, 2004.
- De páginas electrónicas**
- WINTER, G. et al. Effects of rehydration nutrients on H₂S metabolism and formation of volatile sulfur compounds by the wine yeast VL3. *AMB Express*, 2011. doi: 10.1186/2191-0855-1-36.