

UNIVERSIDAD POLITECNICA

M A D R I D

36

COMPLEMENTOS DE BIOQUIMICA
INDUSTRIAS AGRICOLAS

BIOQUIMICA DE LAS FERMENTACIONES

PROF:
PILAR CARBONERO ZALDUEGUI

36

COMPLEMENTOS DE BIOQUIMICA

INDUSTRIAS AGRICOLAS

BIOQUIMICA DE LAS FERMENTACIONES

PROF:

PILAR CARBONERO ZALDUEGUI

INTRODUCCION

La presente monografía plasma el contenido de la segunda parte de un curso de bioquímica para alumnos de la especialidad de industrias agrícolas, tal como se ha venido enseñando en la E.T.S.I. Agrónomos de Madrid en los últimos cinco años.

Se trata de una recopilación y resumen de los aspectos más importantes de las Fermentaciones microbianas basados en los textos que se citan a continuación:

- STANIER, R.Y., DOUDOROFF, M. y ADELBERG, E.A. General Microbiology. Ed. Macmillan (1971).

- RHODES, A. y FLETCHER, D.L. Principles of Industrial Microbiology. Ed. Pergamon Press (1966).

- SOKATCH, J.R. Bacterial Physiology and Metabolism. Ed. Academic Press (1969).

- CASIDA, L.E. Industrial Microbiology. Ed. John Wiley and sons (1968).

En ningún caso es el propósito de esta monografía el sustituir a la lectura de estos libros, sino el servir de introducción a los mismos.

Pilar Carbonero Zalduegui

C O N T E N I D O

1. FERMENTACIONES DERIVADAS DE LA VIA GLICOLITICA (I)

Introducción: Modalidades básicas del metabolismo energético.

Fermentaciones de hidratos de carbono.

Vía glicolítica de Embden-Meyerhof.

Fermentación homoláctica.

Fermentación alcohólica.

Producción de glicerina.

2. FERMENTACIONES DERIVADAS DE LA VIA GLICOLITICA (II)

El piruvato como metabolito clave.

Fermentación ácida mixta.

Fermentación butanodiol.

Fermentación butírica.

3. FERMENTACIONES NO DERIVADAS DE LA VIA GLICOLITICA

Ruta oxidativa del fosfogluconato.

Fermentación heteroláctica.

Ruta de Entner-Doudoroff: Fermentación alcohólica de Zymomonas lindneri.

Escisión C₂ – C₄: Ruta fermentativa de Bifidobacterium.

4. RUTAS FERMENTATIVAS MIXTAS

Fermentación propiónica.

Fermentación de gluconato por Streptococcus faecalis.

1. FERMENTACIONES DERIVADAS DE LA VIA GLICOLITICA (I)

INTRODUCCION: MODALIDADES BASICAS DEL METABOLISMO ENERGETICO

Existen tres modalidades básicas del metabolismo energético que no son mutuamente excluyentes: fermentación, respiración y fotosíntesis.

La fermentación es el más simple de los tres procesos desde el punto de vista mecanístico, y puede definirse como un proceso metabólico generador de energía en el cual tanto los dadores como los aceptores de electrones son compuestos orgánicos. En la fermentación, el sustrato da lugar a una mezcla de productos finales, unos más oxidados que él y otros más reducidos. Los sustratos fermentables no pueden ser ni muy oxidados ni muy reducidos. Los carbohidratos son por esta razón muy buenos sustratos para los procesos fermentativos, aún cuando las bacterias pueden también fermentar ácidos orgánicos, aminoácidos, piridinas y pirimidinas.

Ya que los sustratos fermentables están al mismo nivel de oxidación que el material celular y al mismo tiempo sirven como principal fuente de carbono para las biosíntesis, los requerimientos de poder reductor son poco importantes. La principal o única contribución de la fermentación es la producción de ATP, por fosforilaciones a nivel de sustrato.

Pasteur, que fué el primero en reconocer la función fisiológica de la fermentación, la denominó "la consecuencia de la vida sin aire". Esta afirmación sigue siendo correcta, ya que todas las fermentaciones pueden tener lugar bajo condiciones anaerobias estrictas. Muchos de los organismos que obtienen energía por fermentación son anaerobios estrictos. Otros sin embargo, son anaerobios facultativos, capaces de crecer en presencia o ausencia de oxígeno; en general, los organismos anaerobios facultativos modifican su tipo de metabolismo energético al ser expuestos al aire: la presencia de oxígeno molecular induce el cambio metabólico de fermentación a respiración. No obstante, un grupo bacteriano anaeróbico facultativo, las bacterias del ácido láctico, constituye una excepción a esta regla; el tipo de metabolismo energético no es modificado en aerobiosis y la fermentación continua incluso en presencia de oxígeno.

La respiración puede definirse como un proceso metabólico productor de energía en el que compuestos orgánicos o inorgánicos reducidos sirven como dadores de electrones y el oxígeno molecular como aceptor final. Esta definición cubre todas las modalidades del metabolismo respiratorio, con la excepción de las llamadas "respiraciones anaerobias", -realizadas por ciertas bacterias, en las que compuestos inorgánicos oxidados (sulfatos, nitratos y carbonatos), sustituyen al oxígeno molecular como aceptor final de electrones.

Una característica distintiva de la mayoría de los procesos respiratorios es la presencia de la cadena respiratoria de transporte de electrones.

El acoplamiento de la oxidación de sustrato a un aceptor de electrones externo, permite una oxidación completa de los sustratos orgánicos a CO_2 . El cambio de energía libre para la oxidación completa de un compuesto orgánico es mucho mayor que para su fermentación. Así, la oxidación de 1 mol de glucosa libera 688 kcal, mientras que la mayoría

de las fermentaciones de este azúcar liberan la décima parte de la energía. Las fosforilaciones a nivel de sustrato, características de las fermentaciones, también se dan en la respiración, pero se genera mucho más ATP como resultado del paso de electrones a través de la cadena respiratoria de transporte, proceso denominado fosforilación oxidativa.

Según que el nivel medio de oxidación de la fuente de carbono sea próximo o no al del material celular, el proceso energético habrá de generar menor o mayor poder reductor, en forma de coenzimas reducidos para los procesos biosintéticos, además de ATP. En el caso extremo de las bacterias quimioautótrofas, en que el sustrato respirable es un compuesto inorgánico reducido, la única fuente de carbono celular es el CO_2 . La generación de piridinnucleótidos reducidos para la asimilación reductora del CO_2 es una función primordial del metabolismo respiratorio de estos organismos.

Muchos microorganismos que respiran son aerobios estrictos. Algunos, sin embargo, son anaerobios facultativos. Las bacterias que llevan a cabo la "respiración anaeróbica" - con sulfato o carbonato como aceptor terminal son anaerobios estrictos; las que utilizan nitrato son facultativas y se ponen a respirar en condiciones aerobias.

En la fotosíntesis, la energía luminosa es transformada en energía química en forma de ATP y de poder reductor, que en este caso es indispensable para reducir al CO_2 hasta el nivel medio de oxidación del material celular. La generación de ATP dependiente de la luz se designa fotofosforilación y tiene lugar asociada al transporte electrónico en las cadenas fotosintéticas.

Muchas bacterias fotosintéticas usan fuentes de carbono distintas del CO_2 , por ejemplo, compuestos orgánicos, y en éstas el requerimiento de poder reductor puede ser muy pequeño.

La generación fotosintética de energía no requiere oxígeno, es decir, es anaeróbica. En cambio se genera oxígeno cuando la fuente de electrones es el agua, como ocurre en las plantas superiores. En este caso los organismos han de ser aerobios en el sentido de que han de tolerar al oxígeno.

La mayoría de las bacterias fotosintéticas que no oxidan al agua, son anaerobias estrictas y las pocas que son facultativas, detienen la fotosíntesis y pasan a respirar en presencia de oxígeno.

FERMENTACIONES DE HIDRATOS DE CARBONO

Las rutas metabólicas seguidas en la degradación fermentativa de los hidratos de carbono, así como los productos finales formados, varían ampliamente en distintos grupos microbianos

Prácticamente cada hidrato de carbono o derivado puede ser utilizado como sus-

trato fermentable por algún microorganismo. La lista incluye polisacáridos tales como almidón, celulosa y quitina, disacáridos como lactosa, maltosa y sacarosa, hexosas como glucosa, fructosa y galactosa, pentosas como arabinosa y xilosa, derivados ácidos como glucónico y glucurónico, y polialcoholes como manitol y glicerol.

La fermentación de la glucosa, un azúcar utilizado por todos los organismos capaces de fermentar cualquier hidrato de carbono, se inicia siempre por una fosforilación a expensas de ATP para formar glucosa-6-fosfato. Este se acaba convirtiendo en ácido pirúvico, siguiendo una entre varias rutas posibles. El ácido pirúvico es el intermediario metabólico central del metabolismo fermentativo de todos los hidratos de carbono. Las reacciones que intervienen entre la fosforilación inicial de la glucosa y la formación de pirúvico son de tal naturaleza que permiten la generación de ATP en exceso sobre el aporte requerido en las fosforilaciones del sustrato. Parte, y a veces todo el rendimiento energético de las fermentaciones es una consecuencia de las reacciones que preceden a la formación de pirúvico. Este es un compuesto más oxidado que la glucosa y su formación va acompañada por una reducción de nucleótidos de piridina. Para que la fermentación alcance su balance final de oxidación-reducción, los piridinnucleótidos reducidos deben ser reoxidados. Esta reoxidación ocurre en las últimas etapas de transformación de pirúvico en los productos finales de la fermentación.

Las rutas metabólicas implicadas en las primeras etapas de la degradación fermentativa de la glucosa son esencialmente dos: la ruta glicolítica de Embden-Meyerhof y la ruta oxidativa de las pentosafosfato de Warburg-Dickens.

VIA GLICOLITICA DE EMBDEN-MEYERHOF

La conversión de glucosa a ácido pirúvico en un gran número de fermentaciones transcurre por una secuencia metabólica denominada glicolisis o vía glicolítica de Embden-Meyerhof (Figura 1).

En las reacciones iniciales se utilizan 2 moles de ATP para formar 1 mol de fructosa-1,6-difosfato. Esta se escinde, por la acción del enzima aldolasa, en dos triosasfosfato, gliceraldehído-3-fosfato y fosfato de dihidroxiacetona, fácilmente interconvertibles. La oxidación de la triosafosfato, acoplada a la reducción de NAD^+ , es acompañada de una esterificación de fosfato inorgánico, para dar, a partir de cada fracción de C_3 , una molécula de ácido-1,3-difosfoglicérico. Las etapas subsiguientes en la conversión de este compuesto en ácido pirúvico permiten la transferencia de ambos grupos fosfato al ADP, de modo que se forman un total de 4 moles de ATP por mol de glucosa. Ya que previamente se habían gastado 2 moles de ATP en las etapas iniciales de activación, el rendimiento en la glicolisis es de 2 moles de ATP por mol de glucosa.

La vía de Embden-Meyerhof es el mecanismo más extendido para la conversión de glucosa en ácido pirúvico, y es utilizado por muchos grupos de bacterias, además de por las levaduras de la fermentación alcohólica (Tabla 1). Los distintos tipos de fermentaciones que aquéllas llevan a cabo reflejan exclusivamente diferencias respecto al metabolismo del ácido pirúvico.

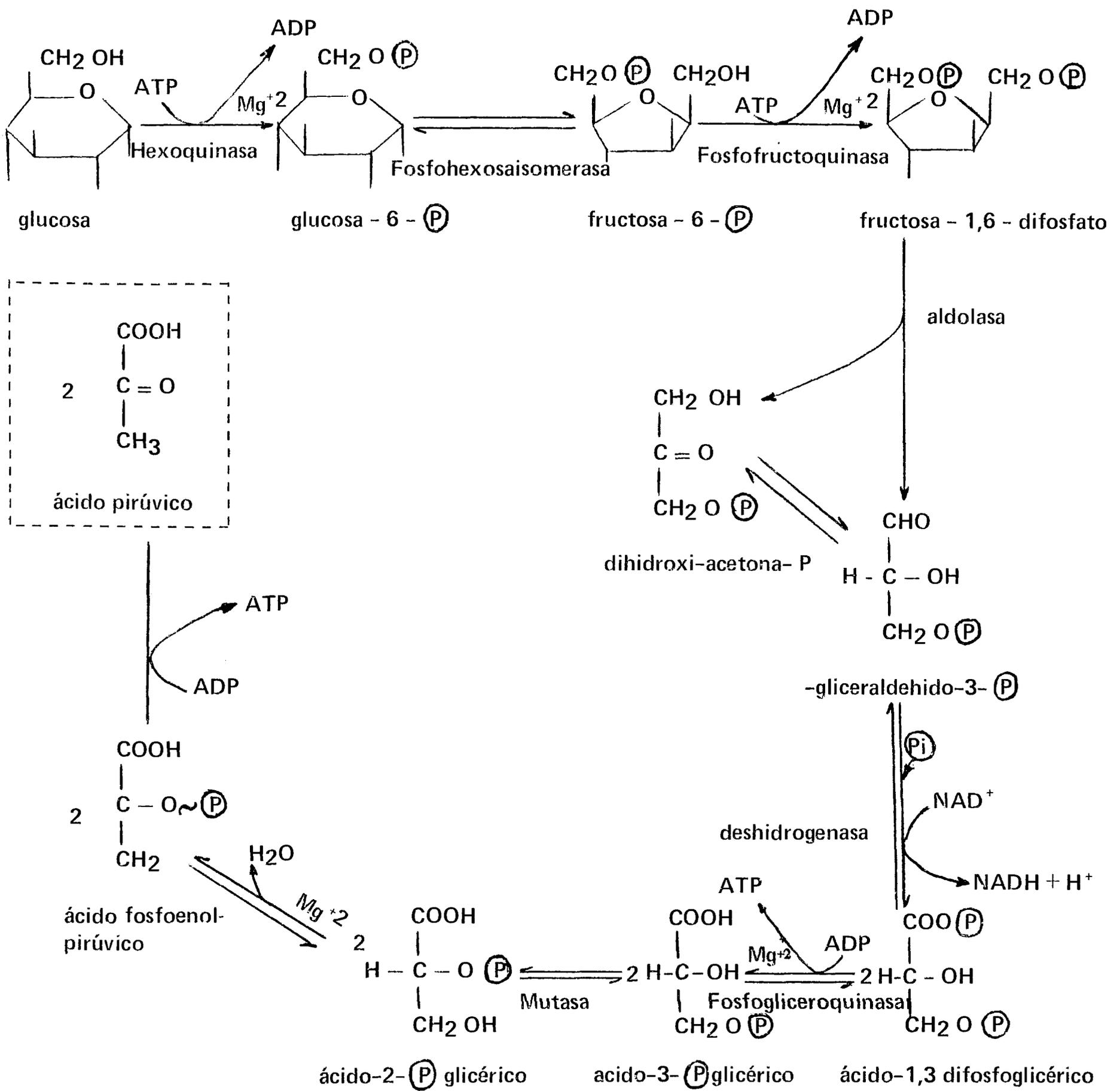


FIGURA 1 Vía glicolítica de Embden-Meyerhof.

T A B L A 1

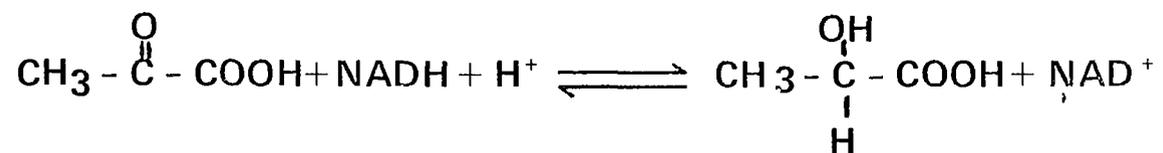
FERMENTACIONES BACTERIANAS DE AZUCARES DERIVADOS DE LA RUTA
DE EMBDEN-MEYERHOF

Tipo de fermentación	Productos principales	Grupos bacterianos
(1) HOMOLACTICA	CH ₃ CHOH COOH (ácido láctico)	Bacterias lácticas de los géneros <u>Streptococcus</u> , <u>Pediococcus</u> y <u>Lactobacillus</u> (algunas especies)
(2) ACIDA-MIXTA	CH ₃ CHOH COOH (ac. láctico) CH ₃ COOH (ac. acético) COOH CH ₂ CH ₂ COOH (ac. Succínico) H COOH (ac. fórmico) ó CO ₂ + H ₂ CH ₃ CH ₂ OH (etanol)	Muchas enterobacteriáceas, p.e. <u>Escherichia</u> , <u>Salmonella</u> , <u>Shigella</u> , <u>Proteus</u> , <u>Yersinia</u> .
(2a) BUTANODIOL	Como en (2) pero además CH ₃ CHOH CHOH CH ₃ (2,3 - butanodiol)	<u>Aerobacter</u> , <u>Serratia</u> , <u>Aeromonas</u> , <u>Bacillus polymyxa</u>
(3) BUTIRICA	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH (ácido butírico) CH ₃ COOH (ac. acético) CO ₂ H ₂	Muchos anaerobios esporulados (<u>Clostridium</u>) y algunos anaerobios no esporulados (<u>Butyribacterium</u>)
(3a) ACETONA-BUTANOL	Como en (3) pero además CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₂ OH (butanol) CH ₃ CH ₂ OH (etanol) CH ₃ CO CH ₃ (acetona) CH ₃ CHOH CH ₃ (isopropanol)	Algunos anaerobios esporulados (<u>Clostridium</u>)
(4) PROPIONICA	CH ₃ CH ₂ COOH (ac. propiónico) CH ₃ COOH (ac. acético) COOH (CH ₂) ₂ COOH (ac. Succínico) CO ₂	<u>Propionibacterium</u> <u>Veillonella</u>

FERMENTACION HOMOLACTICA

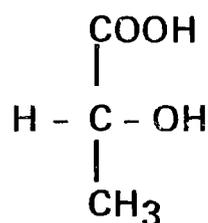
La fermentación homoláctica tiene lugar en tejidos animales, en un grupo de organismos eucarióticos pertenecientes a los hongos y a los protozoos y en varios grupos bacterianos, notablemente en las bacterias lácticas.

La conversión de glucosa a ácido pirúvico en la fermentación homoláctica transcurre, como ya se ha mencionado, por la vía glicolítica de Embden-Meyerhof descrita en la Figura 1. En la fermentación homoláctica el ácido pirúvico, en presencia del enzima lactato-deshidrogenasa, actúa como aceptor de electrones en la reoxidación de NADH, convirtiéndose en ácido láctico.

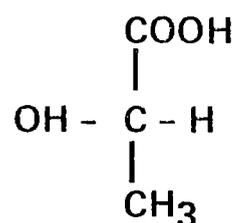


El ácido láctico es totalmente miscible en agua, alcohol y éter, pero insoluble en cloroformo; polimeriza fácilmente. Estas propiedades, le dan una gran importancia en las industrias alimentaria, farmacéutica, textil y química; por ejemplo, se utiliza en la acidificación de salmueras para la conservación de aceitunas, en la acidificación de sopas y jamones, en la neutralización de soluciones de sosa en la industria peletera, en la terminación de las telas de "rayon" y en la conversión a resinas termoplásticas y elásticas en la industria de los plásticos.

El ácido láctico contiene un átomo de carbono asimétrico y puede presentarse en dos formas ópticamente activas:



D (-) -ácido láctico



L (+) -ácido láctico

El isómero producido a partir del pirúvico depende de la naturaleza de la lactato-deshidrogenasa presente en el microorganismo que lleva a cabo la fermentación. Así, las bacterias lácticas homofermentativas y el hongo *Rhizopus oryzae* producen L (+) -ácido láctico, mientras que las bacterias lácticas heterofermentativas (formadoras de ácidos volátiles además de ácido láctico) producen D (-)-ácido láctico. No obstante, frecuentemente, en las fermentaciones bacterianas se obtiene el racemato (mezclas equimolares de D y L láctico), ópticamente inactivo. La racemización del D (-) ó el L (+)-lactato, formado primeramente, se lleva a cabo por la actividad de un enzima, racemasa, producido entre otras por las bacterias lácticas. La racemasa, requiere ácido nicotínico para su acción, y por tanto variando el nivel de este último en el medio de cultivo se puede controlar en parte el tipo de ácido láctico producido.

Este control sólo puede ser parcial pues el ácido nicotínico es un factor de crecimiento para las bacterias lácticas.

Las bacterias lácticas (Familia Lactobacillaceae) son bacterias gram - positivas pertenecientes a los géneros Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc y Lactobacillus; se trata de organismos anaerobios o microaerófilos con requerimientos nutritivos bastante especiales, ya que necesitan para su desarrollo distintas vitaminas del complejo B y ciertos aminoácidos. Las fermentaciones lácticas industriales utilizan fundamentalmente bacterias lácticas homofermentativas (homolácticas) tales como Lactobacillus delbrueckii, L. bulgaricus, L. pentosus, L. casei, L. leichmanii y Streptococcus lactis. El organismo se selecciona según el tipo de carbohidrato que se utilice como sustrato de la fermentación (glucosa, sacarosa o lactosa), que se añade a una concentración de 5 - 20% (peso/volumen).

Un medio típico de fermentación incluye además del azúcar; un 10% de CO_3Ca para tamponar el medio entre pH 5,5 y 6, $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ y pequeñas cantidades de germen - de malta ("malt sprouts") que aportan los factores de crecimiento y las sustancias nitrogenadas necesarias para los microorganismos. Las temperaturas de fermentación son relativamente elevadas: 45 - 50°C para Lactobacillus delbrueckii, L. bulgaricus y 30°C para Streptococcus lactis, Lactobacillus pentosus y L. casei.

La fermentación se lleva a cabo en tanques de madera o de acero inoxidable; debido a la naturaleza corrosiva del ácido láctico no se pueden utilizar aleaciones de hierro o cobre.

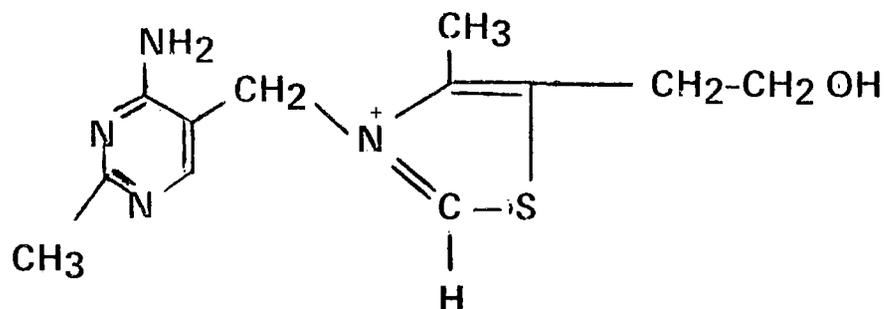
La fermentación dura aproximadamente 6 días, dándose por terminada cuando el azúcar está prácticamente agotado (0,2 %), lo que ocurre al final de 1 a 6 días; el rendimiento es del 90% aproximadamente. No suelen existir problemas serios de contaminación, debido a la ausencia de oxígeno, a la acidez del medio y a las temperaturas relativamente altas de fermentación.

La fermentación industrial de ácido láctico es relativamente cara debido a las dificultades inherentes a su extracción y purificación. En la extracción se suele utilizar éter isopropílico; éste se trata a su vez con agua y a partir del extracto acuoso se obtiene el ácido láctico por cristalización. También, se utiliza el procedimiento de obtención el éster metílico - del ácido láctico que por ser más volátil se separa del caldo de fermentación por destilación; una vez destilado se hidroliza el éster con agua caliente, y a continuación se evapora el agua caliente y el metanol se recupera por destilación.

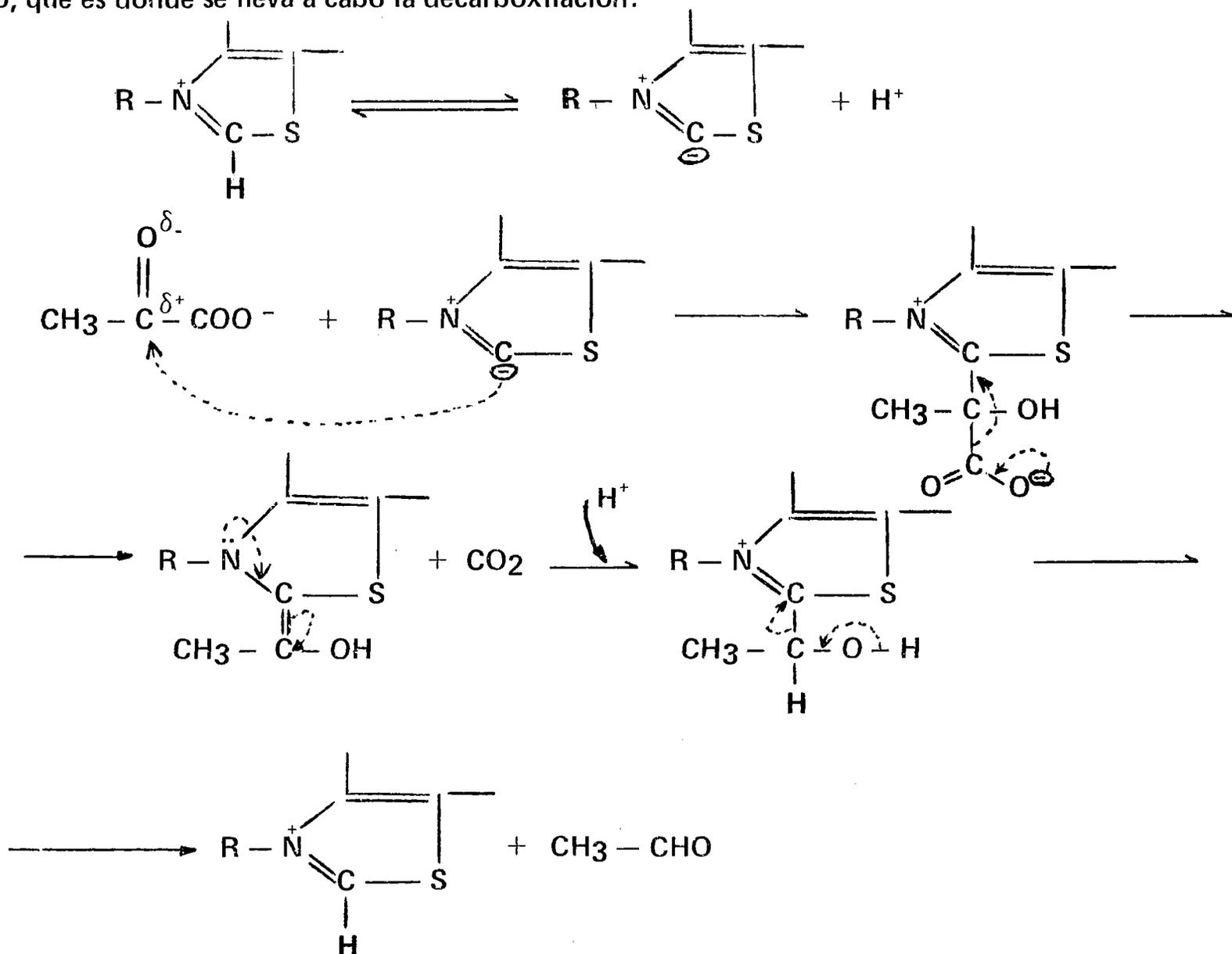
FERMENTACION ALCOHOLICA

La fermentación alcohólica se lleva a cabo en tejidos vegetales, en ciertos hongos y en particular en levaduras. El esquema metabólico seguido es la vía glicolítica de Embden-Meyerhof hasta el ácido pirúvico. A continuación el piruvato se decarboxila no oxidativamente por acción de la decarboxilasa pirúvica, un enzima que requiere tiaminpirofosfato (TPP) y Mg^{2+} , produciendo acetaldehído y CO_2 .

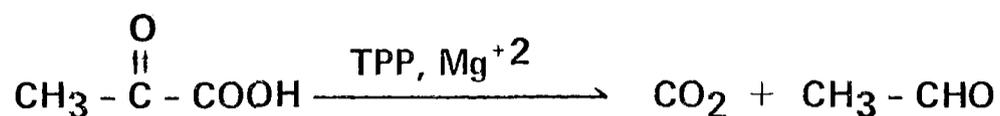
Tiamina (Vit. B₁)



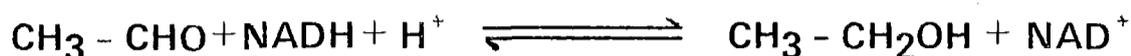
Fijaremos nuestra atención en el carbono 2 del anillo tiazólico del tiaminpirofosfato, que es donde se lleva a cabo la decarboxilación:



La reacción global será:



A continuación el acetaldehído actúa como aceptor de electrones del nicotinamínadeninucleótido reducido, produciéndose etanol y NAD^+ . La reacción es catalizada por la alcohol deshidrogenasa.



En la fermentación alcohólica industrial se utilizan casi exclusivamente levaduras, siendo la especie empleada dependiente del tipo de carbohidrato utilizado como materia prima; así, cepas de Saccharomyces cerevisiae se utilizan en la fermentación de hexosas, Candida pseudotropicalis en la fermentación de lactosa, y Candida utilis en la de pentosas. Los rendimientos de alcohol etílico son con frecuencia superiores al 90% sobre el azúcar consumido, en cepas seleccionadas por su gran tolerancia al alcohol.

El tiempo de fermentación varía entre límites muy amplios, según la temperatura, concentración de azúcar, y cepa fermentadora.

La producción de etanol es básicamente similar en las etapas de desarrollo del inóculo a la producción de levadura - pienso, pero el producto final depende de que opere o no el mecanismo de control metabólico conocido como "efecto Pasteur". Así, el piruvato se decarboxila oxidativamente dando acetilcoenzima A y entrando en el ciclo de Krebs, si existe aireación en condiciones de crecimiento óptimo de la levadura y se decarboxila no oxidativamente a acetaldehído, que se reduce a continuación a etanol, en condiciones de anaerobiosis y altas concentraciones iniciales de azúcar (10 - 19 % p/v) y fosfato.

La producción industrial de alcohol se realizó totalmente por el proceso fermentativo hasta 1930, utilizando melazas de diversos tipos como materia prima. El encarecimiento de estas materias primas y el desarrollo rápido de la producción de etanol por síntesis química hacen en la actualidad poco económico el proceso fermentativo. De todas formas el alcohol industrial seguirá obteniéndose a menor escala como producto final de procesos fermentativos diseñados para reducir la demanda biológica de oxígeno (B.O.D.) de las aguas residuales de ciertas industrias tales como las de quesería (suero) y las de pulpa de papel (aguas sulfatadas). La gran cantidad de CO_2 producido en la fermentación alcohólica, durante la decarboxilación de piruvato, a veces se recupera y convierte en CO_2 sólido u otros subproductos.

Las bebidas alcohólicas fermentativas tuvieron su origen en procesos fermentativos espontáneos y se produjeron de un modo empírico por el hombre desde la antigüedad. Solamente en tiempos recientes, los métodos modernos de la microbiología industrial han sido aplicados a su producción. Al contrario de la producción industrial de alcohol, la producción de vinos y cervezas, no sufre la competencia de los productos sintéticos debido a que el "carácter" de cada bebida depende de la interacción entre una serie de factores biológicos no bien definidos en términos físicos o químicos.

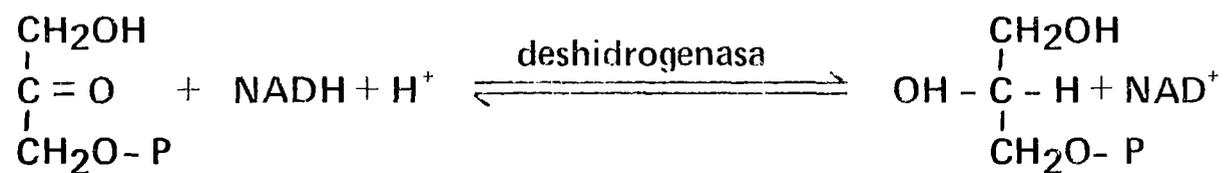
PRODUCCION DE GLICERINA

La producción de glicerina por fermentación, para la fabricación de explosivos tuvo un gran auge en Alemania durante la Primera Guerra Mundial. Actualmente la producción fermentativa del glicerol no puede competir económicamente con el producido en la saponificación alcalina de las grasas.

Ya se ha visto cómo la degradación glicolítica de azúcares exige algún mecanismo para la reoxidación continua del $\text{NADH} + \text{H}^+$ producido. En condiciones aeróbicas la reoxidación se lleva a cabo a través de la cadena respiratoria de enzimas. En anaerobiosis, los aceptores de hidrógeno son muy variables, siendo un ejemplo el acetaldehído de la fermentación alcohólica que al aceptar electrones y protones pasa a etanol.

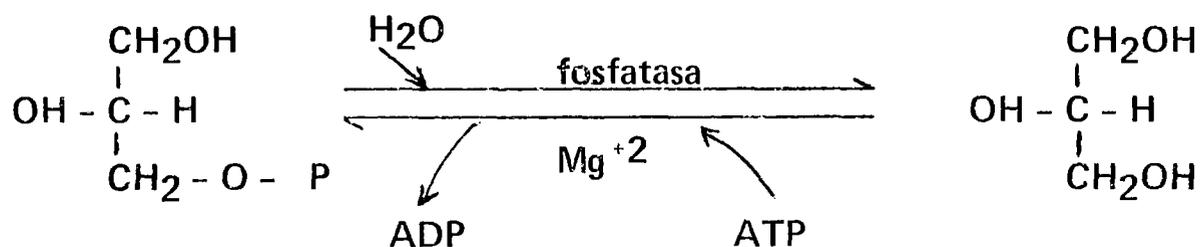
La producción de glicerina por fermentación se basa en modificar el curso normal de la fermentación alcohólica, eliminando el acetaldehído (que es tóxico para la levadura), conforme se va produciendo. Esto se realiza bien añadiendo bisulfito sódico, que forma un compuesto de adición con acetaldehído, o bien induciendo una reacción de Cannizzaro (una molécula se oxida a acético y otra se reduce a etanol) en condiciones alcalinas.

En cualquiera de las dos circunstancias, el acetaldehído ya no está disponible para reoxidar al $\text{NADH} + \text{H}^+$ y en su lugar actúa la dihidroxiacetonafofato producida en la glicolisis.



El producto es el L - 3 - glicerolfosfato (sn 3 - glicerolfosfato) y no el isómero D (sn 1 - glicerolfosfato) que sería producido si hubiera sido el D - gliceraldehído - 3 - fosfato el reducido.

A continuación el sn glicerol - 3 - fosfato por intermedio de una fosfatasa da glicerol. El proceso inverso está catalizado por una quinasa y consume un mol de ATP.



La producción de glicerol no genera ATP, por tanto la célula no puede metabolizar toda la glucosa por esta vía.

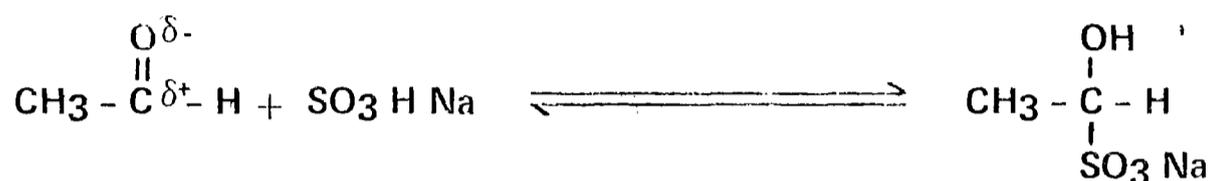
Pasteur observó ya durante el curso de sus trabajos sobre la fermentación alcohólica que las levaduras producían habitualmente entre un 2 y un 3% de glicerina. Neuberger, a finales del siglo XIX, demostró que la presencia de sulfito sódico en el medio de cultivo de -

Saccharomyces cerevisiae aumentaba enormemente la producción de glicerina en detrimento de la de etanol.

El proceso del sulfito. A un medio que contenga sacarosa 10 - 20% (p/v), NH_4NO_3 0,5%, K_2HPO_4 0,075%, Na_2SO_3 4% y trazas de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, se añade un 1% (p/v) de levadura prensada como inóculo. La fermentación se lleva a cabo en grandes fermentadores a 30°C durante 49 - 60 horas. El CO_2 resultante de la decarboxilación de piruvato reacciona con el sulfito, dando bisulfito:



El bisulfito fija acetaldehído dando un compuesto de adición:



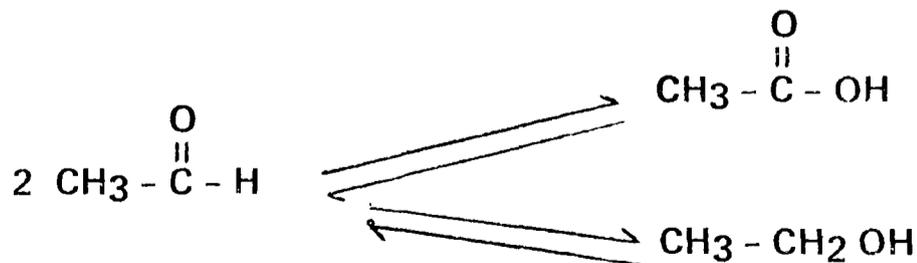
El mismo efecto se logra con cualquier otro reactivo específico de la función aldehído tal como hidrazidas o semicarbamidas.

El proceso del sulfito produce un caldo con una gran concentración de iones inorgánicos, lo que entorpece la extracción del glicerol. Por ello, Fulmer propuso la sustitución del sulfito sódico por sulfito amónico, tomando al mismo tiempo precauciones para que el pH del caldo se mantenga en 6,8. El NH_4^+ se elimina fácilmente por calentamiento y los aniones se precipitan con calcio.

Cuando el azúcar se consume, el caldo queda listo para la obtención de la glicerina. En primer lugar, se clarifica y destila para eliminar el alcohol, acetaldehído y cualquier NH_3 gas; a continuación, se concentra y enfría para cristalizar el sulfito sódico.

Los líquidos de fermentación no suelen contener más del 4% (p/v) de glicerina, pero el concentrado crudo, antes de la eliminación de sulfito, puede contener hasta un 18%.

El proceso alcalino es similar al descrito anteriormente, pero el mantenimiento de un pH alcalino, añadiendo carbonato sódico sólido, a intervalos durante las primeras 24 horas, (en una cantidad total de aproximadamente un 3,5 peso/volumen), asegura la eliminación del acetaldehído debido a una reacción de Cannizzaro.



El pH alcalino hace necesaria la utilización de cepas seleccionadas de levadura capaces de degradar carbohidrato en estas condiciones adversas.

Por este procedimiento se han llegado a obtener rendimientos en glicerina de hasta un 25% sobre el azúcar fermentado, pero subsiste el problema de una recuperación eficiente de la misma.

En la actualidad se está tratando de buscar, para obtener glicerina, mutantes de Saccharomyces cerevisiae deficientes en alcoholdehidrogenasa. También se están utilizando cada vez más levaduras osmófilas, que son excelentes productoras de glicerol y en general de otros polioles. Estas dos circunstancias abren nuevos horizontes a la producción de glicerina por fermentación.

2. FERMENTACIONES DERIVADAS DE LA VIA GLICOLITICA (II)

EL PIRUVATO COMO METABOLITO CLAVE

Ya se ha descrito en el capítulo anterior la degradación glicolítica de los azúcares hasta llegar a piruvato. Este es un compuesto clave en el metabolismo de los microorganismos y su transformación subsiguiente dependerá del organismo y de las condiciones ambientales. La oxidación completa de piruvato a CO_2 y H_2O por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos de Krebs, que solo es operativo en condiciones aerobias, requiere una decarboxilación oxidativa irreversible del piruvato para dar CO_2 y acetilcoenzima A. Cuando el oxígeno es deficiente temporalmente o en condiciones anaerobias, suelen utilizarse vías alternativas para el metabolismo del piruvato, o del "acetaldehído activo" (α - hidroxietil - TPP).

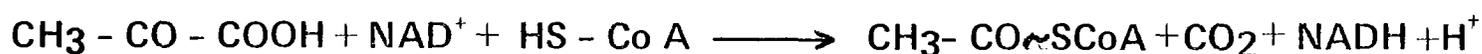
El mecanismo de la decarboxilación oxidativa del ácido pirúvico se resume en la Figura 1 y es aplicable en general a la decarboxilación oxidativa de los α -cetoácidos.

Una carboxilasa, enzima que requiere tiaminpirofosfato, TPP (el pirofosfato de la vitamina B₁) y Mg^{2+} , cataliza la decarboxilación preliminar. Se forma CO_2 y un complejo de acetaldehído y TPP, el α - hidroxietil - 2 - tiaminpirofosfato ("acetaldehído activo").

La formación de este último complejo puede realizarse gracias a que el protón - del C - 2 del anillo tiazólico del TPP es fácilmente dissociable a pH neutro, formándose un carbanión que reacciona con el grupo α - carbonilo del pirúvico.

El α - hidroxietil - TPP se deshidrogena a continuación, regenerándose TPP y formando un residuo de acetilo. El ácido α -lipoico es un factor necesario, que funciona como aceptor de hidrogeno y como portador del residuo acetilo, reteniendo al mismo tiempo la energía libre de la oxidación del aldehído a ácido, en un enlace tioéster rico en energía.

El residuo acetilo y la energía de enlace asociada a él se transfieren al coenzima A, por la lipoico transacetilasa, dando acetilcoenzima A ("acetato activo"), y ácido 6,8 - dimer-capto - octanoico (ácido tióctico ó forma reducida del ácido α - lipoico). El ácido α - lipoico se regenera, por deshidrogenación del ácido tióctico por un enzima flavoproteico con flavinadeninucleótido (FAD) como grupo prostético, lipoico deshidrogenasa (NADH : lipoamida oxidoreductasa). El potencial redox de este enzima es mucho más negativo de lo que cabría esperar de su naturaleza flavoproteica y puede por tanto ser reoxidado por la forma oxidada - del nicotinaminadeninucleótido (NAD^+). Finalmente la forma reducida de este último - ($\text{NADH} + \text{H}^+$) se reoxida por la cadena normal respiratoria de enzimas. La reacción global de la decarboxilación oxidativa del ácido pirúvico será:



Como puede verse la operación continuada del sistema depende de los enzimas de

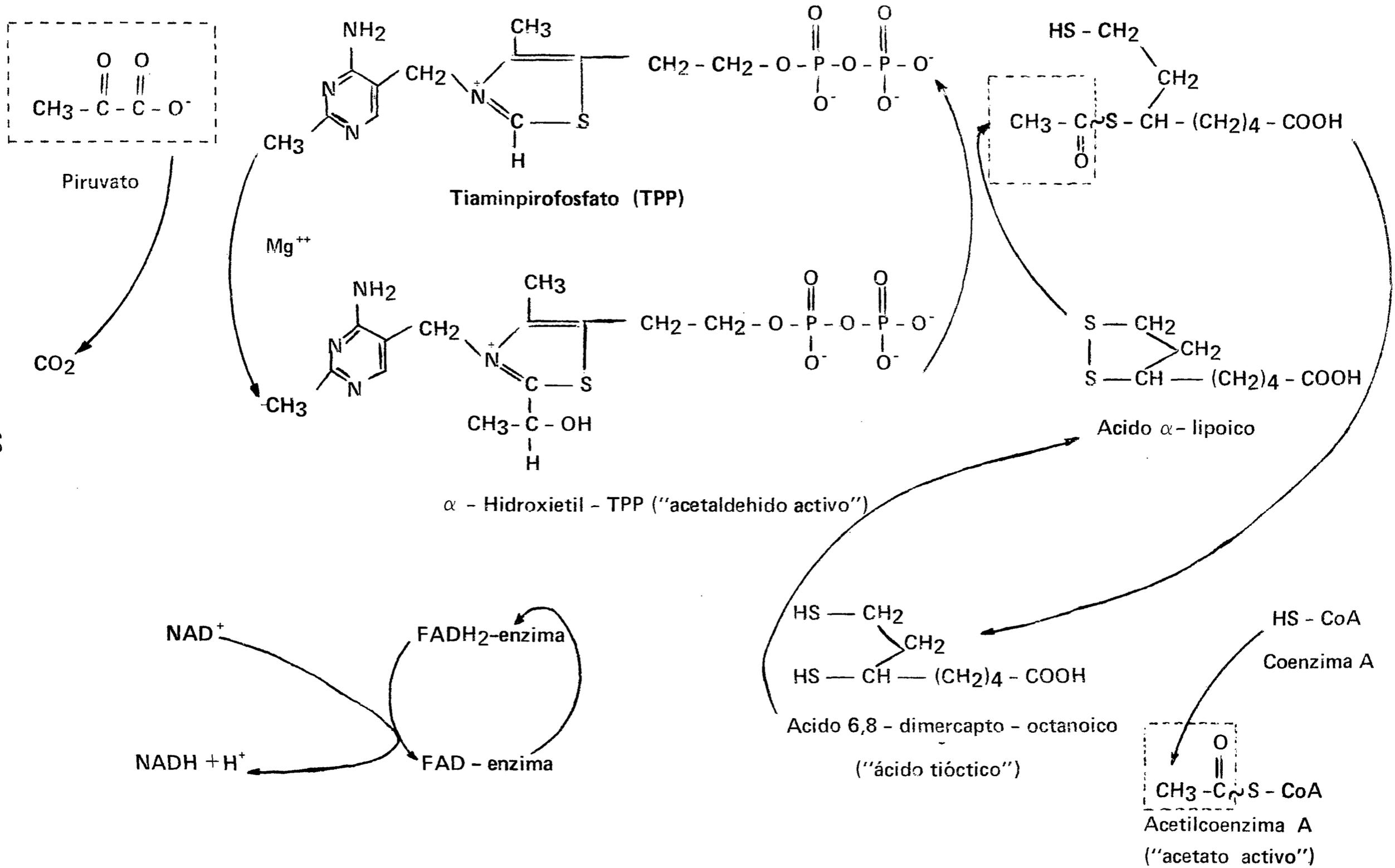


FIGURA 1. Decarboxilación oxidativa de piruvato.

la cadena respiratoria que reoxidan el $\text{NADH} + \text{H}^+$ formado en cada ciclo. Estos enzimas funcionan normalmente en condiciones aerobias y transfieren en último término dos átomos de hidrógeno al oxígeno molecular.

En anaerobiosis alternativas el piruvato, metabolito clave, puede sufrir una serie de reacciones, la mayoría de las cuales requieren tiaminpirofosfato (TPP). La primera etapa consiste en la reacción de piruvato con el TPP unido al enzima para dar lactil - TPP. La segunda etapa es la decarboxilación de piruvato resultando hidroxietil - TPP ("acetaldehído activo") más CO_2 . El destino de los fragmentos de los carbonos unidos a la tiamina depende del sistema enzimático empleado; por ejemplo, en la carboxilasa de levadura (2 - oxoácido : carboxilasa) el hidroxietil - TPP se disocia produciendo acetaldehído y tiaminpirofosfato. La carboxilasa también forma pequeñas cantidades de acetoina (2 - oxo - 3 - hidroxil - butano) que puede explicarse por la condensación de otro mol de acetaldehído con hidroxietiltiaminpirofosfato.

La formación bacteriana de acetoina transcurre por otra ruta distinta que implica dos enzimas separados. La primera etapa es la condensación de un mol de piruvato con hidroxietil - TPP con formación de ácido α -acetoláctico y CO_2 por un enzima que contiene tiamina, la α -acetolactato sintetasa. La segunda etapa catalizada por la acetolactato decarboxilasa (2 - acetolactato : carboxilasa), enzima que requiere manganeso, produce CO_2 y acetoina que a su vez se reduce a 2,3 - butanodiol por un enzima deshidrogenasa con NADH como grupo prostético (2,3 - butanodiol : NAD oxidoreductasa).

La reacción fosforoclástica es una descomposición de piruvato a acetilfosfato y ácido fórmico (bacterias coliformes) ó a acetilfosfato y CO_2 más H_2 en los Clostridia. Ambos sistemas requieren tiaminpirofosfato, coenzima A y fosfato y el sistema de los Clostridia requiere también ferredoxina; que actúa como transportador de electrones. No es muy correcto denominar a esta reacción fosforoclástica ya que el producto inicial de la descomposición de piruvato es el acetilcoenzima A y el acetilfosfato surge por una reacción secundaria catalizada por la fosfotransacetilasa. En la Figura 2, aparecen resumidas algunas de las más conocidas rutas fermentativas bacterianas derivadas del ácido pirúvico.

FERMENTACION ACIDA MIXTA

Muchas bacterias anaerobias facultativas de géneros Escherichia, Salmonella, Shigella, Proteus, Yersinia y Vibrio llevan a cabo una fermentación denominada ácida mixta (Figura 3).

En el caso de Escherichia coli, la reacción global puede ser formulada como sigue:



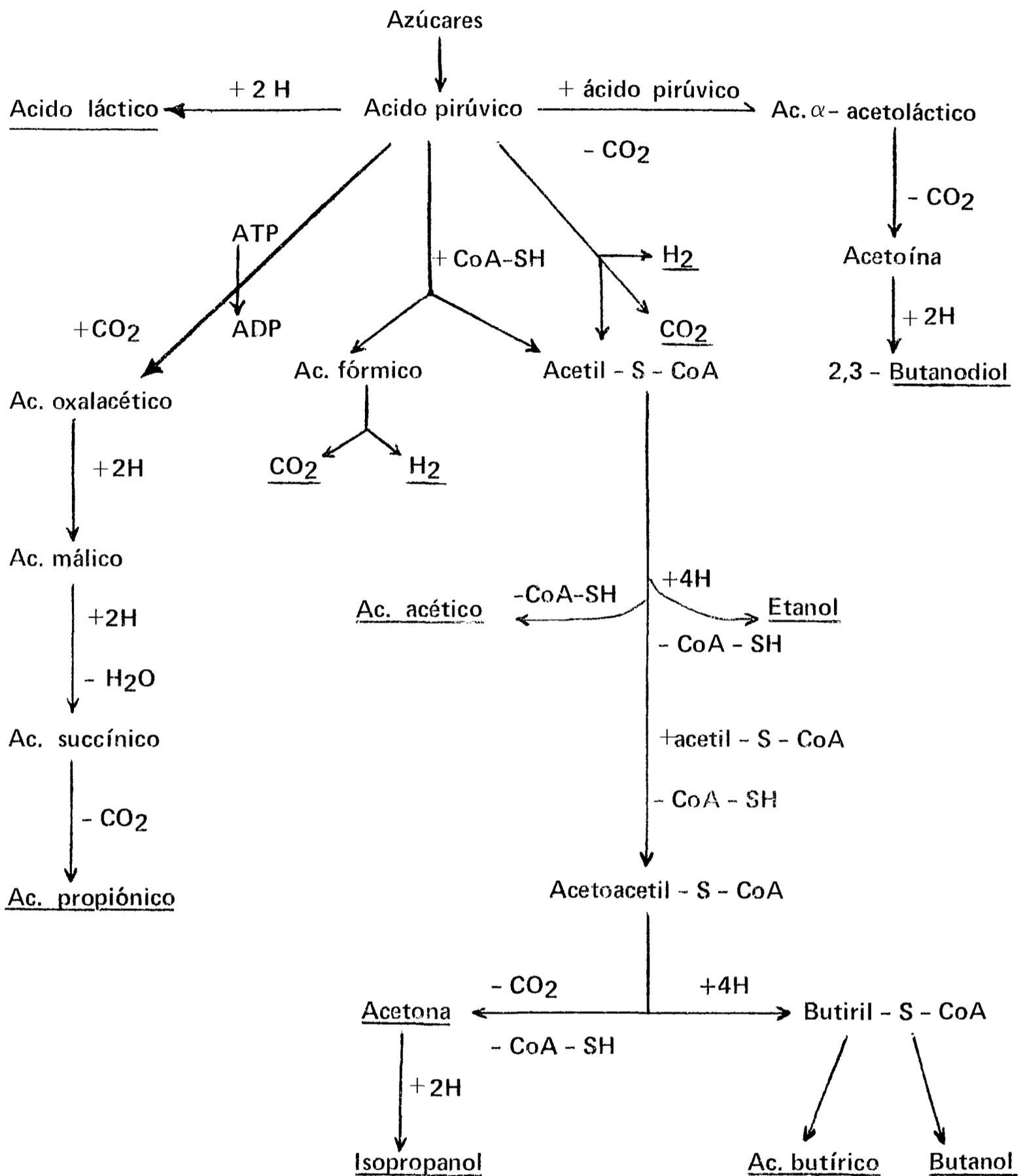


FIGURA 2. Fermentaciones bacterianas derivadas del ácido pirúvico. Los productos finales están subrayados.

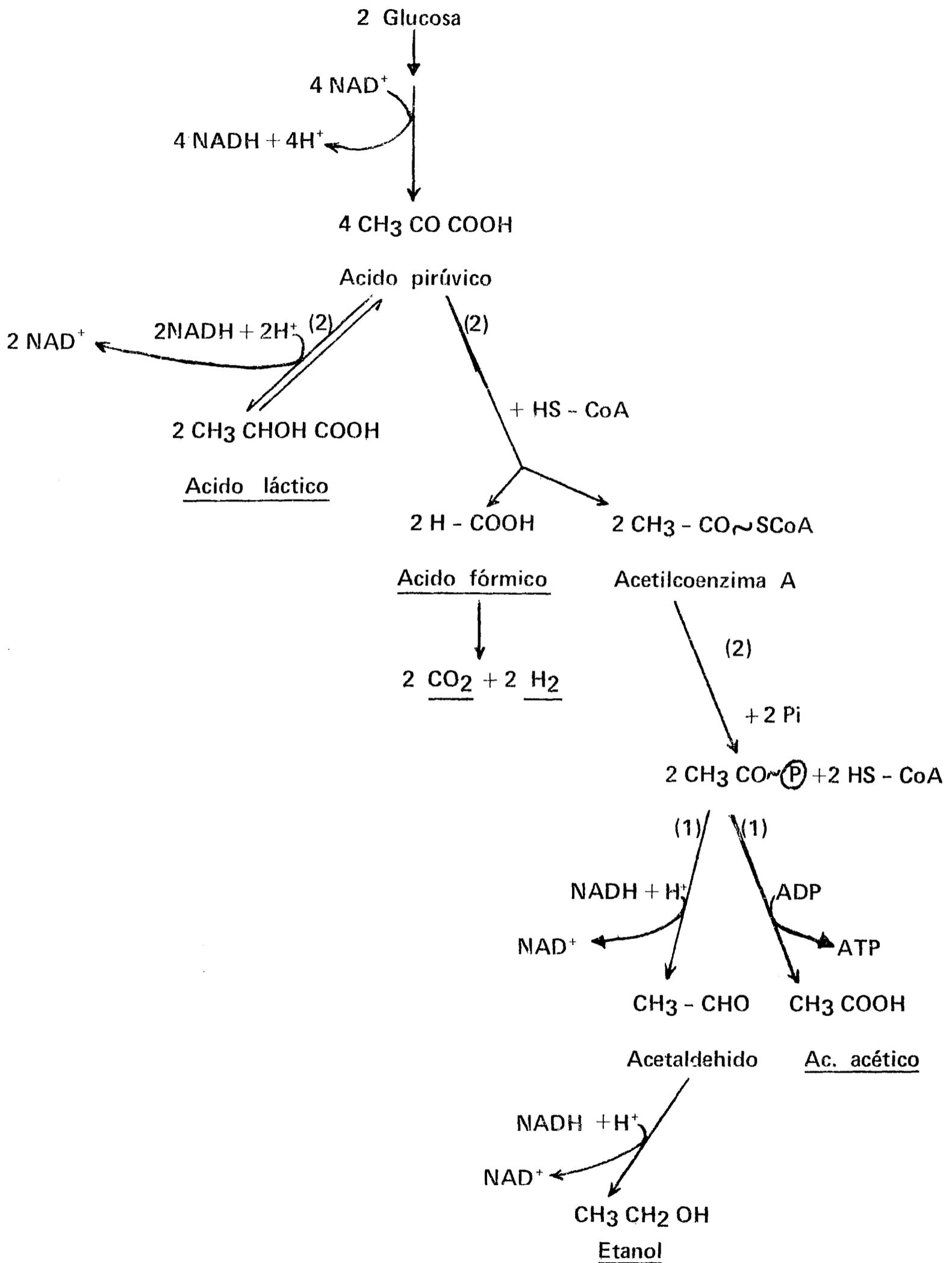
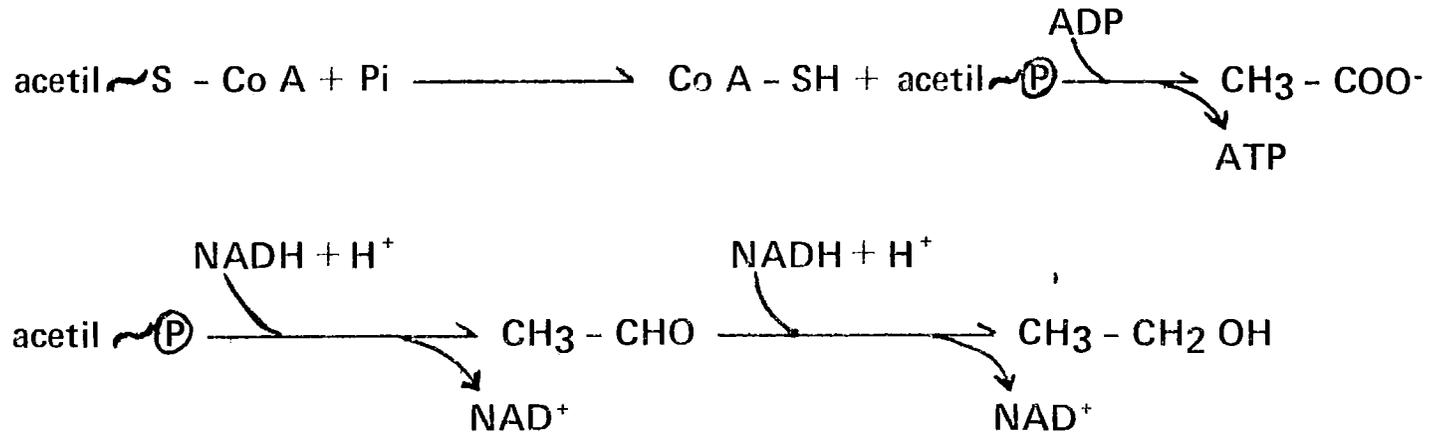


FIGURA 3. Fermentación ácida mixta. Los productos finales aparecen subrayados.

En Shigella no se forma CO_2 y H_2 , sino que aparece una cantidad equivalente de ácido fórmico (HCOOH).

Una característica de esta fermentación es una escisión de pirúvico, en la que está implicado el coenzima A, que produce acetilcoenzima A y formiato. El acetilcoenzima A se convierte en acetilfosfato, la mitad del cual se cetiliza en la síntesis de ATP y la otra mitad se reduce a etanol.



En organismos como Escherichia coli el ácido fórmico producido por escisión del piruvato se convierte en CO_2 y H_2 ; en bacterias que no poseen la fórmicohidrogenilasa, el ácido fórmico es un producto final.

La conversión de glucosa a ácido acético, etanol y formiato (ó CO_2 y H_2) es una reacción equilibrada, de modo que en teoría estos tres productos podrían ser los únicos productos finales, Sin embargo, todos los microorganismos que realizan este tipo de fermentación, son capaces de reducir pirúvico a ácido láctico. La relación molar de ácido láctico a los otros productos finales puede variar considerablemente, según las condiciones de cultivo, y con frecuencia, también se produce una pequeña cantidad de ácido succínico. En consecuencia, las relaciones cuantitativas entre los productos finales de la fermentación ácida-mixta no son fijas como ocurre en las fermentaciones homoláctica y alcohólica.

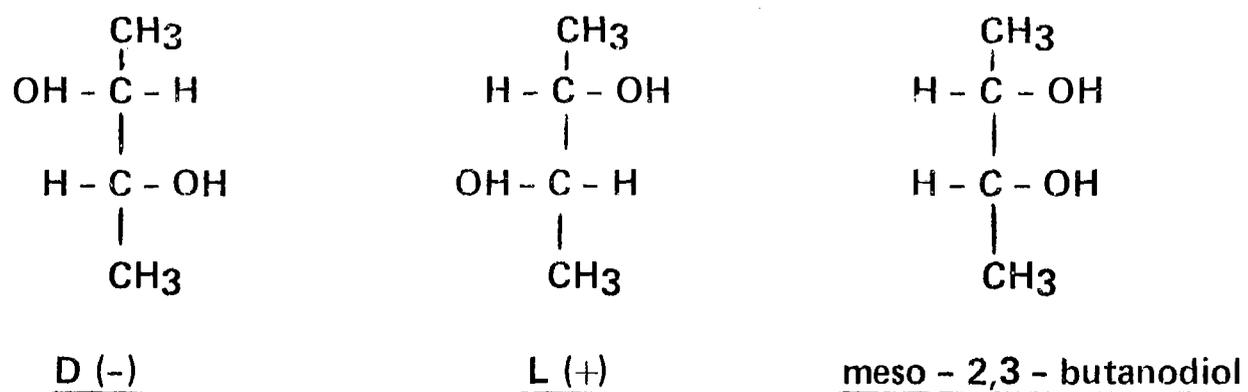
FERMENTACION BUTANODIOL

Intimamente relacionada con la fermentación ácida-mixta está la fermentación butanodiol, llevada a cabo por bacterias anaerobias facultativas de los géneros Aerobacter, Serratia, Erwinia y ciertas especies de Bacillus y Aeromonas. Además de los productos típicos de la fermentación ácida-mixta se forma butanodiol ($\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CHOH} - \text{CH}_3$) a partir de piruvato.

La fabricación del caucho sintético requiere 1,3 - butadieno ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH} = \text{CH}_2$), que se obtiene químicamente a partir del 2,3 - butanodiol.

La obtención del 2,3 - butanodiol por fermentación se investigó intensamente durante la Segunda Guerra Mundial cuando la industria del caucho sintético estaba en su infancia. Sin embargo, a pesar de obtenerse rendimientos entre el 30 y el 40 % de butanodiol sobre el carbohidrato consumido, el producto fermentativo tiene un gran competidor en el 1,3 - butadieno de fabricación petroquímica.

Del 2,3 - butanodiol (2,3 - butilenglicol) hay tres isómeros: el D(-), el L (+) y la forma meso - inactiva ópticamente.



Existen dos vías biosintéticas principales para la obtención del butanodiol (Figura 4).

En bacterias el "acetaldehído activo" producido en la decarboxilación de piruvato se transfiere a un mol de piruvato obteniéndose (+) - α - acetolactato que sufre una decarboxilación estereoespecífica por el enzima acetolactato decarboxilasa y produce (-) - acetoina (acetilmetilcarbinol).

En levaduras, el "acetaldehído activo" se transfiere a acetaldehído dando directamente (-) - acetoina. La (-) - acetoina formada por cualquiera de estas dos vías se convierte por hidrogenación en 2,3 - butanodiol. La deshidrogenación de (-) - acetoina es igualmente posible, produciéndose en este caso diacetilo ($\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{CO} - \text{CH}_3$). Por tanto, es necesario un bajo potencial redox durante el proceso fermentativo, si se quiere obtener un buen rendimiento en 2,3 - butanodiol.

La producción de 2,3 - butanodiol a partir de piruvato reduce en gran proporción

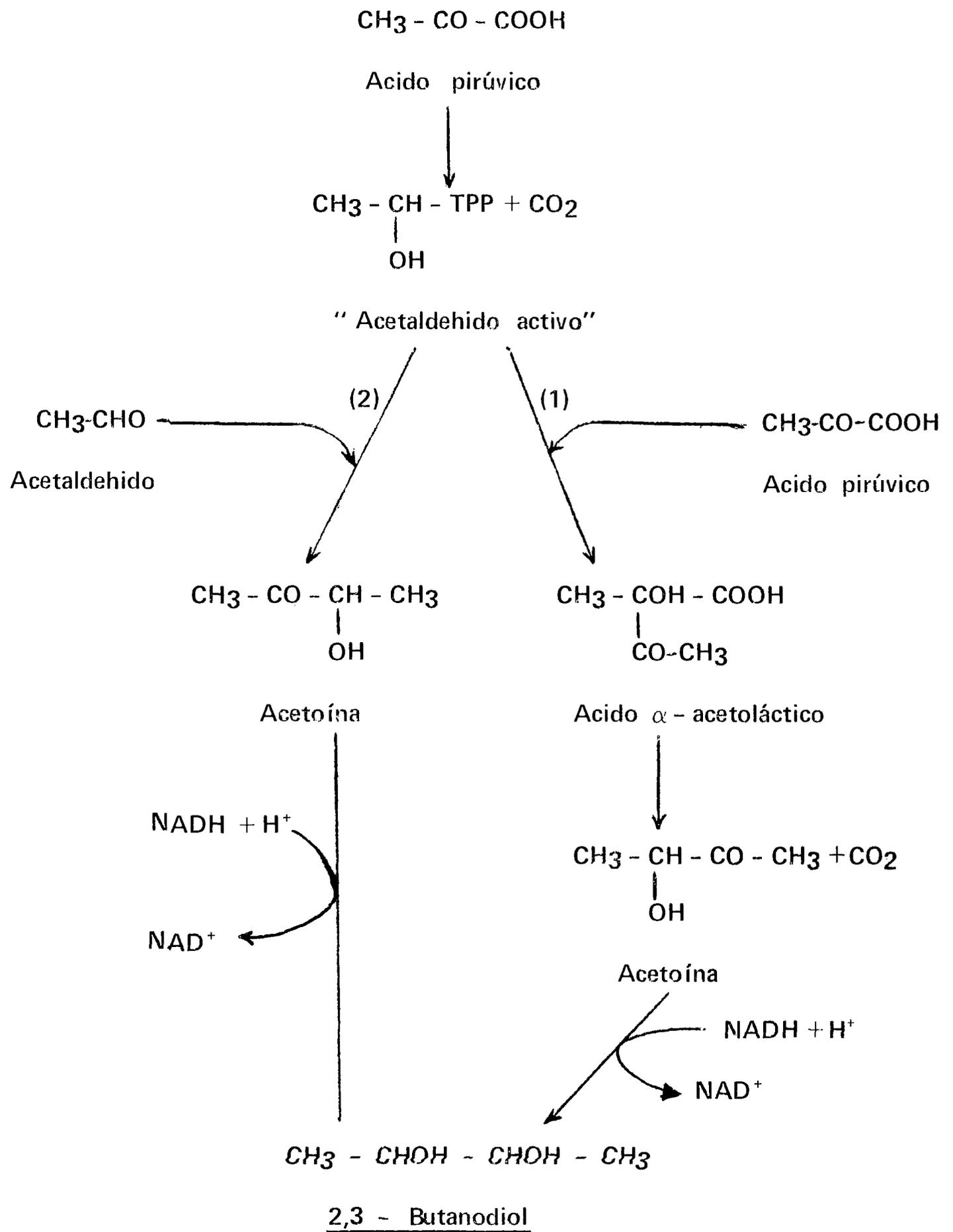


FIGURA 4. Formación de 2,3-butanodiol a partir de ácido pirúvico por fermentación microbiana. (1) Ruta bacteriana. (2) Ruta de levaduras y plantas.

la cantidad total de ácido producido si se compara esta fermentación con la fermentación ácida-mixta. Esto se debe a que el 2,3 - butanodiol es un producto neutro, y en parte a que su formación a partir de 2 moles de ácido pirúvico va acompañada de la reoxidación de solo 1 - mol de $\text{NADH} + \text{H}^+$, de modo que el mantenimiento del balance de oxidación-reducción requiere una mayor reducción de acetilfosfato a etanol, con una disminución de la cantidad de ácido acético formado.

Esta fermentación también se denomina fermentación acetoínica porque con la exposición al aire se oxida parte del butanodiol a acetoína que es fácilmente reconocida por una prueba coloreada específica (test de Voges-Proskauer). Este test es de considerable valor diagnóstico y de primordial importancia para distinguir entre Escherichia coli (fermentación ácida mixta, Voges-Proskauer negativo), y Aerobacter aerógenes (fermentación butilenglicólica, Voges-Proskauer positivo).

Varias bacterias han sido utilizadas con éxito en la producción de 2,3 - butanodiol por fermentación: Bacillus polymyxa, produce solamente la forma D (levorotatoria), Aeromonas hydrophila y Bacillus subtilis producen mezclas de la forma D y de la meso, y Serratia marcescens produce una pequeña cantidad de forma L mezclada con la forma meso, que es la predominante. Algunos de estos microorganismos, como Bacillus polymyxa, tienen enzimas amilolíticas lo que les capacita para fermentar sustratos conteniendo almidón; otros, sólo pueden utilizar azúcares sencillos; finalmente, muchos pueden utilizar pentosas, lo que permite la fermentación de hidrolizados de madera y aguas sulfitadas de desecho de las fábricas de papel. El contenido mineral y nitrogenado del medio de cultivo no suele ser crítico, pero a veces es necesario suplementar con una fuente de tiamina.

La fermentación bacteriana se inicia a pH 6,2 aproximadamente, y el medio ha de ser tamponado alrededor de 5,6 con CO_3Ca . El enzima α - acetolactato - decarboxilasa necesario para la formación de acetoína tiene un óptimo de actividad a pH 6,0 y no actúa a pH 7,8 - 8,0.

Se utilizan concentraciones de azúcar alrededor del 8% p/v, temperaturas en el rango de 30 a 37°C e inóculos del 1% v/v a partir de un cultivo en crecimiento activo. La fermentación se completa en 2 ó 3 días.

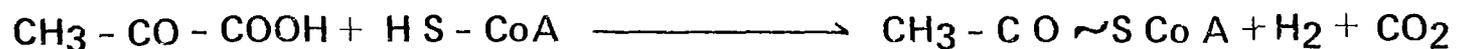
Los distintos isómeros del 2,3 - butanodiol tienen altos puntos de ebullición (alrededor de 180°C) lo que dificulta su extracción. Primeramente se separa el etanol y a continuación el caldo se filtra y concentra por evaporación, antes de recuperar el butanodiol por distintos procedimientos.

FERMENTACION BUTIRICA

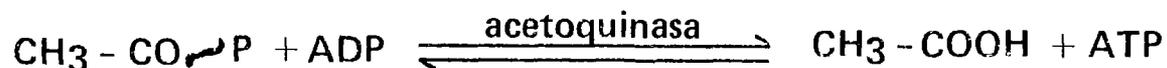
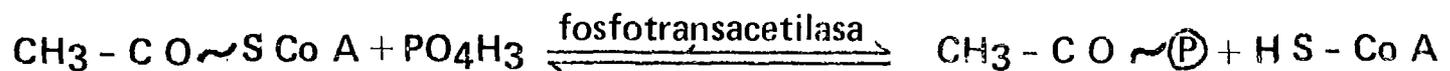
Ya se ha visto que la oxidación del α - hidroxietil - TPP juega un papel clave en la decarboxilación oxidativa de piruvato, y que en distintas condiciones de anaerobiosis existen vías alternativas que permiten transferir este "acetaldehído activo" a aceptores adecuados con formación de nuevos compuestos. Estos procesos que ocurren en los anaerobios facultativos son menos eficientes, desde el punto de vista de captación de energía, que la decarboxilación oxidativa. Sistemas más eficientes energéticamente existen en ciertas bacterias anaerobias esporuladas del género Clostridium, denominadas "bacterias del ácido butírico".

La fermentación butírica que realizan muchas de las bacterias del género Clostridium produce ácidos acético y butírico, CO_2 y H_2 como productos principales (Figura 5).

Esta fermentación deriva de una reacción de escisión de piruvato que da acetilcoenzima A, H_2 y CO_2 ; esta reacción requiere tiaminpirofosfato y coenzima A. El "acetaldehído activo" reacciona directamente con HS - coenzima A y produce acetilcoenzima A y el carbanión del TPP, estabilizado por resonancia.



Parte del acetilcoenzima A puede fosfotransacetilarse dando acetil-fosfato y liberando coenzima A; el acetil-fosfato más ADP en presencia de la acetoquinasa produciría acetato y ATP.



Parte del acetilcoenzima A se condensa con otra molécula de acetilcoenzima A para dar acetoacetilcoenzima A (reacción catalizada por la tiolasa).

Este se reduce subsiguientemente en varias etapas hasta butirilcoenzima A. La conversión de butirilcoenzima A a ácido butírico permite también la formación de ATP.

En una fermentación butírica se producen mayores cantidades de ATP, que las obtenidas en las reacciones anteriores a piruvato en la vía de Embden-Meyerhof.

Las bacterias del género Clostridium y otras anaerobias obligadas, contienen un transportador de electrones especial, la ferredoxina, una proteína que contiene hierro y que posee un bajo potencial rédox, pudiendo así mediar en la utilización de hidrógeno molecular, para la reducción del NAD^+ .

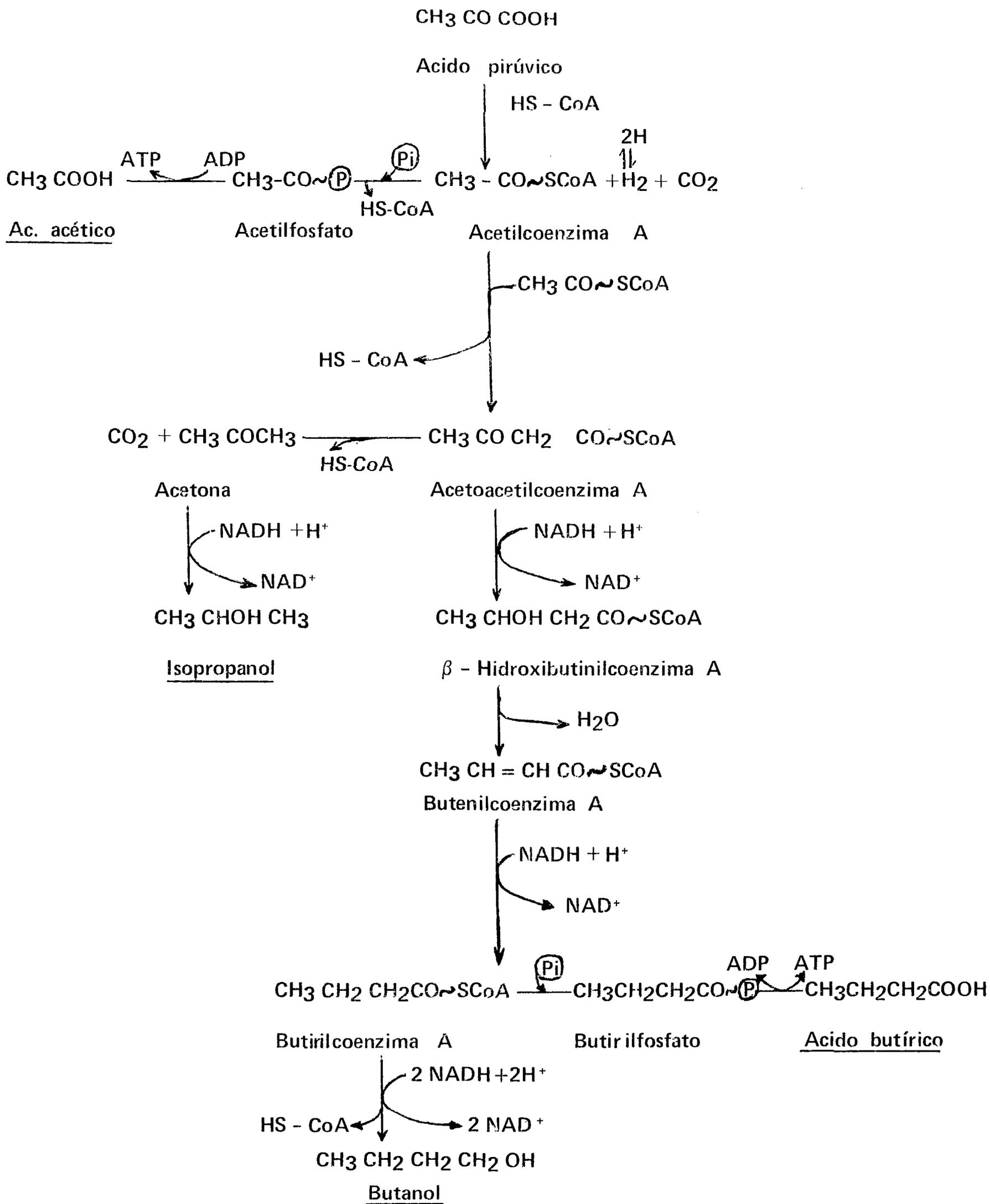


FIGURA 5. Conversión de ácido pirúvico en los productos finales de las fermentaciones butírica y acetona-butanol.

La presencia de este transportador que no ocurre en los anaerobios facultativos, permite a los Clostridium reutilizar parte del H₂ formado en la escisión inicial del ácido pirúvico. Esto ocasiona la reducción de los productos ácidos primarios (butírico, acético) a productos finales neutros: butanol, acetona, isopropanol y etanol. El balance de oxidación-reducción se mantiene así, utilizando hidrógeno molecular como agente reductor. Como resultado de estas posibilidades, los productos finales de las fermentaciones de los Clostridium pueden variar ampliamente. Aquellas fermentaciones en que predominan los productos neutros se denominan a veces fermentaciones acetona-butanol; sin embargo, mecanísticamente éstas representan solamente una variación menor de la fermentación butírica.

En los procesos fermentativos conducentes a la obtención de butanol y acetona, se utilizan cepas seleccionadas de Clostridium acetobutylicum. Un cultivo de éstas se deja esporular en un medio apropiado y se calienta entre 65 y 100 °C hasta 3 minutos para matar las células no esporuladas y a continuación se inocula en mayor cantidad del mismo medio en condiciones anaeróbicas. Se permite un desarrollo rápido del inóculo durante 24 horas antes de sembrar en el medio de fermentación a razón de un 0,5 a 5 % (v/v) a 30 °C. Las condiciones de anaerobiosis se alcanzan manteniendo sobre el cultivo una presión positiva con gas procedente de fermentaciones anteriores.

Las materias primas utilizadas incluyen melazas, aguas sulfitadas, almidones hidrolizados, granos etc. La concentración final en hexosa suele oscilar entre 5 y 7 % (p/v) y el pH entre 6 y 6,5 después de la esterilización del medio. La fuente de nitrógeno consiste en NH₄OH ó amoniaco, añadido a intervalos desde el principio de la fermentación; éste sirve para contrarrestar la tendencia hacia un exceso de acidez, manteniendo el pH por encima de 5,5. Algunas cepas requieren ser suplementadas con proteína más o menos degradada, como por ejemplo autolizado de levadura. Otras requieren biotina y ácido p - aminobenzoico como factores de crecimiento adicionales.

Durante las primeras etapas del proceso fermentativo se produce gran cantidad de CO₂ y H₂ (lo que ayuda a mantener la anaerobiosis) y de ácido butírico. La obtención de acetona y butanol tiene lugar al final de la fermentación y va asociada a un rápido aumento de la actividad acetoacetatodecarboxilasa.

La fermentación se completa en 48 a 50 horas, cuando la concentración de disolventes (acetona, butanol, etanol) es alrededor de un 2 % (v/v). La proporción de butanol: acetona: etanol es usualmente 6 : 3 : 1, dependiendo ésta, de la cepa seleccionada y de las condiciones de fermentación. Los máximos rendimientos obtenidos son del orden del 30 % de la mezcla de disolventes sobre el carbohidrato proporcionado. Se tiende a seleccionar cepas y condiciones de cultivo con vistas a una máxima producción de butanol, que es el producto más valioso económicamente.

Los productos finales de la fermentación se recuperan por destilación continua, obteniéndose una solución que contiene aproximadamente el 40 % en peso de la mezcla. Esta se resuelve por destilación fraccionada obteniéndose el butanol y la acetona en fases distintas.

Las posibilidades de contaminación durante este tipo de fermentación son escasas, si bien las bacterias del ácido láctico capaces de crecer en condiciones microaerófilas pueden, a veces, plantear problemas. La infección se detecta por una disminución en la producción de gas o por una excesiva producción de ácido. A veces hay infección por bacteriófagos que ocasionan la muerte del organismo fermentador; éstos solo pueden combatirse utilizando cepas inmunes al ataque del virus.

Los gases de la fermentación, CO_2 y H_2 (2:1), pueden tener utilidad práctica; así el CO_2 puede convertirse en nieve carbónica (CO_2 sólido) y el H_2 se utiliza en las industrias químicas de síntesis. El inóculo bacteriano concentrado y desecado se ha utilizado en piensos como suplemento proteico y de riboflavina.

3. FERMENTACIONES NO DERIVADAS DE LA VIA GLICOLITICA

RUTA OXIDATIVA DEL FOSFOGLUCONATO

Aunque la vía glicolítica de Embden-Meyerhof es la ruta metabólica más importante para la degradación de las hexosas, existen otras rutas seguidas, en todo o en parte, durante el transcurso de ciertas fermentaciones bacterianas. Una de estas rutas alternativas es la llamada "ciclo de las pentosas", "vía del fosfogluconato" o "desviación de las hexosamonofosfato".

En las fermentaciones bacterianas que siguen esta ruta, la fosforilación inicial de la glucosa es seguida inmediatamente por una oxidación de glucosa - 6 - fosfato a ácido - 6 - - fosfogluconico, catalizada por la glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa (D - glucosa - 6 - fosfato : NADP oxidoreductasa); este enzima funciona normalmente con NADP (nicotinamida adenin dinucleótido fosfato) si bien el de Leuconostoc mesenteroides (bacteria láctica hetero fermentativa) puede hacerlo con NAD ó NADP.

Aún cuando se acaba formando piruvato, el mecanismo de las reacciones que conducen a la producción de compuestos de tres carbonos (C₃) es diferente del de la vía glicolítica. Esta diferencia mecánica tiene un efecto importante en el rendimiento energético. Cuando la glucosa se fermenta a través de la vía del fosfogluconato, el rendimiento neto en ATP es la mitad del obtenido a través de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof, es decir, 1 mol de - ATP por mol de glucosa convertida en piruvato.

En la Figura 1 aparece esquematizada la vía del fosfogluconato o ciclo de las pentosas.

Algunos de los datos experimentales que apoyan la existencia de esta vía metabólica son:

a) Los enzimas oxidantes que intervienen en la glicolisis son específicos para el NAD⁺ como coenzima. No obstante se han aislado numerosos enzimas que requieren NADP⁺ para su acción.

b) Si existiese la glicolisis como único camino para el metabolismo de hexosas, tanto a partir de glucosa - 1-C¹⁴ como de glucosa - 6 - C¹⁴ se obtendría piruvato - 3 -C¹⁴. Sin embargo en la mayoría de los tejidos y en numerosos microorganismos, la glucosa - 1-C¹⁴ origina grandes cantidades de C¹⁴ O₂ y pentosas y hexosas marcadas, mientras que la glucosa - 6 - C¹⁴ solo contribuye a la formación de azúcares marcados y no genera C¹⁴ O₂. Esta distribución del isotopo C¹⁴ entre los productos de catabolismo de hexosas se explica bien admitiendo la existencia del ciclo de las pentosas.

c) En muchos extractos de tejidos la degradación de la glucosa coincide con la aparición transitoria de pentosas y heptulosa fosfatos y su posterior transformación en hexosas fosfatos. Por lá vía glicolítica no se puede explicar este hecho.

La vía del fosfogluconato se inicia con la oxidación de la glucosa - 6 - P a 6- P - glucono - lactona, catalizada por la glucosa - 6 - P deshidrogenasa, un enzima de amplia distribución, aislado y caracterizado por Warburg que requiere NADP⁺ como coenzima; la reacción es reversible.

La hidrólisis de la lactona a 6 - fosfogluconato es muy rápida y altamente exergónica con un $\Delta G = - 5000$ cal/mol. Es catalizada por la lactonasa, enzima identificado en plantas y en diversas especies bacterianas.

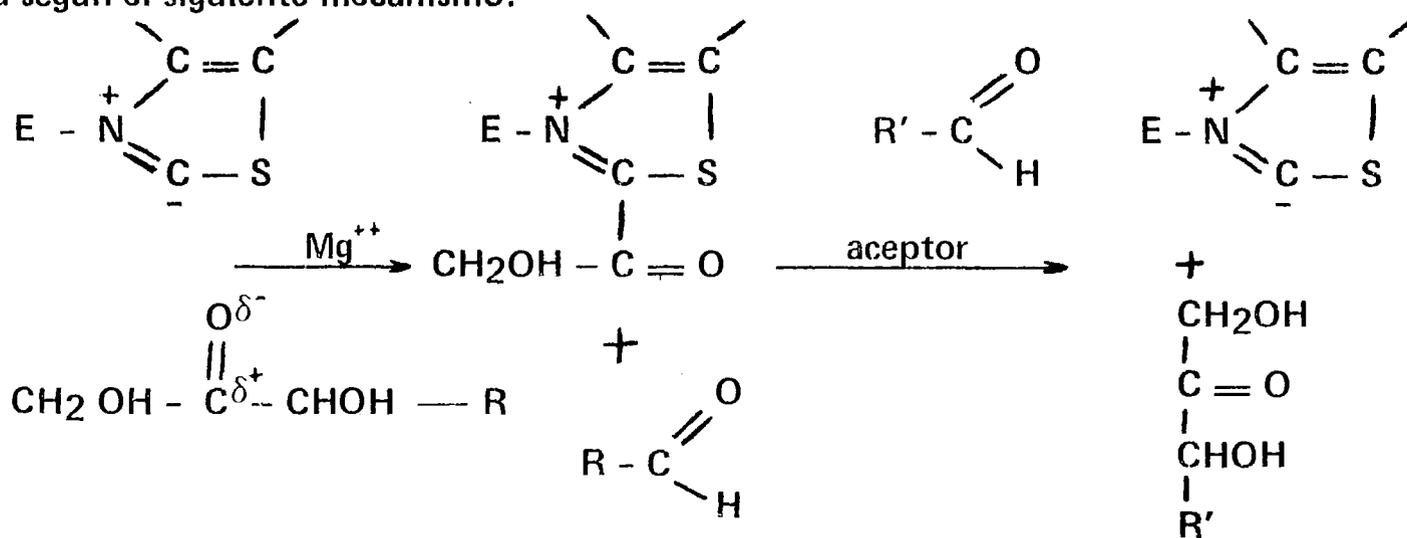
El 6 - P -gluconato es decarboxilado oxidativamente por la fosfogluconato deshidrogenasa que requiere cationes metálicos divalentes como cofactor y NADP⁺ como coenzima.

En la parte no oxidativa del ciclo intervienen reacciones de isomerización y reordenación del esqueleto carbonado mediante transaldolaciones y transcetolaciones.

Hay dos reacciones de isomerización: Una de ellas es la conversión de la D - ribulosa - 5 - P en su isómero funcional, la D - ribosa - 5 - P , catalizada por la ribosa - P - isomerasa. La otra es la epimerización de la ribulosa - 5 - P por la ribulosa - 5 - P - epimerasa, dando D - xilulosa - 5 - P .

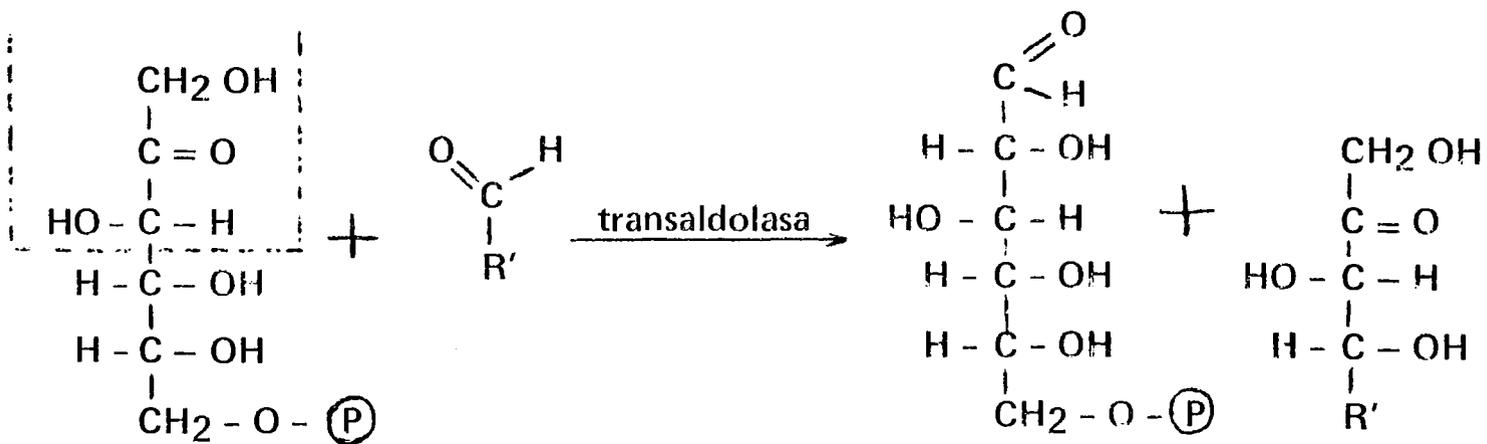
En el ciclo hay dos transcetolaciones; una es la formación de gliceraldehído - 3 - P y sedoheptulosa - 7 - P a partir de dos pentosas. La segunda es la formación de fructosa - P y una triosa P a partir de xilulosa 5 - P y una tetrosa.

Las reacciones de transcetolación: Están catalizadas por transcetolasas que requieren tiaminpirofosfato (TPP) y metales divalentes. La especificidad del enzima exige configuración L en el carbono α y preferiblemente los dos carbonos siguientes con sus sustituyentes en posición trans. Estos enzimas transfieren reversiblemente un grupo glicolaldehído desde una cetosa a una aldosa según el siguiente mecanismo:



Las reacciones de transaldolación, catalizadas por las transaldolasas se caracterizan por la transferencia de un grupo dihidroxiacetona desde una cetosa a una aldosa. El mecanismo, grupo prostético y cofactor son similares a la transcetolación; además la cetosa donante ha de estar fosforilada.

La reacción global es la siguiente:



FERMENTACION HETEROLACTICA

La fermentación más común que transcurre por la vía de las pentosas es la fermentación heteroláctica, característica de todas las especies de Leuconostoc y de varias especies de Lacto bacillus. Los productos finales formados a partir de glucosa son ácido láctico, etanol y CO₂ en una relación molar estricta de 1 : 1 : 1.



La equivalencia molar de los tres productos finales es una consecuencia del mecanismo de degradación del 6 - fosfogluconato (Figura 2).

El 6 - fosfogluconato, obtenido en las primeras reacciones del ciclo de las pentosas, se oxida a ribulosa - 5 - fosfato y CO₂ por una 6 - fosfogluconato deshidrogenasa (6 - fosfogluconato : NADP oxidoreductasa) decarboxilante. Este enzima normalmente funciona con NADP, si bien el de Leuconostoc mesenteroides requiere NAD⁺.

La D - ribulosa - 5 - fosfato sufre una epimerización en el carbono 3 y se transforma en D - xylulosa - 5 - fosfato. Esta reacción difiere de las implicadas en la epimerización de la galactosa en que no está implicado el uridin difosfato derivado del azúcar.

La reacción única en la fermentación heteroláctica es la de escisión de la D - xylulosa - 5 - fosfato por el enzima fosfocetolasa (D - xylulosa - 5 - fosfato : D - gliceraldehido - 3 - fosfato - liasa), que utiliza fosfato inorgánico y produce acetilfosfato y gliceraldehido 3 - fosfato. Este enzima contiene tiaminapirofosfato como grupo prostético, y su modo de acción debe ser similar al de otras reacciones catalizadas por tiamin-enzimas. La fosfocetolasa se encuentra solamente en bacterias lácticas y en Acetobacter xylinum, donde actúa sobre fructosa - 6 - fosfato.

El acetilfosfato se reduce a etanol en dos reducciones sucesivas utilizando los electrones obtenidos en la oxidación de glucosa - 6 - fosfato.

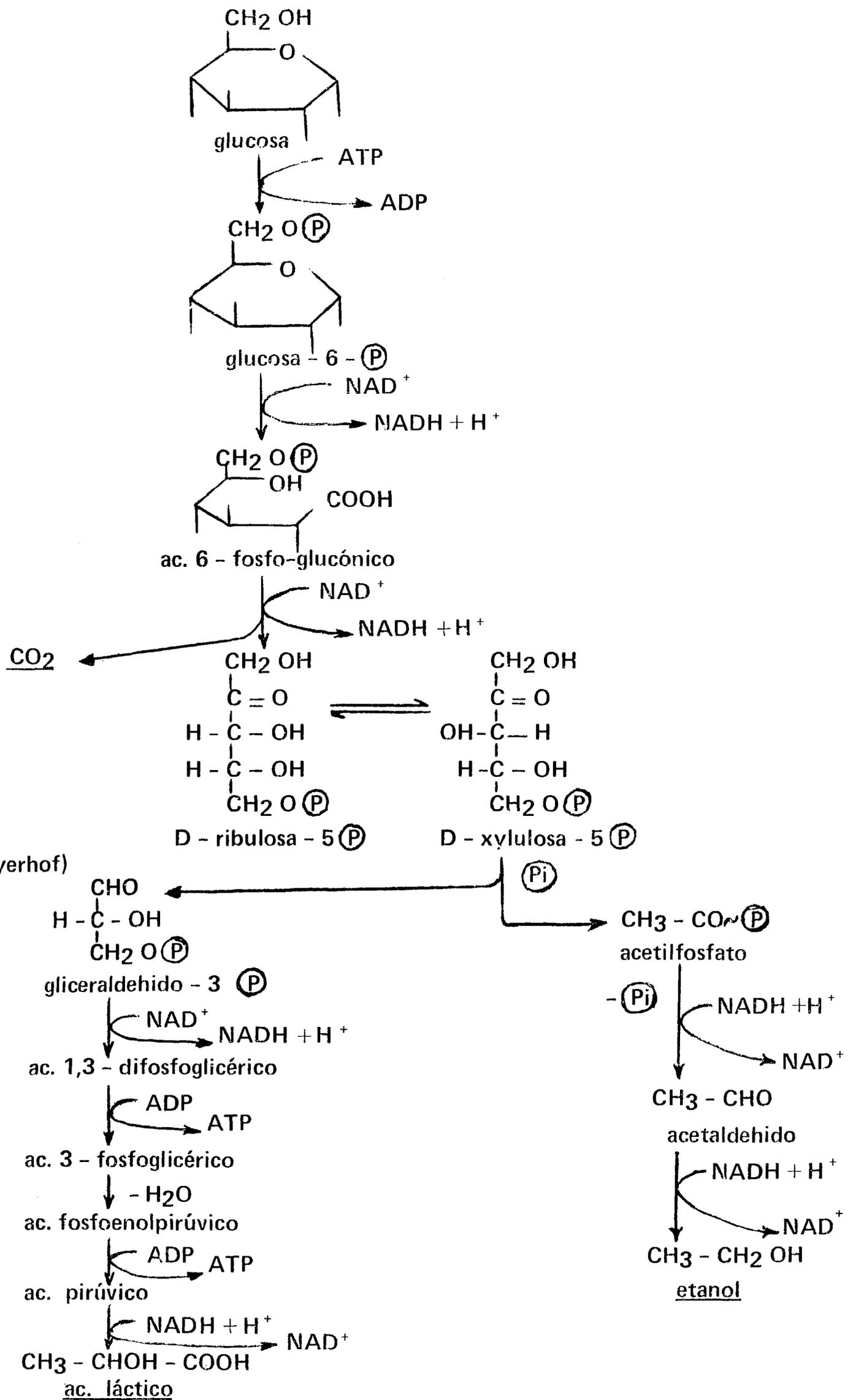


FIGURA 2. Fermentación heteroláctica de la glucosa. Los productos finales aparecen subrayados.

El gliceraldehído - 3 - fosfato se metaboliza a piruvato y ácido láctico por reacciones de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof.

Aún cuando se generan 2 moles de ATP en esta vía glicolítica, el rendimiento neto de la fermentación heteroláctica es de 1 mol de ATP por mol de glucosa ya que se utilizó 1 ATP en la formación inicial de glucosa - 6 - fosfato y la energía del enlace rico en energía del acetilfosfato se pierde durante la reducción de este intermediario a etanol. Algunos autores, sin embargo, opinan que la energía del acetilfosfato debe ser recuperada en forma de ATP, y en consecuencia el rendimiento neto sería de 2 moles de ATP por mol de hexosa fermentada.

RUTA DE ENTNER-DOUDOROFF : FERMENTACION ALCOHOLICA DE ZYMOMONAS LINDNERI

La ruta fermentativa de Entner-Doudoroff es una variante de la ruta oxidativa de las pentosafosfato que fué descubierta en Pseudomonas saccharophila por aquéllos autores.

Un ejemplo típico de una fermentación que transcurre por esta vía es la fermentación alcohólica llevada a cabo por la bacteria Zymomonas lindneri (Figura 3).

La glucosa es metabolizada a 6 - fosfogluconato por una quinasa y la glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa.

La reacción novedosa de esta vía es la de deshidratación del 6 - fosfogluconato por la 6 - fosfogluconato dehidrasa (6 - fosfo - gluconato hidro - liasa) dando el 2 - ceto - 3 deoxi - 6 fosfo - gluconato, que a continuación se escinde en piruvato y gliceraldehído - 3 - fosfato, debido al enzima 2 - ceto - 3 deoxi - D - gluconato : D - Gliceraldehído - 3 - fosfato - liasa.

El gliceraldehído - 3 - fosfato se metaboliza por la vía glicolítica hasta piruvato. Esta y la anterior molécula de piruvato son decarboxilados a acetaldehído que se reduce a continuación a etanol por la alcohol deshidrogenasa.

El rendimiento energético de esta fermentación alcohólica es de solamente 1 mol de ATP por mol de glucosa fermentada.

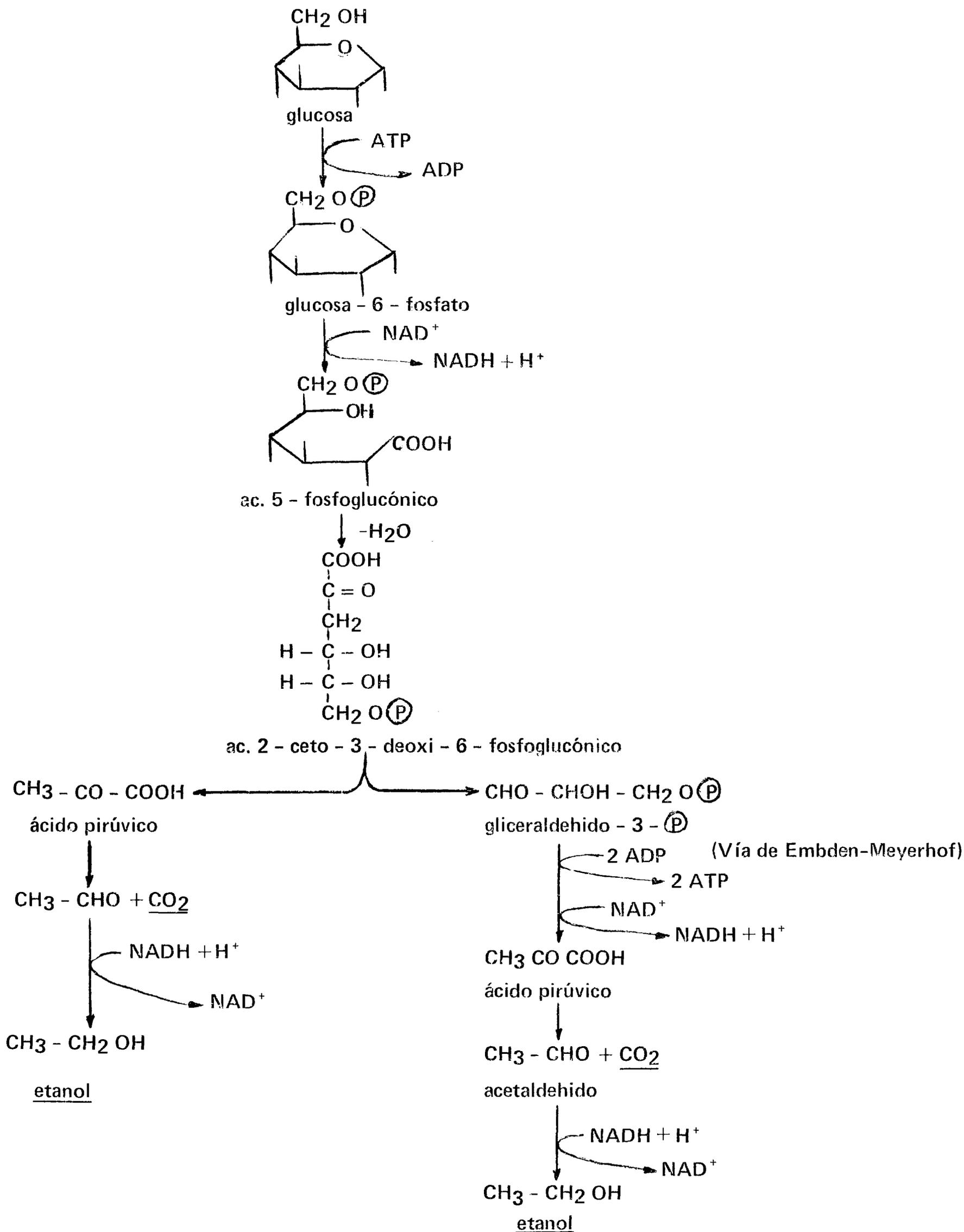


FIGURA 3. Fermentación alcohólica de glucosa por la bacteria Zymomonas lindneri. Los productos aparecen subrayados.

ESCISION C₂ – C₄: RUTA FERMENTATIVA DE BIFIDOBACTERIUM

Las bacterias del género *Bifidobacterium* fermentan la glucosa con la formación de una mezcla de ácidos láctico y acético. Esta vía fermentativa ha sido esclarecida recientemente (Figura 4).

La glucosa, al igual que en la vía glicolítica, por una quinasa forma glucosa – 6 – fosfato, que a su vez por una fosfohexosaisomerasa se convierte en fructosa – 6 – fosfato.

La fructosa – 6 – fosfato se escinde, tomando fosfato inorgánico, en acetilfosfato y un azúcar de cuatro átomos de carbono, la eritrosa – 4 – fosfato.

El acetilfosfato da ácido acético formándose 1 mol de ATP a expensas de su enlace rico en energía.

A través de una compleja serie de reagrupamientos, que se inicia con la reacción de la eritrosa-4-fosfato con un mol de fructosa – 6 – fosfato, se acaba produciendo gliceraldehido – 3 – fosfato y más acetilfosfato. El gliceraldehido – 3 – fosfato se convierte en ácido láctico y el acetilfosfato en ácido acético.

La ecuación global de esta fermentación es:



Energéticamente es una fermentación ligeramente más favorable que la fermentación homoláctica, ya que se forman 5 moles de ATP por cada 2 moles de glucosa fermentada.

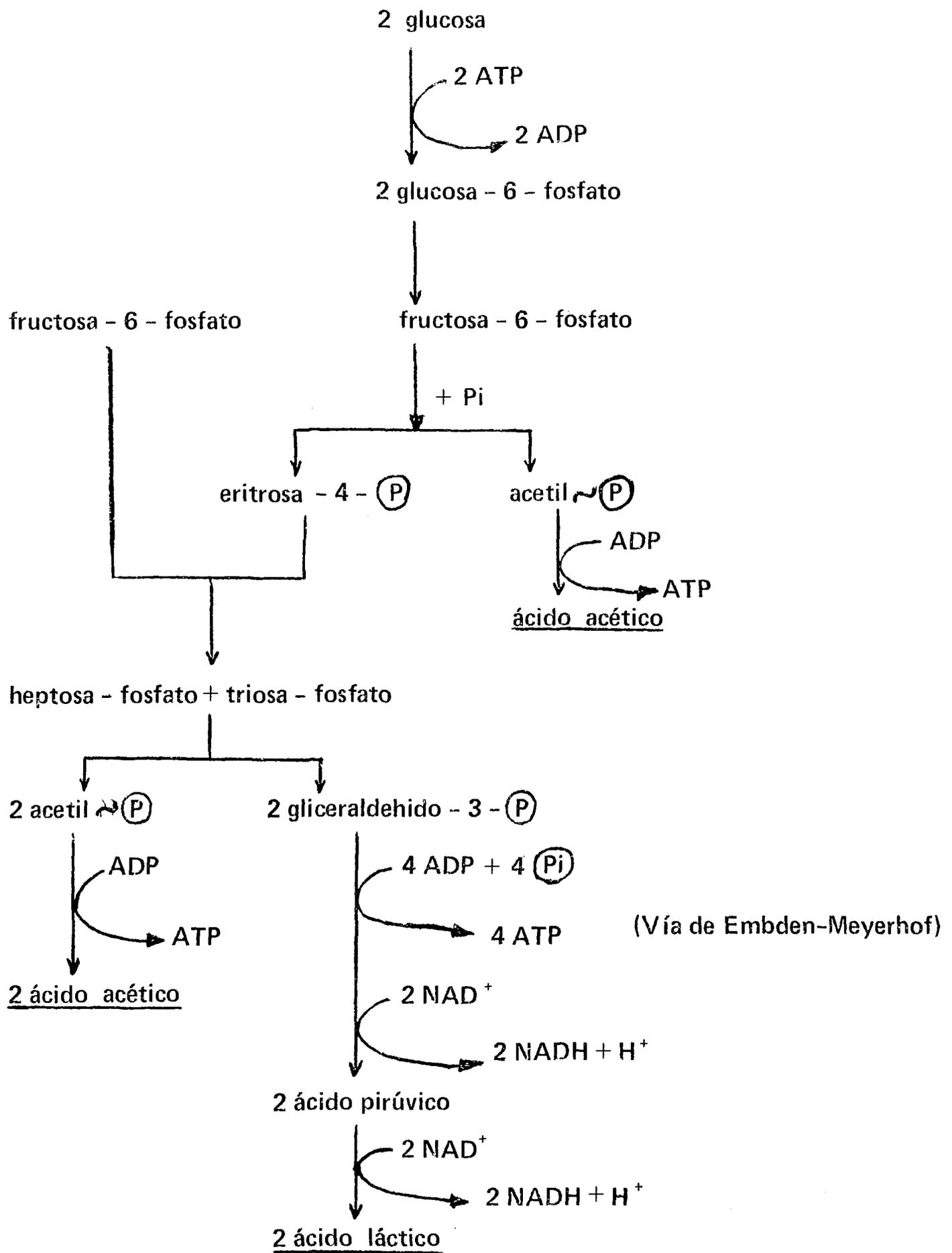


FIGURA 4. Ruta fermentativa de la glucosa en Bifido bacterium. Los productos finales aparecen subrayados.

4. RUTAS FERMENTATIVAS MIXTAS

FERMENACION PROPIONICA

La fermentación propiónica de los hidratos de carbono se lleva a cabo principalmente por un grupo de bacterias, no esporógenas, del género Propionibacterium. La mayor parte de los miembros de este grupo puede también fermentar ácido láctico, que es a su vez el producto final de otras fermentaciones bacterianas. El principal producto final, es el ácido propiónico; también se producen cantidades menores de ácido acético, dióxido de carbono y succinato. La capacidad de fermentar el ácido láctico es una propiedad importante tanto fisiológica como ecológicamente, que permite obtener ATP a partir de lactato en mayor cantidad que el obtenido hasta lactato en la vía glicolítica. Una fermentación similar del ácido láctico ocurre en Veillonella alcalescens, con la particularidad de que se produce, además hidrógeno.

La fermentación propiónica se ha estudiado intensamente en los laboratorios de Wood y Lynen.

Las fermentaciones de Propionibacterium en sus primeras etapas, exhiben un exceso de productos oxidados y altas recuperaciones de carbono (107%). Eventualmente, se descubrió que el CO_3Ca añadido al medio para tamponarlo, desaparecía durante la fermentación. Wood y colaboradores en 1941, establecieron que el $^{14}\text{CO}_2$ se fijaba en los carboxilos de succinato durante la fermentación de glicerina. Históricamente esta fue la primera demostración de fijación heterotrófica de CO_2 .

Estudios de fermentaciones de Propionibacterium con glucosa radiactiva indican que la ruta fermentativa seguida es compleja. Si se marca con carbono 14 el carbono 1 de la glucosa, la marca radiactiva aparece principalmente en los carbonos más reducidos de los productos (carbonos 2 y 3 de propiónico, 2 y 3 de succínico y el carbono 2 de acético) lo que indica que está operando la ruta glicolítica de Embden-Meyerhof. Sin embargo, el CO_2 y los carbonos carboxílicos de los ácidos también aparecen marcados radiactivamente lo que sugiere a su vez la existencia de la vía oxidativa de las pentosafosfato.

La fermentación de glucosa - 2 - ^{14}C , origina propionato y succinato marcados análogamente al caso anterior, con la diferencia de que el acetato se marca más intensamente en el carbono carboxílico. En el caso de glucosa - 3,4 - ^{14}C , la marca radiactiva se encuentra en el CO_2 y en los carboxilos de succínico y propiónico, lo cual confiere apoyo experimental a la existencia de una vía glicolítica.

En la Tabla 1, aparece la distribución isotópica de los productos de la fermentación de glucosa por Propionibacterium. Como se puede observar, los datos se explican mejor por una ruta fermentativa mixta; parte de la glucosa se degrada por la vía de Embden-Meyerhof y parte lo hace por la vía de las pentosafosfato, pero predominando la vía glicolítica.

T A B L A 1

DISTRIBUCION ISOTOPICA EN LOS PRODUCTOS DE LA FERMENTACION DE GLUCOSA RADIATIVA POR PROPIONIBACTERIUM

Productos	G - 1 - ¹⁴ C	G - 2 - ¹⁴ C	G - 3,4 - ¹⁴ C
	A . E . R .	A . E . R .	A . E . R .
<u>Acido propiónico</u>			
CH ₃	14,2	20,2	6,59
 CH ₂	15,7	19,4	8,05
 COOH	8,09	3,07	55,4
<u>Acido succínico</u>			
CH ₂	15,5	13,5	—
 COOH	4,5	5,17	41,4
<u>Acido acético</u>			
CH ₃	15,1	13,5	6,50
 COOH	5,23	24,1	5,05
<u>CO₂</u>	19,7	3,14	48,1

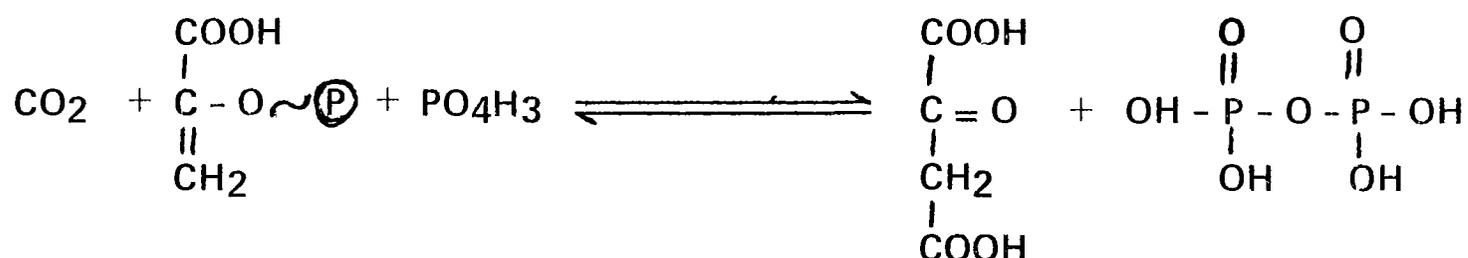
A . E . R . = Actividad especifica relativa

Como se deduce de los datos de la Tabla 1, los ácidos succínico y propiónico están relacionados entre si por la similaridad en su marcaje radiactivo. La fermentación de lactato - 2 - ^{14}C y lactato - 3 - ^{14}C por Propionibacterium, resulta en la distribución al azar del isótopo entre los carbonos 2 y 3 de propiónico, lo que sugiere que un compuesto intermedio simétrico con cuatro átomos de carbono, tal como succínico, pudiera ser el precursor del propiónico.

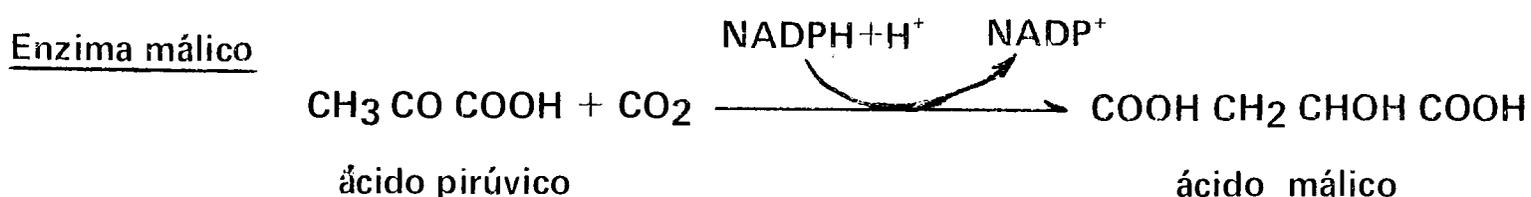
El enzima clave en la formación de ácido propiónico, es un enzima que contiene biotina denominado metilmaloniltranscarboxilasa (metilmalonil - Co A : piruvato carboxiltransferasa) y que cataliza la transferencia del grupo carboxilo del metilmalonilcoenzima A a piruvato con la formación de oxalacetato y propionilcoenzima A.

En la Figura 1 se indica la vía metabólica de formación de ácido propiónico por Propionibacterium. El poder reductor (8 H) requerido para la reducción de dos moles de pirúvico a dos moles de propiónico es suministrado por el metabolismo de 1,5 moles de glucosa a 3 moles de pirúvico; uno de estos 3 últimos moles se oxida a ácido acético y CO_2 . Gracias a la transcarboxilasa, el pirúvico se convierte en oxalacético que a su vez se reduce a ácido succínico por reacciones similares a las del ciclo de los ácidos tricarbónicos. La reducción de oxalacético es la etapa en que se lleva a cabo la distribución al azar de los carbonos 2 y 3 de propiónico ya que el succinato es un compuesto simétrico. El coenzima A se transfiere a succinato a partir del propionilcoenzima A gracias a una transferasa, y a continuación el succinato se isomeriza a metilmalonil Co A. Esta isomerasa contiene una forma de vitamina B₁₂ como grupo prostético.

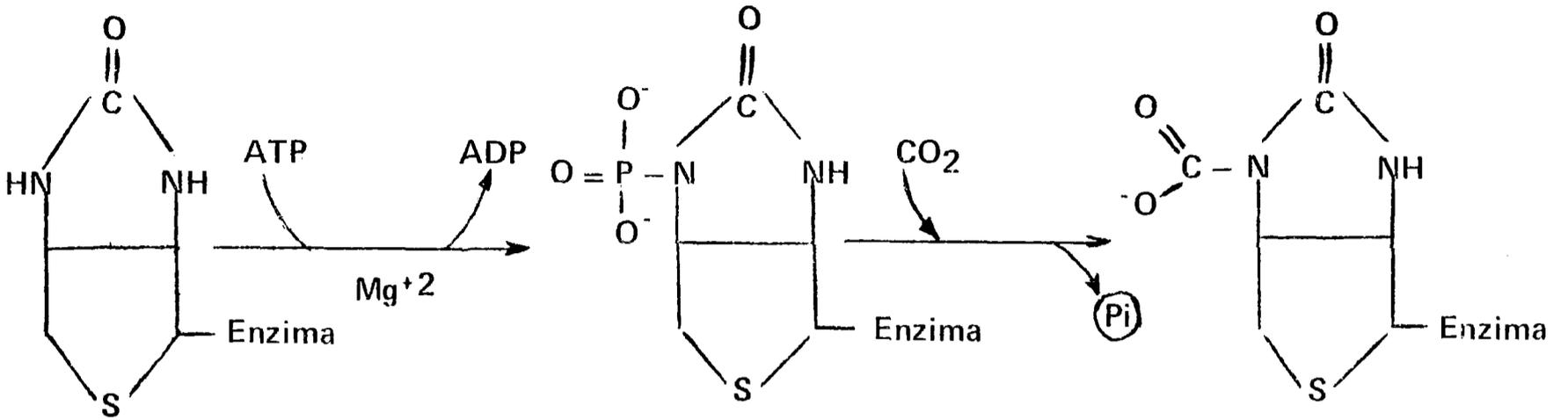
La fijación de CO_2 parece ser importante en la obtención de oxalacético, que se requiere en cantidades catalíticas en este tipo de fermentación. Se trata de una reacción reversible de CO_2 con fosfoenolpiruvato con transferencia del grupo fosfato a fósforo inorgánico para dar pirofosfato. El enzima responsable es una liasa (pirofosfato : oxalacetato carboxilasa).



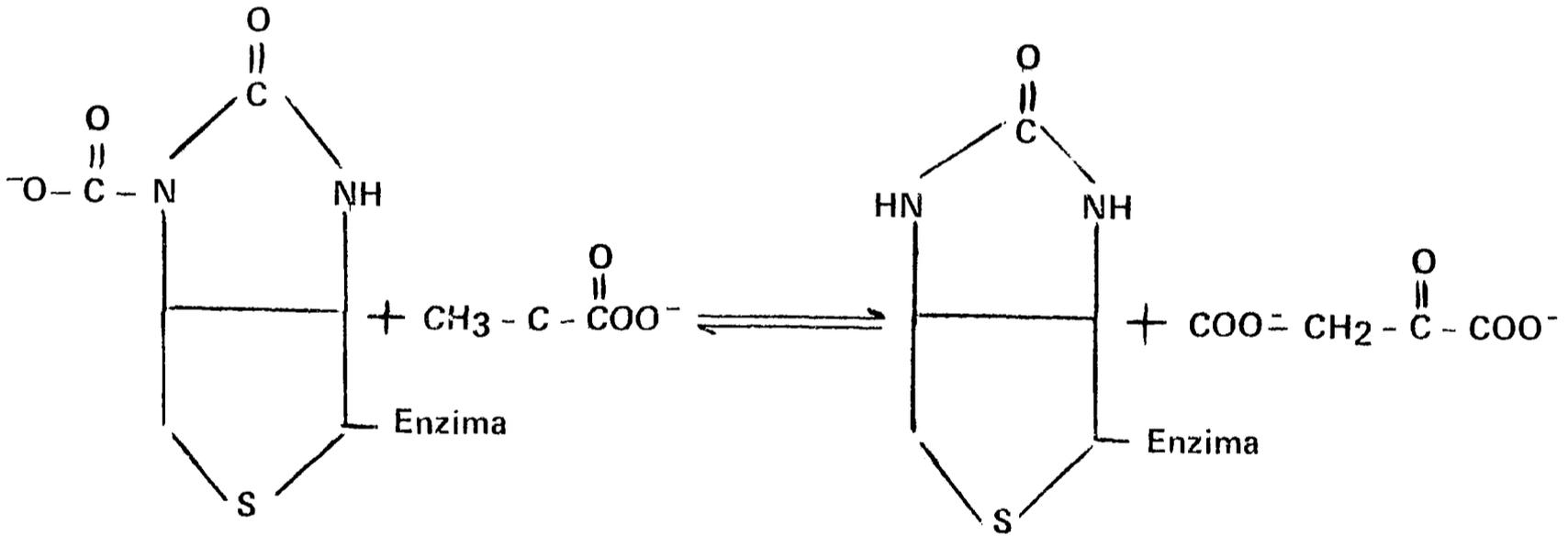
Otras reacciones de fijación de CO_2 que podrían operar en este tipo de fermentaciones serían las catalizadas por el enzima málico, con NADP como cofactor y la catalizada por la pirúvico carboxilasa con biotina como grupo prostético:



Enzima piruvatocarboxilasa



Biotin-enzima

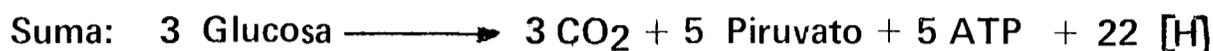
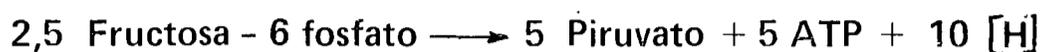
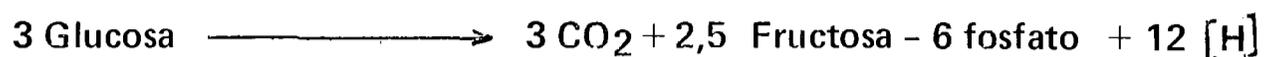


ácido pirúvico

biotinenzima

ácido oxalacético

Si solamente operara la vía glicolítica, por cada 1,5 moles de glucosa se obtendrían 3 moles de ATP más 1 mol de ATP en la oxidación de piruvato a acetato vía acetoquinasa. El rendimiento global en ATP serían 4 moles por cada 1,5 moles de glucosa, o lo que es lo mismo 2,67 moles de ATP por mol de glucosa. Si la glucosa se oxida por la vía de las pentosafosfato, a pentosa y CO₂ seguida de conversión de pentosa fosfato a hexosa monofosfato rinde ligeramente menos de dos moles de ATP por mol de hexosa:



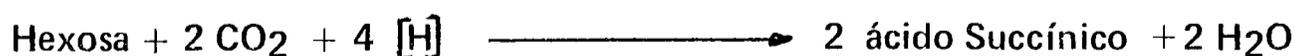
Esta es una vía más oxidativa que la de Embden-Meyerhof. Los 22 [H] resultantes de la oxidación de 3 moles de glucosa es más que suficiente para reducir los 5 moles de piruvato a ácido propiónico (5 x 4 = 20) y el rendimiento de ATP es menor (1,67 moles de ATP por mol de glucosa).

Globalmente, el rendimiento energético es de aproximadamente 1 mol de ATP por cada mol de propiónico formado.

Otros microorganismos que producen propionato por fermentación son Clostridium propionicum y Peptostreptococcus elsdenii (este último denominando en principio LC = "large coccus"). Clostridium propionicum fermenta lactato a propionato, acetato y dióxido de carbono en las proporciones 2 : 1 : 1, mientras que P. elsdenii forma una mezcla de ácidos acético, propiónico, butírico y valérico, a partir de lactato. Ambos organismos difieren de Propionibacterium en que el ácido láctico se convierte en propiónico sin distribución al azar de los carbonos 2 y 3.

La ruta más probable para la conversión de ácido láctico en ácido propiónico por estos microorganismos aparece en la Figura 2. Una coenzima A transferasa es responsable de la transferencia del coenzima A desde el propionil Co A hasta el ácido láctico, produciendo lactil Co A. El grupo de Vagets descubrió, en una pseudomonadal, el lactilcoenzima A dehidrasa, que elimina un mol de agua a partir del lactilCoA para dar acrilil CoA. Todos estos enzimas son específicos para L (+) ácido láctico. El acrililcoenzima A se reduce a propionilcoenzima A por una deshidrogenasa.

A veces, en ciertas fermentaciones, el ácido succínico puede ser el principal producto final, no siendo infrecuentes estequiometrias del tipo:



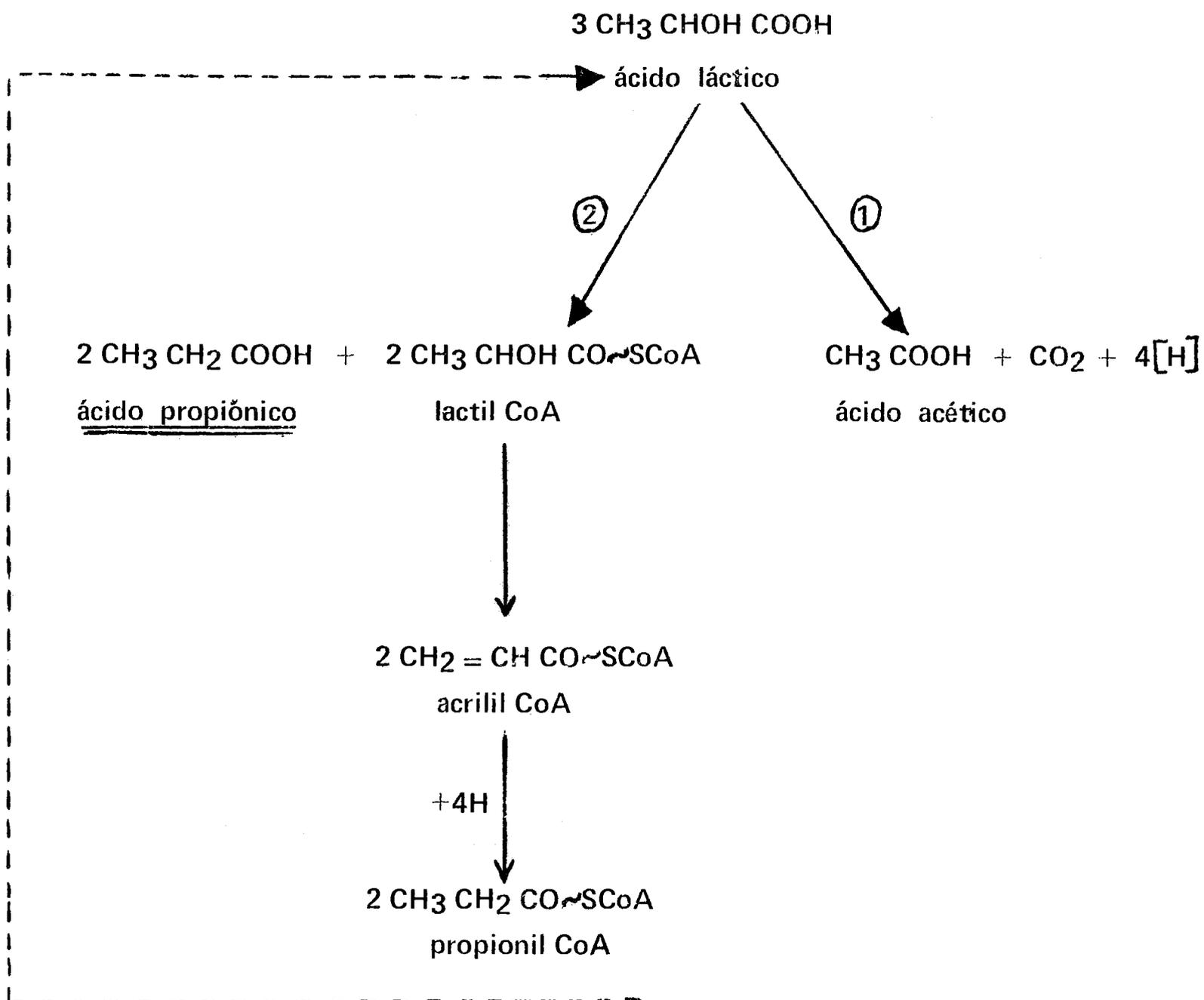


FIGURA 2. Ruta metabólica del acrilato para la producción de propiónico a partir de ácido láctico en Clostridium propionicum y Peptostreptococcus elsdenii.

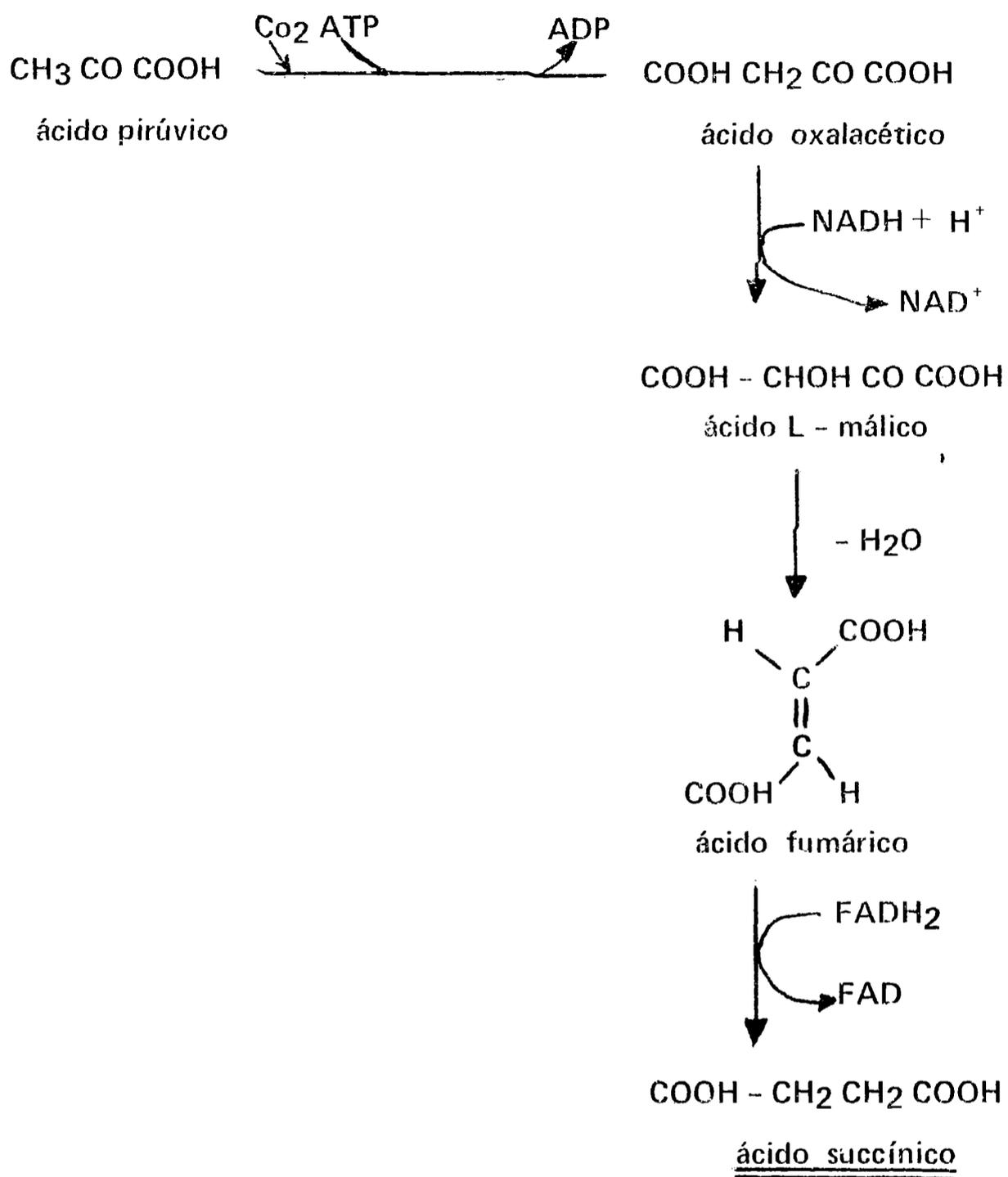


FIGURA 3. Fermentación succínica.

Parece ser que en esta variante fermentativa, el piruvato por la acción de la piruvato carboxilasa pasa a oxalacetato, según el mecanismo indicado anteriormente; el oxalacetato se reduce a L - malato por acción de la oxalacetato reductasa, cuyo coenzima es el NADH; el L - malato, por acción de la malato hidrolasa pierde una molécula de agua y se convierte en fumarato el cual es reducido a succinato por la fumarato reductasa, un flavinenzima (Figura 3).

FERMENTACION DE GLUCONATO POR STREPTOCOCCUS FAECALIS

Streptococcus faecalis fermenta el ácido glucónico con producción de 0,5 moles de CO₂, 1,5 moles de ácido láctico y pequeñas cantidades de ácido acético, ácido fórmico y etanol. En presencia de arsenito, se producen 1,75 moles de ácido láctico y cantidades despreciables de los productos menores.

Si se marca con carbono 14 el carbono 1 del gluconato, la marca radiactiva aparece en el CO₂ y en el carbono carboxílico del ácido láctico. La fermentación de gluconato - 2 - ¹⁴C produce CO₂ no marcado y ácido láctico marcado intensamente en el carbono 2, y también en el 1 y en el 3. La mejor explicación de esta distribución isotópica es que el 50 % del gluconato se oxida a CO₂ y pentosa fosfato, la cual se convierte en hexosafosfato y es fermentada a los productos normales de la fermentación de hexosas en este microorganismo. El 50 % restante del 6 - fosfogluconato se convertirá a piruvato y gliceraldehido - 3 - fosfato - por la vía de Entner-Doudoroff; ésto justificaría la marca radiactiva en el carbono carboxílico del ácido láctico después de la fermentación de gluconato - 1 - ¹⁴C. Muchos de los enzimas esperados se han detectado en Streptococcus faecalis, incluyendo la 2 - ceto - 3 - deoxi - 6 - fosfo - D - gluconato aldolasa, presente en mayores cantidades en células incubadas en gluconato que en células incubadas en glucosa. También se ha detectado la transcetolasa aún cuando la transaldolasa no ha podido ser detectada.

Sin embargo, es posible suplir la acción de la transaldolasa utilizando una combinación de fosfofructoquinasa y aldolasa, enzimas que pueden funcionar con sedoheptulosafosfato.

La fermentación de 2 - cetogluconato por Streptococcus faecalis produce 1 mol de CO₂ y una mezcla de etanol, acético y fórmico, o en presencia de arsenito, 1,67 moles de ácido láctico.

Los datos obtenidos con compuestos radiactivos indican que en la fermentación del 2 - cetogluconato interviene solamente la vía de las pentosafosfato y no lo hace la vía de Entner-Doudoroff.

Streptococcus faecalis es excepcional entre las bacterias lácticas, ya que utiliza la vía de las pentosas para la fermentación del ácido hexónico en lugar de llevar a cabo la escisión fosfocetolásica propia de las fermentaciones heterolácticas.

Impreso en la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Madrid.- Ciudad Universitaria.- Madrid - 3

I.S.B.N.- 84 - 600 - 6754 - 8.

Depósito Legal.- M - 33992 - 1975

Precio: 135 pts.

XVI / 10 - 75 / 200	
R - 117 / 100	73

