

Laboratorio de Fisiología animal. Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Influencia del pH sobre la fermentación alcohólica endógena en la levadura

por

R. Parés-Farrás

(Recibido para publicar el 20 de febrero de 1958)

La fermentación de glucosa por células intactas de levadura de pan está muy poco influida por el pH exterior, por lo menos, para variaciones del mismo comprendidas entre límites considerablemente separados (1). Probablemente, este hecho está íntimamente vinculado a la absorción de iones K^+ que tiene lugar durante la fermentación (2). Por esto, cuando los iones monovalentes K^+ y NH_4^+ se excluyen del sistema amortiguador, la fermentación de glucosa exterior pasa a ser un proceso notablemente sensible al pH extracelular (3). ROTHSTEIN y DEMIS (3), encontraron que la producción de CO_2 varía de acuerdo con una curva bifásica a medida que el pH asciende de 2 hasta 10. Esta curva tiene dos óptimos alrededor de los pH 5 y 8, y un mínimo para un pH de 7. Para excluir los iones monovalentes, los referidos autores utilizan un buffer de trietilamina (TEA) y otro de trishidroxiaminometano (THAM).

ROTHSTEIN y DEMIS suponen que, en ausencia de K^+ , los iones H^+ modifican fundamentalmente la penetración de glucosa a través de la membrana celular. La naturaleza exclusivamente superficial del modo de acción de la concentración exterior de iones H^+ se apoya en la gran estabilidad del pH endocelular. CONWAY y DOWNEY (4) aportaron diversas pruebas indirectas de la estabilidad del pH endocelular entre valores de 5,8 y 6,2 durante la fermentación alcohólica. ROTHSTEIN y DEMIS (3) también encuentran un pH endocelular constante de 6,2

durante la fermentación de glucosa en medios adecuadamente tamponados para una serie de valores de pH entre 2 y 10. La constancia del pH interno también está de acuerdo con el hecho de que la respiración endógena y la respiración del etanol por la levadura son poco sensibles a los cambios de acidez del medio (3) y (5).

Por otra parte, el pH extracelular es capaz de influir considerablemente sobre la naturaleza de los productos finales de la fermentación y la proporción de los mismos. En medio ácido, los productos mayoritarios de la fermentación están constituidos por etanol, CO_2 y glucógeno. En cambio, en medio básico disminuye particularmente la cantidad de polisacárido y se forma glicerina en proporción considerable (1) y (3). Estos resultados son difícilmente compatibles con una acción estrictamente superficial de los iones H^+ y parecen indicar que, a despecho de la constancia del pH endocelular, la acidez del medio puede modificar directa o indirectamente diversos sistemas endógenos.

El presente trabajo constituye una aportación experimental en favor de la hipótesis de la influencia del pH del medio sobre procesos endocelulares. En él se exponen los resultados obtenidos al estudiar la influencia del pH del medio sobre la fermentación alcohólica endógena inducida por previa incubación de las células en solución de glucosa (6) y (7).

Material y métodos

Se utiliza levadura fresca de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*). La concentración celular se determina por medidas de sedimento constante según el procedimiento descrito en un trabajo anterior (6).

La producción de CO_2 se mide con la técnica *standard* de Warburg. Se consiguen condiciones anaeróbicas reemplazando el aire con nitrógeno previamente purificado (6) y (8).

Las células lavadas de levadura se mantienen durante una hora en glucosa al 5 % bajo una fuerte aireación (6). Después de varios lavados, se determina la concentración celular y se diluye hasta el grado requerido. Se colocan 2 ml de suspensión de levadura en cada frasco manométrico junto con 2 ml de buffer 0,04 M. Se mantiene durante media hora una corriente de nitrógeno en serie para desalojar el aire y, finalmente, se sigue la producción de gas en anaerobiosis (6, 7, 8).

Se utiliza el buffer universal de BRITTON y ROBINSON, constituido por ácido fosfórico, ácido acético, ácido bórico e hidróxido sódico. Pueden conseguirse unos pH comprendidos entre 1,88 y 11,98 sin cambiar la naturaleza de los iones presentes.

Los valores del pH se determinan electrométicamente con un Beckman G.

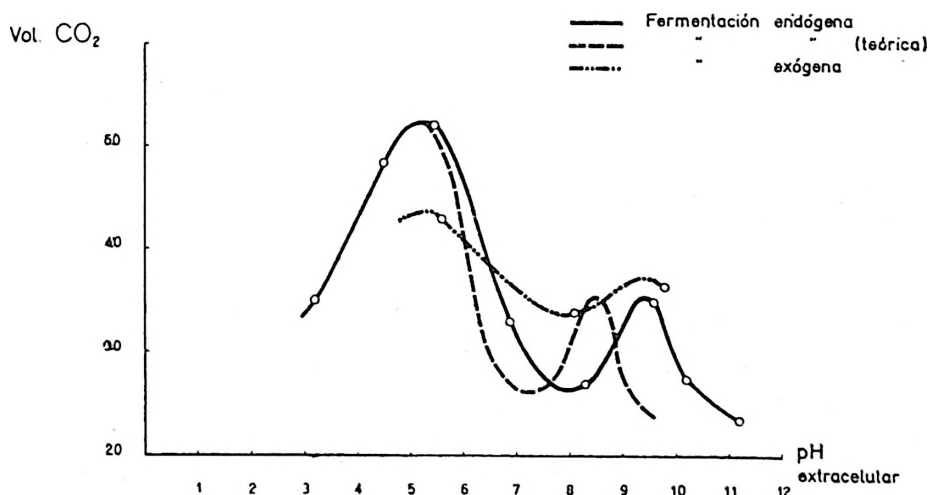
Para la determinación del glucógeno de la levadura se toma un volumen de la suspensión de células y se introduce en un matraz tarado con cuatro veces el volumen de la suspensión de alcohol absoluto, para impedir toda degradación ulterior. Se evapora a baño-maría y se seca a la estufa a 110° a peso constante, determinándose luego el peso seco de la muestra. Se procede a la determinación directa del glucógeno con el reactivo de la antrona, efectuando la lectura a 620 m μ . con un espectrofotómetro Beckman DU. Se utiliza el reactivo de antrona y la marcha analítica descritos por FRAGA (9). La reacción de la antrona se efectúa a 100° y la medida de las absorciones como indica HASSID y ABRAHAM (10).

Resultados

a) INFLUENCIA DEL pH EXTRACELULAR SOBRE LA PRODUCCIÓN ENDÓGENA DE CO_2 .

En el Cuadro I se consigna la producción de CO_2 obtenida para distintos valores del pH del medio. Los resultados de los tres grupos de ensayos no son directamente comparables, puesto que, de acuerdo con la naturaleza de la fermentación endógena inducida (6), sólo pueden compararse los volúmenes de gas obtenidos en una misma experiencia.

En la fig. 1 se halla la representación gráfica de la totalidad de los valores del Cuadro I. El trazado continuo de la curva



se ha obtenido efectuando traslaciones paralelas sobre el eje de las ordenadas de los tres puntos de cada experiencia independiente. Por tanto, los volúmenes de CO_2 señalados en el gráfico son arbitrarios, pero la forma de la curva debe describir bastante bien las modificaciones de la velocidad de producción de gas con la variación del pH extracelular.

La escala de pH de la fig. 1 y del Cuadro I se refiere a valores iniciales. Los pH superiores a 5,5 no se mantienen

CUADRO I

μl. de CO_2 desprendidos en atmósfera de nitrógeno en $\frac{1}{2}$ h. y a 30°C por 4 ml. de una suspensión en «buffer» de BRITTON y ROBINSON de células de levadura previamente lavadas
Concentración celular 0,03 ml/ml. (14,25 mg/ml.)
Influencia del pH exterior

μl. DE CO_2 DESPRENDIDOS EN $\frac{1}{2}$ H.

pH 8,30	pH 5,45	pH 3,20	pH 4,55	pH 6,90	pH 9,65	pH 8,9	pH 10,2	pH 11,2
30	52	35	24	8	12	11	10	6
23	53	35	24	10,5	10,5	11	8,5	6
Medias 27	52,5	35	24	9,25	11,25	11	9,25	6

constantes a lo largo del tiempo de anaerobiosis. La capacidad amortiguadora de la levadura es muy grande y superior a la del buffer. El pH va descendiendo tanto más de prisa cuanto más alcalino sea el medio. La curva de trazos representa una corrección teórica de este efecto y constituye una previsión aproximada de la curva que se obtendría con pH extracelulares constantes.

La figura 1 muestra claramente que la producción máxima de CO_2 por fermentación endógena tiene lugar a un pH extracelular de 5,5. Cuando el medio se vuelve más ácido, la producción de gas disminuye rápidamente. También disminuye si crece el pH extracelular, para encontrar un mínimo a un pH entre 7 y 8. Para un medio más alcalino se encuentra otro máximo entre pH 8,5 y 9,5, no tan acusado como el de la zona ácida. Para valores mayores del pH extracelular, la fermentación endógena decrece rápidamente.

b) INFLUENCIA DEL pH EXTRACELULAR SOBRE LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSA EXTERIOR.

La curva de la fig. 1 coincide en líneas generales con la obtenida por ROTHSTEIN y DEMIS (3), para la fermentación de

glucosa exterior a distintos pH. Esto nos hizo pensar que ambas curvas podrían corresponder al mismo proceso, esto es, a la influencia del pH extracelular sobre los mecanismos comunes a la fermentación exógena y endógena.

En el Cuadro II se encuentran los valores obtenidos para una confirmación de la supuesta coincidencia de las dos curvas referidas. La traslación de los resultados conseguidos al gráfico de la fig. 1 permite verificar que, efectivamente, para la fermentación exógena se obtiene una curva bifásica con los dos má-

CUADRO II

μl. de CO₂ desprendidos en atmósfera de nitrógeno por 4 ml. de una suspensión de células de levadura en glucosa tamponada con «buffer» de BRITTON y ROBINSON

Concentración celular 0,02 ml/ml.

Concentración de glucosa 0,6 %

Influencia del pH exterior

Tiempo después del paso de N ₂	pH		pH		pH	
	inicial 5,85	final 5,85	inicial 8,11	final 6,50	inicial 10,5	final 6,75
0-15 min.	141	143,5	118	116,5	127	123
Media	142,25		117,25		125	
30-45 min.	—	131	118	126	128	124
Media	131		122		126	

ximos y el mínimo sobre los mismos pH que en la fermentación endógena.

c) ACCIÓN DEL pH EXTERIOR SOBRE LA UTILIZACIÓN DEL GLUCÓGENO ENDOCELULAR.

En publicaciones anteriores hemos dado a conocer una serie de pruebas experimentales de la naturaleza endógena de la fermentación inducida por previa incubación de la levadura en glucosa (6) (7) (8) (11) (12). Por tanto, no resulta posible suponer que la curva de la fig. 1 exprese la influencia del pH sobre la fermentación de una glucosa exterior residual.

Por otra parte, si aceptamos que el pH afecta igualmente a la fermentación de la glucosa exterior que a la fermentación endógena, es preciso excluir toda acción de los iones H⁺ sobre la penetración de glucosa a través de la membrana celular.

Una prueba independiente de este último supuesto viene constituida por la acción del pH exterior sobre la utilización de las reservas glucídicas en anaerobiosis.

En el Cuadro III se refieren los resultados obtenidos en la determinación del contenido de glucógeno de las células antes de la incubación, en las células incubadas y después de una permanencia en anaerobiosis sin sustrato exterior y a dos pH distintos. El aumento de glucógeno durante la incubación es el correspondiente a una asimilación oxidativa (13) (14). Las

CUADRO III

Contenido de glucógeno (% sobre peso seco) en la levadura de pan

pH		Contenido inicial	Después de 1 h. de incubación	Después de 1/2 h. de paso de N ₂	Después de 1 h. en anaerobiosis
inicial	final				
5,64	5,52	6,8	13,6	10,2	8,3
8,15	6,91	6,8	13,6	12,7	12,1

reservas almacenadas se consumen rápidamente en el período de semianaerobiosis correspondiente al paso de nitrógeno y sigue disminuyendo más lentamente durante la hora consecutiva de anaerobiosis. No obstante, la utilización de glucógeno es mayor para un pH extracelular de 5,64 a 5,52 que para un pH de 8,15 a 6,91, de un modo análogo a la producción correspondiente de CO₂.

El glucógeno utilizado durante el período de anaerobiosis es mayor que el necesario para justificar la producción endógena de CO₂. Este hecho está de acuerdo con los resultados de SCOTT, JACOBSON y RICE (2) que ponen de manifiesto la utilización de glucógeno en células de levadura sin incubación, las cuales producen una cantidad de CO₂ totalmente despreciable. Probablemente, la parte del glucógeno utilizado que no aparece como etanol y CO₂ se halla en compuestos intermedios o incluso bajo la forma de un producto final distinto al CO₂ y etanol como han supuesto TANG y LIN (15).

Para nuestro objeto, los resultados referidos confirman efectivamente una acción del pH extracelular sobre la utilización del glucógeno paralela a la obtenida para la fermentación alcohólica endógena.

Discusión

Los resultados anteriores nos llevan a la conclusión general de que la concentración extracelular de iones H⁺ es

capaz de modificar algunos de los procesos endocelulares, comprendidos en la movilización del glucógeno y la fermentación alcohólica. En cambio, la penetración de glucosa a través de la membrana celular parece ser poco sensible a las variaciones del pH del medio, de acuerdo con la semejanza del efecto conseguido sobre fermentación exógena y endógena.

El hecho de que la fermentación endógena también presente un óptimo en la zona ácida y otro en la zona alcalina, análogos a los que manifiesta la fermentación exógena, impide poder relacionarlos con la hexoquinasa alcalina y una hipotética hexoquinasa ácida como había propuesto ROTHSTEIN (3). Como en la célula de levadura nunca se acumula glucosa (3), el aumento o disminución de la velocidad de fermentación debe condicionar un correlativo aumento o disminución de la absorción de glucosa. Por esto, el pH exterior pone de manifiesto un efecto sobre la utilización de glucosa exterior semejante al que lleva a cabo sobre la producción de CO_2 (3). Esto sólo dejará de cumplirse cuando se sature la capacidad de absorción de glucosa (3) (11) (15).

Los resultados anteriores también parecen poner de manifiesto una considerable permeabilidad de la membrana celular de la levadura a los iones H^+ . En presencia de K^+ extracelular, el paso de iones H^+ a través de la membrana se vería restringido por un efecto de competencia controlado probablemente por los grandes requerimientos de K^+ para la formación de glucógeno (2).

La coexistencia de un pH endocelular constante con la sensibilidad a las variaciones de pH exterior encontrada para la fermentación endógena nos lleva a considerar la posibilidad de dos alternativas :

a) Que todo el aparato enzimático de la fermentación se halle situado muy cerca de la superficie celular.

b) Que los cambios de la velocidad de fermentación no sean consecuencia de una acción directa de los iones H^+ , sino de los cambios llevados a cabo en la célula para compensar su entrada. A este respecto, cabe considerar en favor de la primera alternativa el preparado insoluble de levadura obtenido por ROTHSTEIN, DEMIS y BRUCE (3) que mantiene casi inalterada su potencia fermentativa después de haber separado una fracción soluble que alcanza el 40 % del peso seco de la célula de levadura. No obstante, la existencia de este «cortex» celular conteniendo el mecanismo fermentativo de la levadura requeriría para su aceptación de ulteriores confirmaciones.

El supuesto de que los iones H^+ no penetraban dentro de la célula había servido de fundamento para localizar enzimas en la superficie celular, cuando la actividad de las mismas estaba

influida por el pH del medio (16). Después de los resultados obtenidos en el presente trabajo, la aplicación de este criterio es susceptible de las mayores reservas.

Resumen

Utilizando el tampón universal de Britton y Robinson se encuentra que el pH extracelular modifica la fermentación alcohólica endógena de acuerdo con una curva bifásica, con un óptimo en la zona ácida y otro en la zona alcalina (fig. 1).

El efecto del pH extracelular sobre la fermentación de glucosa exterior es completamente análogo al de la fermentación endógena. Este resultado excluye la posibilidad de una acción de los iones H^+ preferentemente superficial.

La utilización del glucógeno en anaerobiosis también es sensible al pH extracelular, siendo más activa en medio ácido que en medio alcalino.

La coexistencia de un pH endocelular constante (3) (4) (5) con los resultados anteriores lleva a considerar la posibilidad de que todo el aparato enzimático de la fermentación se halle situado muy cerca de la superficie celular o que los cambios de velocidad de fermentación sean una consecuencia indirecta de la entrada de iones H^+ en el protoplasma.

Summary

The effect of extracellular pH on endogenous alcoholic fermentation in yeast

The fermentation of glucose by yeast is a process singularly sensible to the extracellular pH when the medium does not contain monovalent ions (3). According to the constancy of the endocellular pH (3) (4) (5), ROTHSTEIN and DEMIS (3) suppose that in the absence of K^+ , H^+ ions modify the penetration of glucose through the cellular membrane. This conclusion results hardly compatible with the fact that the extracellular pH be also capable of considerably modifying the proportion and nature of the final products of fermentation (1) (3).

In the present work the influence of the extracellular pH over the endogenous alcoholic fermentation is studied (6) (7). The results obtained seem to exclude the possibility of a direct intervention by the H^+ ions over the penetration of glucose and are in agreement with an effect fundamentally endogenous.

A fresh baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) is used. The endogenous fermentation is induced by previous incubation in 5 % glucose (6) and the production of CO_2 is measured by Warburg's standard technique (6) (7). Britton's and Robinson's buffer is used (pH 1.88 to 11.98). The glycogen is determined with the anthrone reagent (9) (10).

In Table I and figure 1 the production of CO_2 obtained for

different pH values of the medium are shown. The dash curve on figure 1 represents a theoretical correction of pH variations during the experiments.

The values on Table II (see figure 1) allow the appreciation that the extracellular pH develops a comparable effect over the exogenous fermentation of glucose. This result makes you think that both curves can represent the same effect, that is, the extracellular pH influence over mechanisms common to both the exogenous and endogenous fermentation.

Table III shows that the utilization of glycogen in anaerobiosis is greater for an extracellular pH of 5.64 to 5.52 than for a pH of 8.15 to 6.91.

The preceding results lead us to the general conclusion that the extracellular H^+ ions concentration is capable of modifying some of the endocellular processes included in the mobilization of glycogen and the alcoholic fermentation. On the other hand, the penetration of glucose through the cellular membrane seems to be scantily sensible to the pH variations of the medium, in accordance with the similarity of effect obtained over the exogenous and endogenous fermentation.

The preceding results also seem to manifest a considerable permeability of the cellular membrane of yeast to H^+ ions.

The coexistence of an endocellular pH constant with the sensibility of the endogenous fermentation to the variations of the exterior pH lead to endogenous fermentation to the variations of the exterior pH lead to considering the possibility of two alternatives :

- a) that all of the enzymatic apparatus of fermentation is located very near to the cellular surface, or
- b) that the changes in rate of fermentation are not the consequence of the H^+ ions, but of the changes carried out on the cell to compensate its entrance.

The supposition that the H^+ ions did not penetrate in the cell had served as a base for localizing enzymes on the cellular surface, when the activity of the same was influenced by the medium's pH (16). After the results obtained on the present work, the application of this points of view is problematic.

Bibliografía

- (1) NORD, F. F. y WEISS, S. : Yeast and Mold Fermentations. *The enzymes*. (Ed. S. B. Sumner and K. Myrback). **2**, 684, 1951.
- (2) SCOTT, G. T., JACOBSON, M. A. y RICE, M. R. : *Archiv. Biochem.* **30**, 282, 1951.
- (3) ROTHSTEIN, A. : The enzymology of the cell surface. *Protoplasmatologia*. Springer-Verlag, Wien, 1954

- (4) CONWAY, R. J. y DOWNEY, M. : *Biochem. J.*, **47**, 355, 1950.
- (5) BARRON, E. S. G., ARDAO, M. I. y HEARON, M. : *J. Gen. Physiol.*, **34**, 211, 1950.
- (6) PARÉS, R. : *R. esp. Fisiol.*, **12**, 73, 1956.
- (7) PONZ, F. y PARÉS, R. : Membrane inhibitors of glucose transfer in yeast. 3 ème Congr. Internat. de Biochim. Bruxelles, 1955.
- (8) PARÉS, R. : *R. esp. Fisiol.*, **12**, 129, 1956.
- (9) FRAGA, F. : *Invest. Pesquera*, **111**, 69, 1956.
- (10) HASSID, W. Z. y ABRAHAM, S. : Chemical procedures for analysis of polysaccharides. *Methods in Enzymology* (Ed. S. P. Colowick and N. Okaplan), **3**, 34, 1957.
- (11) PARÉS, R. : *R. esp. Fisiol.*, **12**, 153, 1956.
- (12) PARÉS, R. : *R. esp. Fisiol.*, **12**, 321, 1956.
- (13) WINZLER, R. J. y BAUMBERGER, J. P. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **12**, 183, 1938.
- (14) PICKETT, M. J. y CLIFTON, C. E. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **21**, 77, 1943.
- (15) HOPKINS, R. H. y ROBERTS, R. H. : *Biochem. Jour.*, **29**, 915, 1935.
- (16) MANDELS, G. R. : *Exper. Cell. Research*, **5**, 48, 1953.