

1 9 8 6 - 1

REG. No. 079423572

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



ESTUDIO DEL RENDIMIENTO EN LA PRODUCCION DE
ALCOHOL EN UNA CEPA DE Zymomonas mobilis AISLADA
DE JUGO DE CAÑA.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
ANTONIA GUTIERREZ MORA
GUADALAJARA, JALISCO. 1987

A DIOS

Que hizo lograr una de mis metas

A MIS PADRES

**Por su preocupación y dedicación
en asegurar mi porvenir
dándome la oportunidad de obtener
una profesión.**

A MIS HERMANOS

**Que de alguna manera
colaboraron en la realización
de este trabajo.**

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO:

A la familia Prieto Mayoral por la ayuda que me brindaron durante mis estudios.

Al Biólogo Arturo Manzo Fuentes por los consejos y la orientación que me dió para llevar a cabo este trabajo.

Al M. en C. Rogelio Camacho García por otorgarme sus conocimientos y ser una guía en la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco por permitirme realizar mi tesis profesional en sus instalaciones.

A todos mis compañeros de grupo, en especial a Ana Luz y Luz María, a Lourdes y demás compañeros de CIATEJ.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO
EN EL LABORATORIO DE BANCO DE
CEPAS Y GENES DEL DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGIA Y FERMENTACIONES DE
LA DIVISION DE BIOTECNOLOGIA.
CENTRO DE INVESTIGACION Y
ASISTENCIA EN TECNOLOGIA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO. A.C.

INDICE

	PAG.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
HIPOTESIS	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
ANTECEDENTES	8
MATERIAL Y METODOS	51
RESULTADOS	86
DISCUSION	113
CONCLUSIONES	124
BIBLIOGRAFIA	128

INTRODUCCION

Hoy en día, el problema energético a nivel mundial cada vez va en aumento. Nuevas fuentes están siendo empleadas con el objeto de diversificar el abasto de energía cuya demanda se ha vuelto un problema de primer orden. Las soluciones a esto se han suscitado en distintas ramas de la Ciencia y la Tecnología. En las últimas décadas la Biotecnología ha venido ofreciendo nuevas y mejores alternativas para industrias como la alimenticia, farmacéutica, agrícola, minera y de alcohol, entre otras más.

Es específicamente en la Industria de Alcohol en donde la Biotecnología ha desarrollado procesos novedosos a los ya existentes en materia de fermentación haciendo que estos aumenten su productividad, eficiencia y rentabilidad.

Tradicionalmente, la producción se ha realizado mediante cultivos

fermentados de la levadura Saccharomyces cerevisiae a partir de fuentes de sacarosa.

Recientemente, se ha observado una mayor producción de etanol por parte de una bacteria del género Zymomonas, la cual presenta niveles de hasta 10% más que la obtenida por levaduras.

Aunado a esto se han diseñado nuevos reactores de fermentación con el fin de aumentar la eficiencia del sistema y aprovechar la materia prima al máximo. Sistemas de fermentación en continuo y células inmobilizados son ejemplos de las alternativas que ofrece la Biotecnología en esta rama.

Conociendo tanto las características biológicas, bioquímicas y genéticas de Zymomonas así como el diseño de nuevos biorreactores se podrá incrementar enormemente el nivel de producción de etanol, ofreciendo una alternativa energética a futuro así como diversificando más a la Industria Azucarera, y favoreciendo

sustancialmente a las Industrias Tequilera, Farmacéutica y Alimenticia del País.

OBJETIVOS

Aislar y caracterizar Zymomonas mobilis de jugo de caña.

Comparar el rendimiento de la producción de la cepa aislada con una cepa de referencia.

HIPOTESIS

Al aislar Zymomonas mobilis a partir de jugo de caña se podrían determinar los rendimientos de producción de etanol así como encontrar especies mutantes que se desarrollen en concentraciones elevadas de sacarosa.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a los altos costos de energía y a la escasez de energéticos se han desarrollado un gran número de procesos para la producción de los mismos.

La fermentación para producción de etanol es un proceso desarrollado en países donde sus recursos energéticos están en decadencia. Este está siendo utilizado como combustible en lugar de gasolina.

En nuestra región que es la de mayor producción de alcohol, utilizado en bebidas embriagantes a partir de agaves, las fermentaciones se llevan a cabo con cepas de levaduras comúnmente Saccharomyces cerevisiae.

En fermentaciones con Zymomonas mobilis se ha reportado una

produccion mayor de etanol, alcanzando una eficiencia en la hidrólisis de sacarosa hasta de 97-98% siendo que la mayor eficiencia reportada en levaduras es de 90%.

ANTECEDENTES

ENERGETICOS

A partir de 1973, los energéticos se convirtieron sin duda en productos de gran interés a nivel mundial, no solo porque presentan un gasto en cualquier presupuesto nacional, si no porque han establecido una mayor diferencia entre quienes los poseen y quienes no (Moreira y Goldemberg, 1981).

La sustitucion de ciertas fuentes de energía por otras más abundantes, de acceso o de uso más convenientes, es un fenómeno bien conocido en la historia de las naciones desarrolladas: La madera que era la principal, y prácticamente única fuente de energía usada en gran escala por el hombre hasta el siglo XIX (Fig. No. 1) fue sustituida por el carbón mineral y este por petróleo y el gas natural más recientemente (Moreira y Goldemberg, 1981).

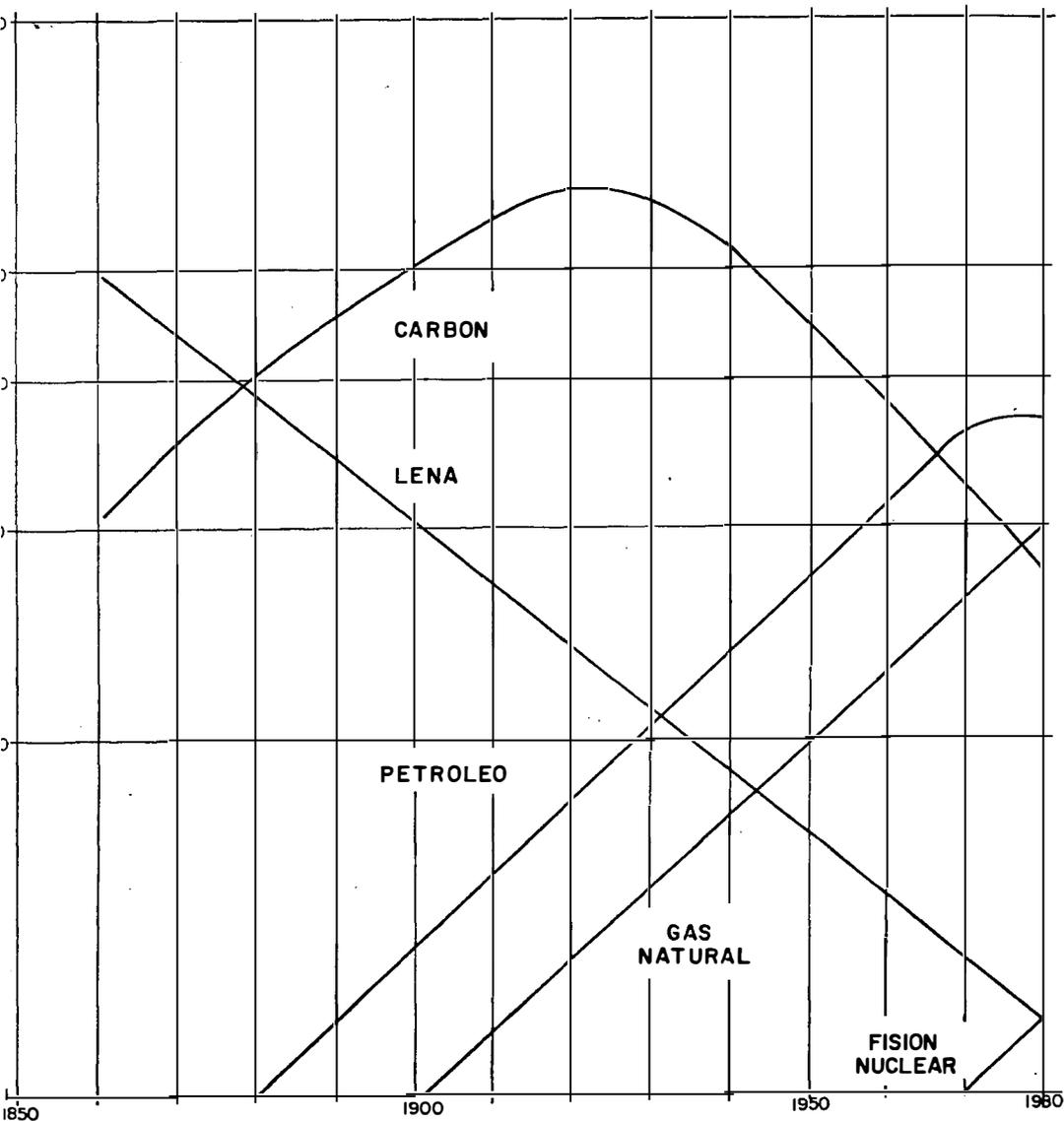


FIG. I EVOLUCION HISTORICA DE LAS FUENTES DE ENERGIA.

Nuestra sociedad industrial, se alimenta, funciona y produce a base de petróleo. si el abastecimiento de este cesara de pronto, retrocederíamos a las condiciones del siglo XVIII o bien a tiempos más remotos en donde los avances tecnológicos de hoy no eran ni siquiera concebibles (CONACyT, 1980).

El petróleo es un recurso no renovable, cuyo agotamiento en términos globales ya está a la vista, la producción de este será insuficiente para hacer frente a la creciente demanda (CONACyT, 1980).

En un estudio realizado por el profesor Meadows en 1972, "Los límites del crecimiento" y el equipo WAES "Global prospect 1985-2000" en 1977, ambos del Instituto Tecnológico de Massachusetts, así como los análisis energéticos llevados a cabo por la Comisión de Estudios de la AIE (Agencia Internacional de Energía), a finales de la década de los 70's coinciden en fijar el agotamiento de los recursos petrolíferos para mediados del siglo XXI (Deleito y Cabrero, 1984).

La demanda de este tipo de energía será superior a la oferta para finales del siglo (Fig. No. 2), aunque sus precios sufran un incremento del 50% en el transcurso de los próximos 20 años (Deleito y Cabrero, 1984).

El agotamiento del petróleo a llevado a producir nuevas fuentes de energía: el carbón, energía nuclear, biomasa, energía solar del mar y eólica (Deleito y Cabrero, 1984).

Carbón

El carbón tiene la gran ventaja, de que sus yacimientos suelen encontrarse próximos a las zonas industrializadas y que el volumen de sus reservas se estima en 3 veces las del petróleo y las del gas natural juntas (Moreira y Goldemberg, 1981).

Aunque las dificultades de explotación y transporte y su alto poder contaminante (emisiones de SO₂ y NO) imponen por el momento, serias limitaciones al desarrollo del carbón, sin

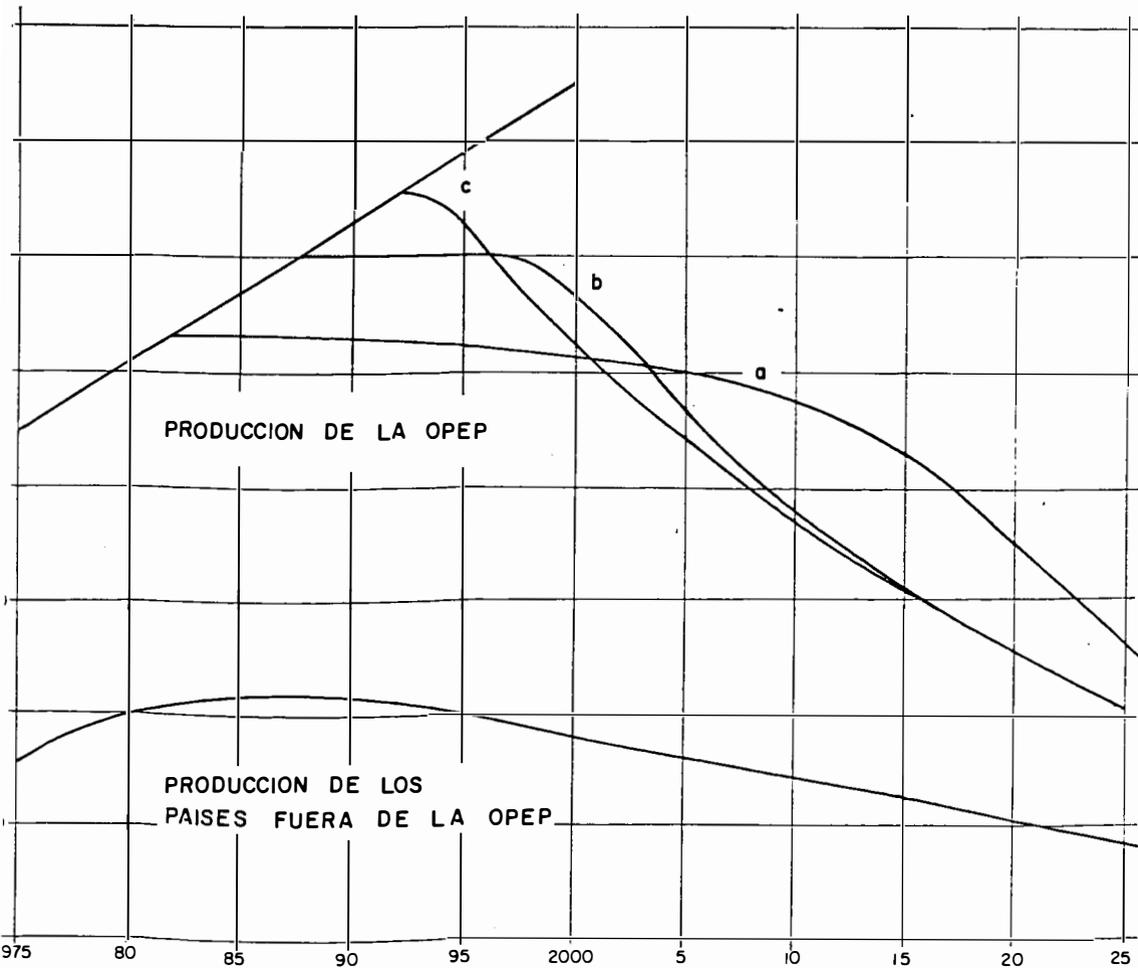


FIG. 2
PREVISION SOBRE LA DEMANDA DE PETROLEO
EN LAS PROXIMAS DECADAS PARA TRES
NIVELES DE DESARROLLO ECONOMICO
DIFERENTES.

embargo. se considera que estos inconvenientes pueden solucionarse a corto plazo en la introducción de nuevas tecnologías de explotación y aprovechamiento (Deleito y Cabrero. 1984). La gasificación del carbón es un proceso que se viene aprovechando desde hace tiempo, mediante el cual se transforma el mineral en un gas sintético de alto poder calorífico (9.500 kcal/kg) compuesto por metano y monóxido de carbono, sometiéndolo a un tratamiento de oxigenación a elevadas presiones y temperaturas (Deleito y Cabrero. 1984).

La licuefacción es otra posibilidad que transformaría el carbón en un combustible líquido de baja calidad pero apto para ser quemado en centrales térmicas, o incluso en vehículos de transporte. El proceso consiste en una serie de hidrogenaciones seguidas por depuraciones y filtrados. Tanto la gasificación como la licuefacción pueden facilitar considerablemente la explotación y el transporte del carbón y es muy posible que a finales del siglo será una de las principales fuentes de energía (Deleito y Cabrero. 1984).

Energía Nuclear

De todas las energías alternativas al petróleo, la de origen nuclear es la que a tomado mayor interés y el mayor volumen de inversiones de los programas de desarrollo energético (Deleito y Cabrero, 1984).

La energía nuclear se basa en el calor generado por la fisión de determinados isótopos radiactivos sometidos a bombardeos neutrónicos (Deleito y Cabrero, 1984).

El programa de desarrollo nuclear se inició con buenos resultados dado que los bajos costos por kilowatt/hora que se estimaba en principio para este tipo de energía, sin embargo se han presentado problemas como el agotamiento de las reservas de Uranio. Actualmente la demanda de Uranio es de 30 000 T/año, inferior a la oferta que es de 50 000 t/año, pero se espera una estabilización oferta-demanda a finales del siglo, a partir de

ese momento las reservas se irán agotando en el transcurso de los primeros años (Deleito y Cabrero, 1984).

Biomasa

La biomasa aprovecha los residuos de materia orgánica con elevado contenido de hidratos de carbono. Aunque la cantidad de residuos que se producen es considerable (0.1 t/año por persona en los países poco desarrollados y 0.25 t/año en los más avanzados) las posibilidades de este recurso energético son limitadas y solo presentan cierto interés en zonas rurales (Deleito y Cabrero, 1984).

Energía Solar

La energía solar aprovecha la radiación del sol que llega a la tierra. esta se transforma en energía térmica con rendimientos del 50%. utilizando colectores planos o concentradores. o bien en electricidad mediante sistemas fotovoltaicos con rendimientos del

15% (se han construido plantas térmicas, que producen electricidad a partir de un ciclo clásico de vapor alimentado por energía solar) (Deleito y Cabrero, 1984).

La energía solar se utiliza también en sistemas de calentamiento de agua a bajas temperaturas para usos domésticos e industriales, pero para instalaciones de este tipo se requieren altas inversiones, así como para la producción de electricidad a partir de esta fuente (Deleito y Cabrero, 1984).

Energía del Mar

La energía contenida en el mar se puede aprovechar de diferentes formas:

Como energía térmica, utilizando la diferencia de temperatura entre las aguas de superficie y las aguas profundas, diferencia que en las aguas subtropicales pueden alcanzar los 20-30°C.

Como energía mecánica, aprovechando el movimiento de las mareas

mediante sistemas de boyas flotantes, o las corrientes marinas mediante turbinas ancladas en el fondo del mar.

Esta energía no está bien desarrollada, en parte debido a las elevadas inversiones que se requieren y los problemas técnicos asociados a la salinidad del mar (Deleito y Cabrero, 1984).

Energía Eólica

La energía eólica aprovecha la parte de la radiación solar que es absorbida por la atmósfera y transformada en energía cinética.

La energía contenida en los vientos es aproximadamente el 2% del total de la energía solar que alcanza la tierra, aunque prácticamente sólo se utiliza una pequeña cantidad.

De todas las energías renovables, la solar y la eólica son las que se encuentran mejor distribuidas. Desde el punto de vista

económico. la producción en masa de aerogeneradores eólicos. es la clave para que los precios resulten competitivos con otras fuentes de energía. La mayor dificultad de las aplicaciones de tipo solar y eólico es la irregularidad de su producción energética. que obliga a disponer de costosos sistemas de almacenamiento (Deleito y Cabrero, 1984).

Se ha calculado que para fines del siglo la demanda de energía a nivel mundial será abastecida en un 10% con el uso de estos energéticos (Fig. No. 3).

Una de las posibilidades más económicas para producción de combustibles no fósiles parece ser la producción de etanol por fermentación (Ramírez, 1985).

La producción de este hidrocarburo. con propósitos energéticos esta bien establecida a nivel industrial en varios países (Brasil, Estados Unidos, India, Nueva Zelanda, Unión Soviética.

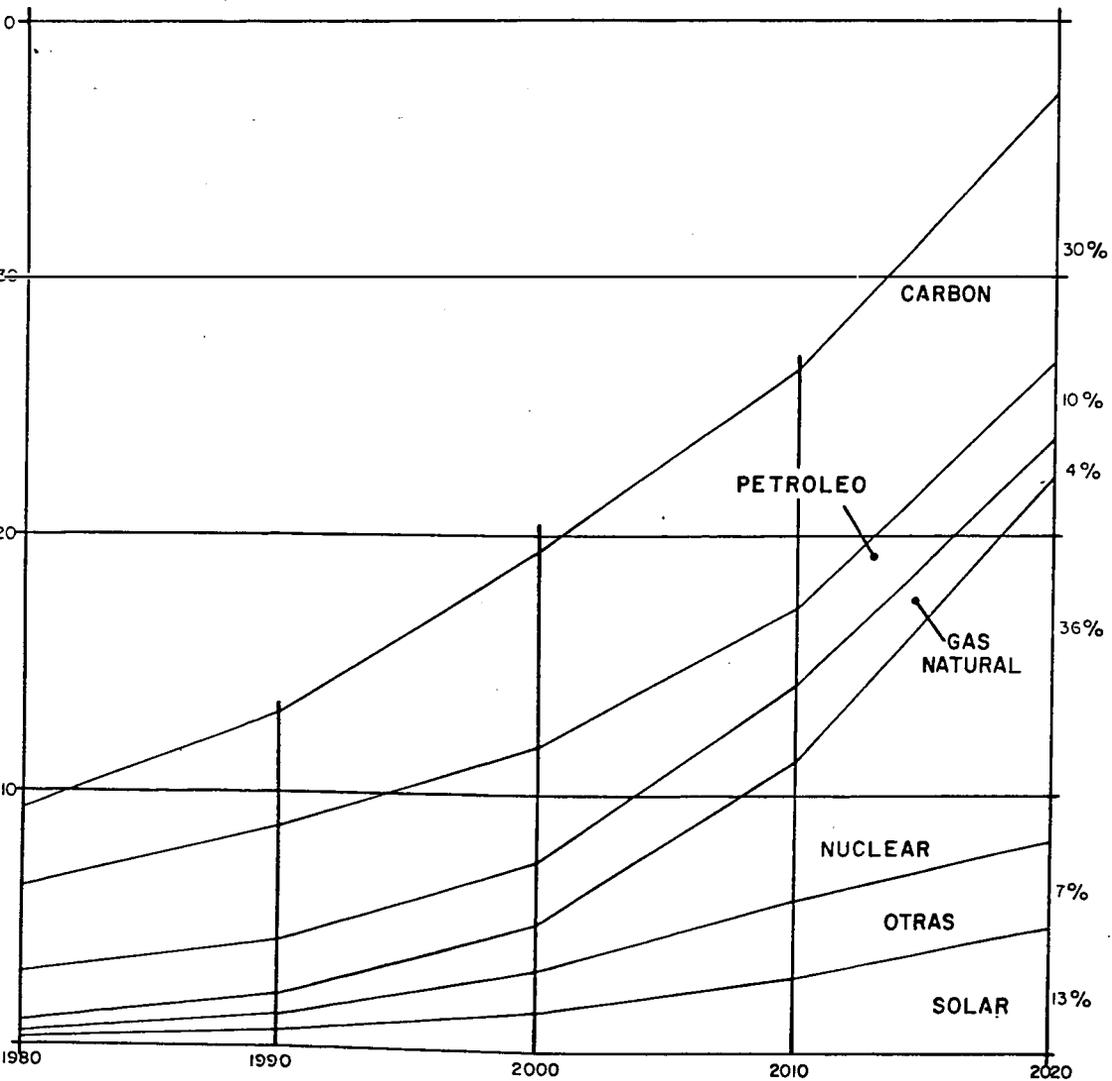


FIG. 3

EVOLUCION DE LA DEMANDA DE LAS
 DIFERENTES FUENTES DE ENERGIA,
 CUYA UTILIZACION SERA ECONOMICA
 DURANTE LAS PROXIMAS DECADAS.

entre otros). Se emplea como combustible en sustitución de, o mezclado con, gasolina para mover vehículos reduciendo de este modo el consumo de gasolina (Moreira y Goldemberg, 1981).

Entre los usos más importantes de etanol se encuentran: Bebidas embriagantes (obtenidas a partir de jugos de agaves, caña de azúcar, uva, etc.), se utiliza en la industria como disolvente y en la medicina como antiséptico.

FERMENTACION

Las tecnologías de fermentación alcohólica y la destilación (producción de vinos y aguardientes) son muy antiguas como su empleo en la producción de energéticos se originó posiblemente a mediados del siglo XIX (Ramírez, 1985).

La palabra fermentación es de origen latino y en sentido escrito se ha usado para designar la transformación del jugo de uva en vino. La palabra latina "fervere" significa "hervir" y se usó

para describir el aspecto efervescente del jugo de la uva en fermentación. La primera explicación bioquímica del proceso por el cual el azúcar en solución acuosa es descompuesta en alcohol y en gas carbónico, en virtud de la acción de las células vivas de levaduras, la dió el químico francés Louis Pasteur el cual vió que mientras descomponen el azúcar en ausencia de aire, las células de levaduras viven y se propagan en el líquido en fermentación, y llamó al proceso de la fermentación alcohólica "vida sin oxígeno". Pasteur, explicó que por la disposición de las células de levadura de la misma manera que se producen los tejidos de los animales y las plantas que respiran para satisfacer sus necesidades metabólicas cuando son oxidados compuestos orgánicos en presencia de aire (Kirk y Othmer, 1962).

En la actualidad se le llama fermentación alcohólica a la formación de alcohol etílico a partir de glucosa y otros azúcares como la sacarosa, por la acción de los fermentos de la levadura. La fermentación alcohólica es producida por el compuesto

enzimático llamado zimasa, elaborada por varios microorganismos (Kirk y Othmer, 1962).

En la elaboración de bebidas alcohólicas la formación de productos secundarios y su naturaleza determinan los caracteres y la calidad del producto final: se forman aldehídos y ésteres, alcoholes superiores que constituyen el aceite de fusel y algunos ácidos grasos (Crueger y Crueger, 1984).

La fermentación se lleva a cabo en tres pasos: el primero es el período de incubación, durante el cual se multiplican las células, en el segundo período que es la "fermentación" el azúcar se convierte en alcohol y bióxido de carbono y el tercer período es la "postfermentación" que transforma a la dextrinas en azúcar fermentable que a su vez se convierte en alcohol (Kirk y Othmer, 1962).

La fermentación alcohólica es una de las más importantes pero

existen otros tipos de fermentación para la producción de metabolitos importantes. fermentación de ácido láctico y ácido acético. como ejemplos.

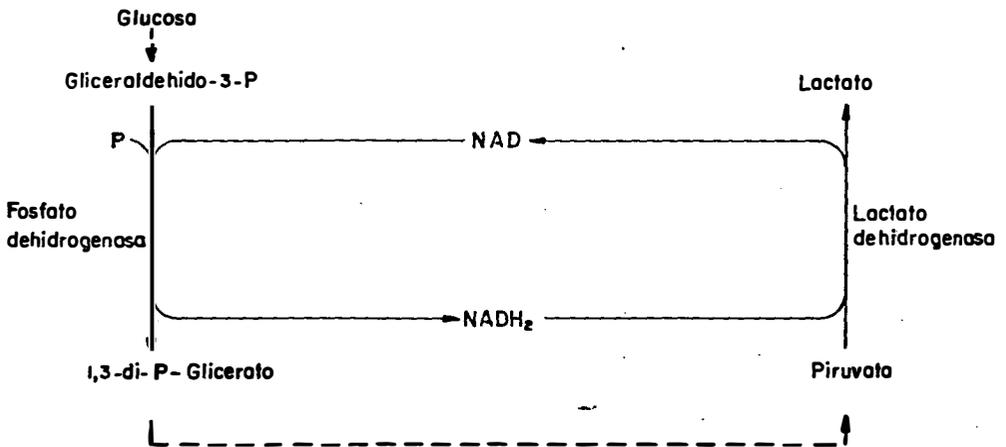
Fermentación de Acido Láctico

Las bacterias homofermentativas productoras de ácido láctico hidrolizan los azúcares compuestos y las dextrinas y los convierten en azúcares (hexosas), a expensas de los cuales producen ácido láctico (Crueger y Crueger, 1984).

Como la fermentación alcohólica, después de fosforilar la hexosa, el organismo la descompone en dos moléculas de triosa-fosfato y convierte a este en ácido pirúvico con la formación de NAD reducido. El ácido pirúvico es reducido después a ácido láctico (Crueger and Crueger, 1984) (Fig No. 4.)

El ácido láctico es producido industrialmente haciendo fermentar malta de maíz, suero de leche, melazas, etc. Los microorganismos

Producción de ácido láctico a partir de glucosa



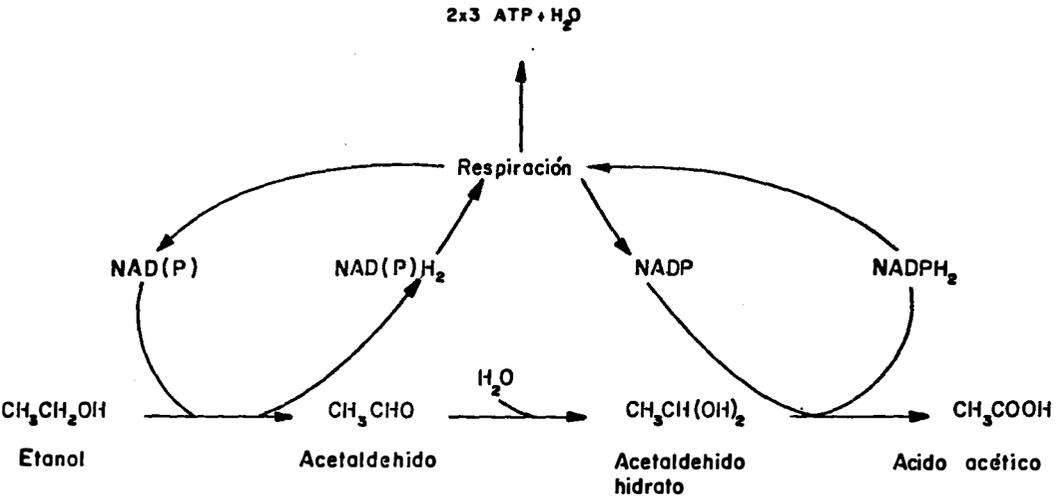
que tienen mayor importancia a nivel industrial para este tipo de fermentación son *Lactobacillus delbrueckii*, *L. leichmannii*, *L. bulgaricus* o mezclas de los mismos. (Kirk y Othmer, 1962).

Fermentación de Acido Acético

La oxidación del etanol al ácido acético (acetificación) por diversas especies de *Acetobacter* es realizada en dos pasos: 1. Deshidrogenación del etanol y conversión en aldehído: 2. Deshidrogenación del hidrato de acetaldehído y conversión en ácido acético (Peppler and Perlman, 1979) (Fig. No. 5).

Las soluciones que contienen 6-12% de etanol y nutrientes (vinos de frutas, cerveza de malta y de granos) se convierten espontáneamente en vinagre cuando se exponen al aire. Sin embargo, se obtiene una mejor acetificación empleando métodos regulados en los cuales se añaden pequeñas porciones de la solución en forma continua a un recipiente que contenga vinagre y los organismos apropiados.

Oxidación de etanol a ácido acético



El Acetobacter, que no forma esporas, frecuentemente móvil, y por lo general en bastones cortos, se presenta solo o en cadenas. Sus especies pueden dividirse en 2 grupos: 1. Las que oxidan el ácido acético y lo transforman en dióxido de carbono y agua. 2. Las que no oxidan el ácido acético (Peppler y Perlman, 1979).

La producción de alcohol cobró gran importancia a consecuencia de los elevados precios del petróleo. Desde la década de los 70's se han hecho grandes esfuerzos orientados al mejoramiento del proceso en sus tres niveles: El microorganismo, la fermentación y la recuperación (Crueger and Crueger, 1984).

Los microorganismos más antiguamente usados para la producción de etanol son las levaduras (Murillo y col., 1984). Actualmente se conocen cerca de 40 géneros empleados en la fermentación alcohólica (Concheiro, 1985), entre ellas Saccharomyces cerevisiae, S. carlsbergensis, Candida sp., Kluyveromyces sp. entre otros (Ramírez, 1985). Sin embargo desde hace

aproximadamente diez años ha tomado importancia una bacteria del género Zymomonas (Murillo y col., 1984).

Uno de los logros más importantes de la biotecnología es la producción de etanol. se han desarrollado diversos métodos orientados a la producción de este hidrocarburo a partir de fuentes renovables ricas en azúcares como glucosa y sacarosa (caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo dulce, maíz, trigo, etc) (Concheiro, 1985).

BIOLOGIA DE ZYMONAS

Zymomonas fue descrita primeramente por Baker y Hillier en 1912.

fue encontrada como un agente causante de la enfermedad de la cidra (Montenecourt, 1985).

El descubrimiento de esta bacteria se le atribuye a Lindner en 1928, quien aisló este microorganismo de pulque. Lindner lo llamó Thermobacterium mobile (Montenecourt, 1985).

Zymomonas es un género de afiliación incierta que a partir de su descubrimiento su nomenclatura a variado constantemente tal como se muestra en la Tabla No. 1.

<u>Thermobacterium mobile</u>	Lindner (1928)
<u>Pseudomonas lindneri</u>	Kluyver y Hoppenbrouwers (1931)
<u>Zymomona mobile</u>	Kluyver y van Niel (1936)
<u>Zymomonas mobilis</u>	Kluyver y van Niel (1936)
<u>Achromobacter anaerobium</u>	Shimwell (1937)
<u>Saccharobacter</u>	Shimwell (1937)
<u>Saccharomonas anaerobia</u>	Shimwell (1950)
<u>Saccharomonas lindneri</u>	Shimwell (1950)
<u>Zymomonas anaerobia</u>	Carr (1964)
<u>Zymomonas mobilis</u> var <u>recifensis</u>	Goncalves de Lima (1970)
<u>Zymomonas congolensis</u>	Van Pee y Swings (1971)

Tabla No. 1. Nomenclaturas asignadas a Zymomonas (1928-1971).

Las fuentes en las que se encuentra *Zymomonas* por lo general son ricas en carbohidratos. tales como. caña de azúcar, agaves, sidras. y se ha reportado en miel de abeja (Buchanan and Gibbons, 1984).

El género *Zymomonas* comprende una sola especie *Z. mobilis* y dos subespecies: *Z. mobilis mobilis* Lindner, 1928 y *Z. mobilis pomacii* Millis, 1956 (Montenecourt, 1985; Buchanan and Gibbons, 1984).

Morfología

Colonia

Colonias con bordes enteros. blancas o cremosas. de 1.5 mm de diámetro para la subespecie *mobilis* y 1.0 mm para la subespecie *pomacii* después de 7 días de crecimiento a 30°C. su elevación puede ser convexa o umbonada (Montenecourt, 1985; Buchanan and Gibbons, 1984).

Celular

Bacilos cortos ocasionalmente elipsoidales. se encuentran generalmente en pares. pero pueden formar rosetas, conglomerados o cadenas. no forman esporas ni cápsulas. miden de 2.6 μ m de longitud y de 1.0 a 1.4 μ m de diámetro (Montenecourt, 1985; Buchanan and Gibbons, 1984).

Fisiología

Zymomonas es una bacteria Gram (-) por lo general no es mótil cuando lo es posee de 1 a 4 flagelos lofótricos. aneróbicas facultativas y algunas cepas anaerobias obligadas. son capaces de fermentar 1 mol de glucosa a cantidades equimolares de etanol y bióxido de carbono. Algunas cepas utilizan la sacarosa, pero no son capaces de metabolizar la rafinosa, xilosa, ramnosa, galactosa, manosa, sorbitol, arabinosa, dulcitol y lactosa (Buchanan and Gibbons, 1974, 1984).

Su temperatura óptima de crecimiento es de 30oC, no sobreviven a temperaturas mayores de 60oC. El pH de crecimiento óptimo para este género es de 4.0 - 7.0. a pH menor de 3.05 y mayor de 8.0 inhibe su crecimiento. Zymomonas tolera concentraciones de cloruro de sodio de 0.5 y 1.0%, en concentraciones de 2.0% de esta sal el crecimiento es nulo. además es tolerante a altas concentraciones de etanol y glucosa. 5.5, 7.7% y 20, 40% respectivamente.

Requiere de vitaminas como pantotenato y biotina para su crecimiento. además de concentraciones de extracto de levadura y peptona mayores de 0.5% (Buchanan and Gibbons, 1974,1984).

La producción de la enzima catalasa en Zymomonas es positiva y la oxidasa negativa. el acetil-metil-carbinol puede presentarse en algunas cepas de igual forma que el H₂S. La producción de indol, la hidrólisis de gelatina, la reducción de nitratos (Buchanan and Gibbons, (1984) y la prueba del rojo de metilo (Buchanan and Gibbons, 1974) son negativos para este género. la reducción del

azul de metileno. la tionina y el trifeniltetrazolio son positivos en este caso (Buchanan and Gibbons. 1984).

Zymomonas al igual que otros géneros es resistente a algunos antibióticos. Buchanan y Gibbons en 1984 reportan a esta bacteria como resistente a Gentamicina, Kanamicina, Neomicina, Penicilina, Streptomycin y sensible a Cloramfenicol y Tetraciclina. en el caso de Ampicilina y Eritromicina la resistencia es variable (Buchanan y Gibbons. 1984; Montencourt. 1985).

La sistemática de Zymomonas debido a profundos estudios realizados por Swings y De Lev en 1977 ha sido reestructurada (Montencourt. 1985). Primeramente estaba clasificada como un género con 2 especies. Zymomonas mobilis Lindner. 1928 y Zymomonas anaerobia Shimwell. 1937. esta especie con tres variedades: Z. anaerobia anaerobia Shimwell. 1937; Z. anaerobia immobilis Shimwell. 1950 y Z. anaerobia pomaceae Millis. 1956 (Montencourt. 1985).

Swings y De Lev (1977) después de analizar la composición de bases del DNA, tamaño del genoma, patrón electroforético de proteínas, espectroscopía infrarroja y diversas características fenotípicas, llegaron a la conclusión de que todas las cepas de Zymomonas descritas se clasifican en una sola especie y dos subespecies: Zymomonas mobilis mobilis Lindner, 1928 y Zymomonas mobilis pomacii Millis, 1956. Las diferencias entre ambas se muestran en la Tabla No. 2.

Zymomonas mobilis es un género que por años fue utilizado como agente fermentante en bebidas alcohólicas a partir de jugos de palma, agaves etc.

Su importancia radica en los altos rendimientos que presenta comparado con levaduras utilizadas a nivel industrial, entre ellas Saccharomyces cerevisiae y S. carlsbergensis (Murillo y col., 1984).

Características	<i>Z. mobilis</i>	<i>Z. mobilis</i>
Diámetro de la colonia a 30°C. 7 días de incubación	1.5 mm	< 1.0 mm
Crecimiento a 36°C	+	-
Porcentaje de homología ADN/ADN con respecto a la cepa 5.3 de Swings y De Ley (1975)	76 - 100	< 32
Electroforogramas de cluster de proteínas	r = 0.88	r = 0.75 con la subesp. <i>mobilis</i>

Tabla No. 2.

Diferencias entre subespecies *Z. mobilis mobilis* y *Z. mobilis*

pomacii.

Una de las características más importantes por las que se emplea Zymomonas es su tolerancia a elevadas concentraciones de etanol y sacarosa. Tolera niveles de etanol hasta 77.0 g/l (Buchanan y Gibbons, 1984; Montencourt, 1985) y 462.1 g/l de sacarosa (Doelle y Greenfield, 1985b).

La membrana celular de Zymomonas está compuesta por cardiolipina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y fosfatidilcolina además de ácidos grasos como el ácido vaccínico, mirístico, palmítico y palmitoleico (Carey e Ingram, 1983; Montencourt, 1985; Doelle y Greenfield, 1985b y Benschoter e Ingram, 1986).

La sacarosa y el etanol parecen no tener efectos perjudiciales sobre los ácidos grasos, la resistencia a estos se debe principalmente a la presencia de ácido vaccínico que representa un 75% o más del contenido de ácidos grasos (Carey e Ingram, 1983; Montencourt, 1985; Doelle y Greenfield, 1985b y Benschoter e Ingram, 1986). Sin embargo estos causan una disminución en

fosfatidiletanolamina y un incremento en la cardiolipina y fosfatidilcolina (Carey e Ingram, 1983; Montencourt, 1985; Doelle y Greenfield, 1985b y Benschoter e Ingram, 1986).

En contraste a la sacarosa, la glucosa sí afecta la membrana celular de Zymomonas en concentraciones de 10 a 15% (Doelle y col., 1982). Doelle y Mc Gregor en 1985 mencionan que la razón por la cual la sacarosa no afecta la membrana de Zymomonas es por la formación de una capa protectora alrededor de la célula aparentemente similar a la capa de las bacterias Gram (+) (Carey e Ingram, 1983; Montencourt, 1985 y Doelle y Greenfield, 1985b).

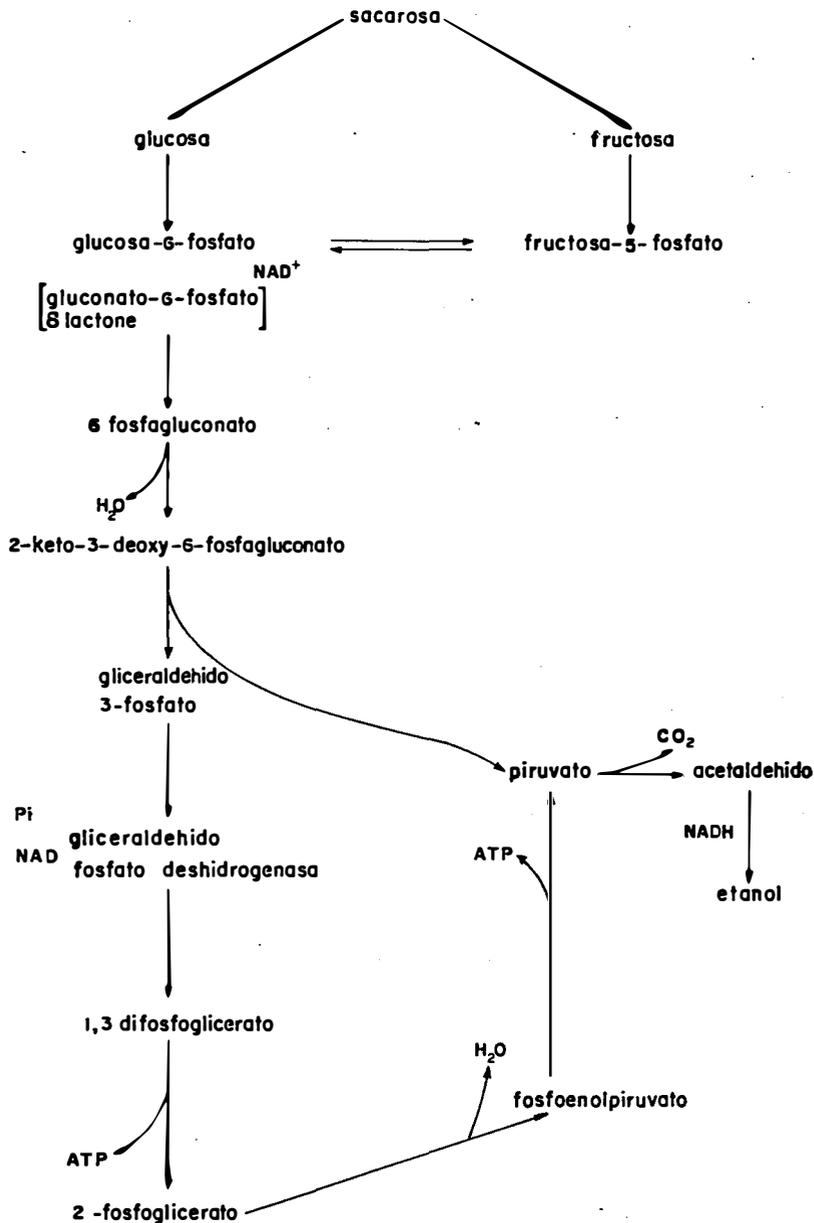
La temperatura es un factor importante en la tolerancia de Zymomonas puesto que a temperaturas mayores de 41°C la proporción de ácido vaccínico disminuye incrementándose el ácido mirfístico, la proporción de fosfatidilcolina y cardiolipina se incrementan disminuyendo la fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol (Benschoter e Ingram, 1986).

Un producto importante formado por Zymomonas durante el crecimiento en sacarosa es el levano, un polímero de la fructosa. Dawes y sus colaboradores en 1966, encontraron que el 10% de la sacarosa en el medio es convertida a levano, el resto es convertido a glucosa y fructosa, y posiblemente una enzima invertasa sea la responsable de la hidrólisis de la sacarosa y la producción de levano, sin embargo las enzimas involucradas en la utilización de la sacarosa no han sido bien definidas (Montenecourt, 1985). La formación de este subproducto está ligado a la temperatura, por lo general la producción se presenta a temperaturas de 30°C.

En fermentaciones con Zymomonas además de la formación de etanol y levano se ha detectado el sorbitol. Este se forma en presencia de glucosa y fructosa a un pH controlado de 5.0 y en concentraciones iniciales de 288.7, 300.15 y 397.0 g/l de sacarosa (Doelle y Greenfield, 1985b). Millis en 1956 ha reportado que algunas cepas de Zymomonas utilizan el sorbitol además de producirlo (Montenecourt, 1985).

Zymomonas mobilis es un microorganismo que fermenta la glucosa por la vía metabólica de Entner-Doudoroff (Carey e Ingram, 1983), como se muestra en la Fig. No.6. Las enzimas involucradas en esta vía no han sido estudiadas con detalle (Montenecourt, 1985).

VIA METABOLICA Entner Doudoroff, utilizada por Zymomonas



PRUEBAS DE CARACTERIZACION

Tinción al Gram (Bradshaw, 1976)

La tinción bacteriológica más usada es la Tinción al Gram. Esta tinción es de gran valor sistemático ya que divide a los microorganismos en dos categorías y es el punto inicial del proceso de identificación.

La tinción se compone de cuatro reactivos diferentes. El primer colorante, el cristal violeta, imparte color a los microorganismos en el frotis; el segundo reactivo, una solución de iodo-lugol refuerza la unión entre el colorante y el sustrato. El tercer reactivo, una mezcla de alcohol y acetona disuelve el colorante primario. Por último la safranina se aplica como segundo colorante.

Muchos organismos retienen el cristal violeta a pesar del decolorante y se les llama Gram positivos. La pared celular de estos es sensible a la deshidratación con alcohol el cual actúa cerrando los poros de la pared celular, de esta manera el cristal violeta y el yodo no salen de la célula.

La pared celular de los Gram negativos es más rica en lípidos y aparentemente no cierra sus poros con el alcohol arrastrando así el cristal violeta y tomando el segundo colorante.

Anaerobiosis (Bradshaw, 1976)

En general los organismos se dividen en tres categorías, dependiendo de su tolerancia a la presencia de oxígeno. Los anaerobios estrictos no toleran concentración alguna de oxígeno. Los anaerobios facultativos pueden crecer con o sin oxígeno. Los aerobios son capaces de desarrollarse en ausencia de oxígeno.

Tinción de flagelos

La presencia de flagelos se puede observar mediante una tinción específica utilizando fucsina junto con ácido tánico. este último actúa como mordente el cual se adhiere a la célula y a los flagelos en capas sucesivas hasta que los flagelos junto con la célula aumenten sus dimensiones haciéndose visibles (Bradshaw, 1976; Bayardo, 1982).

Prueba del Rojo de Metilo (Bradshaw, 1976; Bayardo, 1982)

La reacción del rojo de metilo es útil para medir el grado diferencial de acidez y exclusivamente depende de pH final de un cultivo después de una incubación de 2 a 4 días. Algunas bacterias producen ácidos en alto grado por la hidrólisis de glucosa y la acidez permanece constante, en tanto que otras son capaces de atacar los mismos ácidos que forman y convertirlos en álcalis.

El rojo de metilo es un indicador que al agregarse a un medio en el que se hayan fermentado carbohidratos y por consiguiente producido ácidos, cambia a su color ácido en este caso amarillo.

Prueba del Azul de Metileno

Las fermentaciones se desarrollan en ausencia de oxígeno molecular. los organismos deben de obtener su energía de las moléculas del sustrato sin la participación del oxígeno. Las reacciones que liberan energía son reacciones de oxidación, esta puede presentarse en diferentes formas. En la gran mayor de las oxidaciones anaerobias el sustrato cede un hidrógeno, este debe ser capturado inmediatamente por un aceptor, si no hay aceptores de hidrógeno libres la fermentación no puede realizarse, si se mantiene un abasto continuo de aceptores de hidrógeno el organismo puede respirar continuamente (Bradshaw, 1976; Bayardo, 1982).

Hidrólisis de Gelatina

La gelatina es una proteína que tiene la capacidad de formar geles. La prueba de licuefacción de gelatina sirve para determinar la hidrólisis de la molécula proteica por acción de la exoenzima gelatinasa. El medio utilizado en este caso debe contener esta proteína, el cual al ser inoculado por microorganismos que liberen la gelatinasa, pasará del estado gel a sol, esto se determina por la acción lenta o rápida de los microorganismos. Las primeras moléculas proteicas que pasarán al estado de sol serán las más cercanas a los microorganismos. La temperatura es un factor importante ya que a elevadas temperaturas la gelatina se licua (Bradshaw, 1976; Bayardo, 1982).

Producción de Catalasa (Bradshaw, 1976).

La mayoría de las bacterias producen peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno libre. Dado que el peróxido de hidrógeno es

tóxico para las células vivas, es importante que sea degradado.

La catalasa es una enzima capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso. Esta reacción proporciona un mecanismo de eliminación del peróxido que por el contrario se acumularía en un cultivo y mataría a los microorganismos que lo producen.

Son muchas las bacterias que producen catalasa, unas en mayor grado que otras, sobre todo las aerobias estrictas, por el contrario no se ha demostrado su presencia en las anaerobias obligadas. Apparently la falta de catalasa en los organismos anaerobios es la causa de que el oxígeno les sea venenoso.

La presencia de catalasa se detecta con la aparición de burbujas al agregar unas gotas de H_2O_2 al 3.0% en el cultivo.

Producción de Indol

El indol es un producto resultante de la descomposición del triptofano, por bacterias característicamente activas en las descomposición protefca. El triptofano es el único aminoácido que contiene el anillo indol, por lo que los medios de cultivo empleados en esta prueba deben contenerlo en grandes cantidades.

El indol se manifiesta al añadir una solución de para-dimetilaminobenzaldehído. Los reactivos de Ehrlich y Kovac contienen esta sustancia unida al alcohol etílico o amílico la cual extrae el indol haciendo que sobresalga a la superficie del medio inoculado en forma de una capa delgada de color rojo rosado (Bradshaw, 1976; Bayardo, 1982).

Producción de Acido Sulhídrico

La producción de ácido sulhídrico es una propiedad de organismos que hidrolizan aminoácidos sulfurados. Estos organismos tienen

una enzima que desprende el átomo de azufre el cual es luego reducido con hidrógeno de los sustratos, para formar ácido sulfhídrico, por lo tanto el azufre funciona como aceptor de hidrógeno. El aminoácido cisteína es el más utilizado, por lo tanto el medio deberá contener grandes cantidades de este además de una sal de hierro o de plomo. El ácido sulfhídrico producido reacciona con estas sales y aparece en forma de un precipitado negro en el medio (Bradshaw, 1976).

FERMENTACION CON ZYMONAS

La producción de etanol ha cobrado gran importancia sobre todo en países donde sus recursos energéticos han disminuído en los últimos años. Brasil es un ejemplo, donde utilizan el etanol como combustible, en algunos casos se utiliza mezclado con gasolina y en otros en forma pura (Moreira y Goldemberg, 1981).

La fermentación es una alternativa para la producción de este hidrocarburo. Los microorganismos que se utilizan en la producción industrial son las levaduras entre ellas Saccharomyces cerevisiae y S. carlsbergensis (Murillo y col., 1984).

Zymomonas mobilis es una bacteria que ha sido utilizada para fermentación etanólica, reportándose altas producciones, además de tolerar sacarosa y etanol en altas concentraciones, mayores que levaduras. Este género es capaz de fermentar 1 mol de glucosa a 1.5-1.8 moles de etanol y 1.8 moles de CO₂, utilizando solo un

2.0% de sustrato para crecimiento, presentando rendimientos del 97-98% (Doelle y Greenfield, 1985b), comparado con el rendimiento máximo reportado para levaduras, del 90% (Maia, 1987).

La producción varía dependiendo de las condiciones y tipo de fermentación. Los parámetros importantes son temperatura, pH, aereación, componentes del medio y la cepa utilizada. Existen diversos tipos de fermentaciones como la continua, fermentación en batch, con microorganismos inmobilizados, etc.. Los reportes muestran que la fermentación en batch es la más frecuentemente utilizada y con mejores resultados (Lee y col., 1979; Doelle y Greenfield, 1985a).

Se ha reportado una producción de 132.0 g/l en fermentación batch a una concentración inicial de 400.0 g/l de sacarosa en un tiempo de 72 hrs a 35°C para una cepa mejorada en laboratorio (colección de la American Type Culture Collection, ATCC 39676) con un rendimiento de 0.37; sin embargo a concentraciones menores de

sacarosa el rendimiento puede ser mayor alcanzando niveles de 0.50 con 95.5 g/l de producción de etanol a partir de 200.0 g/l de sacarosa inicial en un tiempo de 24 hrs a 35oC (Doelle y Greenfield. 1985b).

En cultivos continuos se obtuvo una producción de etanol para la cepa ATCC 10988 de 60 a 65 g/l utilizando glucosa entre 100 y 200 g/l iniciales y una temperatura de 30oC (Lee y col., 1979).

Debido a los altos costos de la destilación se han desarrollado diversos métodos para la producción de etanol como el de células inmovilizadas, utilizando geles de alginato de calcio. En este método se utilizaron concentraciones de 50 a 300 g/l de glucosa, aproximadamente el 27.0% fue fermentado obteniéndose una producción de 126.3 g/l con una concentración de células de 58.0 g/l en peso seco a 30oC (Bajpai y Margaritis. 1985).

MATERIAL Y METODOS

Obtención de Muestras.

Se realizaron tres muestreos al azar de jugo de caña para el aislamiento de bacterias del género Zymomonas.

La primera muestra se obtuvo de un local comercial, en frasco estéril de 500 ml. Se utilizó un termómetro graduado de 0 a 150°C y un potenciómetro portátil marca Conductronic, para medición de temperatura y pH, respectivamente.

Para el segundo y tercer muestreos las muestras fueron obtenidas de 2 Ingenios azucareros. A continuación se describe brevemente el proceso de fabricación de azúcar.

De la molienda de las cañas se extrae el jugo, el cual es tratado con azufre con el propósito de eliminar la flora microbiana (Sulfitación), en seguida los sólidos presentes en el jugo son precipitados con Hidróxido de Calcio (Alcalizado). Al paso de clarificación le sigue una filtración a 80-90°C y el jugo ya filtrado es evaporado para concentrar el azúcar, este pasa a las centrífugas donde se separa la melaza (Azúcares no cristalizables) y la sacarosa tipo estándar la cual pasa a una última etapa de secado.

El segundo muestreo se realizó en el Ingenio José María Martínez en Tala, Jal. Se obtuvo una muestra de 1000 ml de cada una de las primeras etapas de la producción de azúcar antes de la cristalización (Sulfitado, Alcalizado, Clarificado y Filtrado). Estas muestras se obtuvieron en frascos estériles y midiéndose temperatura y pH a la vez.

En el Ingenio de Puga en Tepic, Nav. se realizó el tercer

muestreo obteniéndose una muestra de 1000 ml también de las cuatro primeras etapas de la producción de azúcar y en las mismas condiciones que los muestreos anteriores.

Aislamiento de Cepas.

Después de transportar las muestras al laboratorio se realizó el método 1 de aislamiento para el jugo de caña comercial que se describe a continuación.

Método 1

Se realizaron diluciones en agua estéril. 1:10, 1:100, 1:1 000 y 1:10 000 en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad.

De las diluciones 1:1 000 y 1:10 000 se tomaron 100 ul y se sembraron por aspersión con triángulo de vidrio en placas Petri con medio de aislamiento 1 (ver cuadro de medios) y se incubaron a 30oC en una incubadora marca Precision durante 48 hrs. Al término de esta incubación se aislaron con la ayuda de una asa bacteriológica las colonias diferentes en cuanto a morfología

color y tamaño. Cada cepa diferente se resembró en el mismo medio hasta obtener un cultivo puro. Con el objeto de que se desarrollaran mejor los microorganismos en el jugo de caña, después de tomar 10 ml para las diluciones, el jugo se incubó 24 hrs a 30°C y se repitió el método 1.

Como una segunda alternativa se utilizó el método 2 para las muestras de Tala, Jal. y en Tepic, Nav. descrito por Rodríguez y Callieri en 1985, que presentaba mejores condiciones para el aislamiento de bacterias del género Zymomonas. El método se realizó de la siguiente manera:

Método 2

Se obtuvieron las muestras de la misma manera que el método 1, midiéndose temperatura y pH. El medio de aislamiento 2 (ver cuadro de medios) y los tubos de ensayo de 10 ml con tapones de hule para vacío fueron esterilizados por separado. Se llenaron los tubos con el medio y se incubaron en posición vertical dentro

de los frascos con jugo de caña a 30oC por un período de 48 hrs. Al término de la incubación se tomó 1 ml de crecimiento bacteriano superficial con una micropipeta Gilson y se inoculó en 5 ml de medio de aislamiento 2. Se incubaron a 30oC durante 48 hrs. Este paso se realizó en dos ocasiones, bajo las mismas condiciones. De este cultivo se realizaron diluciones de 1:1 000 y 1:10 000. Se tomaron 100 ul mezclándose en el medio de aislamiento 2 en agar blando y vertiéndose a las cajas. Se incubaron a 30oC durante 48 hrs.

Cada cepa diferente en cuanto a morfología, color y tamaño de colonia se aisló con ayuda de una asa bacteriológica. Mediante cultivos posteriores a 30oC y 48 hrs se obtuvieron cultivos puros de las cepas aisladas.

Cuadro de Medios

Medio de Aislamiento 1

Este medio fue modificado en el laboratorio a partir del

mencionado en el catálogo ATCC (American Type Culture Collection)

de 1982.

	g/l
Glucosa	20.0
Extracto de levadura	20.0
KH ₂ PO ₄	1.0
Acido pantoténico	0.1
Agar	15.0

El pH fue ajustado a 6.5 con NaOH 1.0 M

Medio de Aislamiento 2

	g/l
Glucosa	20.0
Extracto de levadura	10.0
KH ₂ PO ₄	2.0
Agar	15.0

El pH fue ajustado a 6.5 con NaOH 1.0 M

Las cepas fueron mantenidas en medio de aislamiento sólido a 4°C

durante 15 días como máximo. al cabo de este período se replicaron para manejar cultivos frescos en las pruebas de caracterización. Las cepas aisladas fueron mantenidas en glicerol al 15% a -70°C (Kirsop, 1984) en un ultracongelador (FORMA - SCIENTIFIC), esto con el objeto de preservar dichas cepas por períodos prolongados.

Pruebas de Caracterización

Después de obtener un cultivo puro de las cepas aisladas se realizaron las pruebas de caracterización correspondientes, de acuerdo a Buchanan en su Manual de Bergey en 1984, agrupados de la siguiente manera:

Grupo 1

Tinción al Gram

Anaerobiosis

Tinción de Flagelos

Rojo de Metilo

Azul de Metileno

Hidrólisis de Gelatina

Grupo 2

Producción de Catalasa

Producción de Indol

Producción de Acido Sulfhídrico

Grupo 3

Crecimiento en Concentraciones de 20 y 40% de Glucosa

Crecimiento en Fructosa, Manitol, Sorbitol y Glicerol

Crecimiento a 30, 40 y 60°C

Crecimiento a Concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% de NaCl

Crecimiento a Concentraciones de 5.5, 7.7 y 9.9% de Etanol

Crecimiento a pH 3.0, 6.0 y 8.0

Resistencia a Antibióticos

Ampicilina, Cloramfenicol, Eritromicina, Gentamicina, Kanamicina,

Neomicina, Penicilina, Streptomina y Tetraciclina.

Tinción al Gram

Para realizar la tinción al Gram, las cepas fueron sembradas en medio LB (ver sección de medios y soluciones) los cultivos de 12 a 24 horas antes de la tinción procurando que los cultivos fueran jóvenes.

En un portaobjetos se preparó un frotis cubriéndolo con cristal violeta durante 1 min y se lavó con agua corriente, enseguida se cubrió con solución de Iodo-Lugol por 1 minuto. se lavó con agua corriente agregando después una solución de alcohol-acetona (70:30 v/v) gota a gota hasta quitar el exceso de cristal violeta y lugol. Se lavó con agua corriente y finalmente se cubrió con safranina durante 30 seg. este colorante fue removido con agua corriente. La preparación fue secada al aire y se observó con un objetivo de inmersión en un microscopio de contraste de fases (American Optical Modelo One-Ten).

Anaerobiosis

Para la prueba de anaerobiosis se utilizó el medio Brewer (ver sección de medios y soluciones). Se sembró por estrías y las placas fueron incubadas en una jarra para cultivos anaerobios, se utilizó un sobre generador de hidrógeno y CO₂ para crear una atmósfera anaerobia. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 hrs.

Tinción de Flagelos

De un cultivo joven (6 a 12 hrs) se hizo una suspensión en agua destilada. se colocó una gota en un extremo de un portaobjetos químicamente limpio (remojuados en mezcla crómica durante 24 hrs). el portaobjetos se inclinó para que la gota se derramara hasta el otro extremo. y se dejó secar al aire en posición inclinada. Una vez seco se cubrió con el colorante Leifson (ver sección de medios y soluciones) durante 15 min (el tiempo varía dependiendo de la cepa) se eliminó el colorante y se lavó con agua corriente

muy suavemente. Se secó al aire y se observó con objetivo de inmersión.

Rojo de Metilo

Se inocularon las cepas en tubos con 5 ml de caldo RM-VP (ver sección de medios y soluciones). Los tubos fueron incubados por un período de 48 hrs a 30oC en un incubador orbital. Después de la incubación se agregaron 5 gotas del indicador rojo de metilo (ver sección de medios y soluciones) (Bradshaw, 1976).

Azul de Metileno

De un cultivo en caldo nutriente (ver sección de medios y soluciones de 24 hrs de incubación a 30oC se tomó 1 ml y se transfirió a otro tubo con 3 ml del mismo medio, a este se le agregaron 2 gotas de la solución de azul de metileno y se observó el vire de color en intervalos de 15 min.

Hidrólisis de Gelatina

Cada de las cepas aisladas se sembró por estrías en placas Petri (Método Fraser) con agar-nutriente-gelatina 0.4% (ver sección de medios y soluciones). se incubaron por un período de 48 hrs a 30oC. Al término de la incubación se cubrió la superficie de cada placa con una solución saturada de sulfato de amonio y se dejó reaccionar durante 30 min (Bradshaw, 1976).

Producción de Catalasa

El ensayo para la producción de catalasa se realizó en medio Triptosa-Fosfato-Agar (ver sección de medios y soluciones), inoculando por estrías cada una de las cepas. Se incubaron a 30oC por un período de 48 hrs. Al término de esta incubación la presencia de catalasa se detectó agregando 5 gotas de una solución de H₂O₂ al 3%.

Producción de Indol

Las bacterias fueron inoculadas en tubos con 5 ml de caldo de triptona (ver sección de medios y soluciones) y fueron incubadas a 30°C por un período de 48 hrs en un Incubador Orbital Marca New Brunswick Modelo 625. se transfirió 1 ml de cultivo preincubado a un tubo de ensaye y se le agregó solución de Kovac (ver sección de medios y soluciones) gota a gota hasta formar una capa de 1 cm de espesor, procurando no mezclar el reactivo con el medio y manteniendo los tubos en posición vertical (Bradshaw, 1976).

Producción de Acido Sulfhídrico

Para esta prueba se utilizó el medio peptona-hierro-agar (ver sección de medios y soluciones). en tubos de ensaye inclinados. con 5 ml de medio. Se inoculó por picadura hasta el fondo del tubo. estos fueron incubados a 30°C por espacio de 48 hrs. (Bradshaw. 1976).

Tolerancia a Sacarosa

El ensayo de tolerancia a sacarosa, se realizó con las cepas M-1-C y M-3-B, utilizando el medio descrito por Doelle y Greenfield en 1985. Las concentraciones probadas fueron de 200, 300 y 400 g/l, se realizaron en tubos de ensaye con 10 ml de medio incubados a 30oC, muestreando a las 24, 32, 48 y 72 hrs.

Crecimiento en Concentraciones de 20 y 40% de Glucosa

El crecimiento de las cepas en concentraciones de 20 y 40% de glucosa se realizó en placas con medio descrito por Doelle y Greenfield en 1985. (ver sección de medios y soluciones). Se sembraron por estrias probando las concentraciones antes mencionadas. Se incubaron a 30oC durante 24 hrs.

Crecimiento en Carbohidratos

El crecimiento en diversos carbohidratos se realizó en el medio descrito por Doelle y Greenfield en 1985, utilizando

concentraciones de 2.0% de sorbitol, glicerol, manitol y fructosa, en esta última la concentración fue la correspondiente en peso de 20.0% de sacarosa que fue de 4.76%. Las cepas fueron sembradas por estrias en medio sólido e incubadas a 30oC durante 24 hrs.

Resistencia a Temperatura

Se hicieron ensayos de crecimiento bacteriano en 2 temperaturas 40oC y 60oC. Tubos con 5 ml de medio LB (ver sección de medios y soluciones), fueron inoculados con asa bacteriológica y se incubaron durante 48 hrs a las temperaturas antes mencionadas. El crecimiento se determinó por espectrofotometría (Espectrofotómetro de haz sencillo marca LKB modelo Ultrospec II) (Bergey's, 1984).

Resistencia a NaCl

El medio utilizado para esta prueba fue LB (mencionado

anteriormente) adicionando NaCl a la concentración deseada, en este caso se probaron tres concentraciones 0.5%, 1.0% y 2.0%. Las siembras se realizaron en placas Petri por estrias y se incubaron a 30°C por un período de 48 hrs. (Bergey's, 1984).

Resistencia a Etanol

De igual manera se utilizó el medio LB (antes mencionado), ya estéril se le agregó Etanol absoluto para obtener concentraciones finales de 5.5%, 7.7% y 9.9%. Las cepas se sembraron por estrias en placas Petri y se incubaron a 30°C por espacio de 48 hrs (Bergey's, 1984).

Resistencia a pH

Los pH probados fueron 8.0 y 3.0. además del pH 6.8, el cual es reportado por Doelle y Greenfield en 1985, como óptimo para crecimiento de Zymomonas mobilis.

La prueba se realizó en tubos de ensayo con 5 ml de medio LB (antes mencionado), ajustando el pH con NaOH 1.0 M y HCl 1.0 M. Los cultivos se incubaron a 30°C durante 48 hrs. El crecimiento bacteriano se determinó por espectrofotometría a 600 nm (Maniatis y col., 1982).

Resistencia a Antibióticos

La resistencia a antibióticos se realizó en placas con medio LB. Estas se sembraron por estrías, procurando que el crecimiento fuera uniforme en toda la placa. Los antibióticos probados fueron:

por disco

Ampicilina	10 ug
Cloramfenicol	30 ug
Eritromicina	10 ug
Gentamicina	10 ug
Kanamicina	10 ug
Neomicina	10 ug
Penicilina	5 U
Streptomicina	10 ug

Primeramente se sembraron las placas y enseguida se colocaron discos de papel filtro Whatman No. 1 estériles y se les agregó el antibiótico con una micropipeta Gilson, mojando completamente el disco. Por cada uno de las cepas se sembró un control sin antibiótico. Se incubaron 30oC durante 24 hrs.

SECCION DE MEDIOS Y SOLUCIONES

Tinción al Gram

Solución Cristal Violeta Gram.

Solución A:

Violeta Cristal 2.0 g

Etanol (95%) 20.0 ml

Solución B:

Oxalato amónico Q.P. 0.8 g

Agua destilada 80.0 ml

Las dos soluciones se prepararon por separado y posteriormente se mezclaron.

Solución Iodo Gram

Iodo Q.P. 1.0 g

Ioduro de Potasio 2.0 g

Agua destilada 300.0 ml

Tanto el Iodo como el Ioduro de Potasio fueron mezclados en mortero.

Decolorante Alcohol-Acetona

Alcohol (95%) 70.0 ml

Acetona 30.0 ml

Solución de Safranina Gram

Safranina 0.25 g

Etanol (95%) 10.0 g

Agua destilada 100.0 ml

Se disolvió la safranina en etanol y se le agregó el agua destilada. Esta solución fue filtrada en papel Whatman No. 1.

Medio Triptosa - Fosfato - Agar

	g/l
Triptosa	20.0
Glucosa	2.0
NaCl	5.0
Na ₂ HPO ₄	2.5
Agar	15.0

Los componentes fueron disueltos en baño de agua caliente. Se esterilizó por autoclave durante 15 min a 1.15 kg/cm².

Caldo de Triptona

	g/l
Triptona	10.0

Se esterilizó por autoclave a 1.15 kg/cm². durante 15 min.

Solución de Kovac

Para-dimetil-amino-benzaldehído	5.0 g
Alcohol butílico	75.0 ml
Acido clorhídrico (37%) Q.P.	25.0 ml

El para-dimetil-amino-benzaldehído fue disuelto en el alcohol en un baño de agua caliente y enseguida se agregó el ácido clorhídrico.

Agar-Nutriente-Gelatina 0.4%

	g/l
Triptosa	20.0
Extracto de levadura	0.3
MnSO ₄	0.1
Gelatina	4.0
Agar	15.0

El medio fue esterilizado por autoclave durante 15 min a 1.15 kg/cm².

Agar-Peptona-Hierro

	g/l
Peptona	15.0
Proteosa-Peptona	5.0
Citrato-Férrico-amónico	0.5
Tiosulfato sódico	0.08
K ₂ HPO ₄	1.0
Agar	15.0

Se esterilizó por autoclave a 1.15 kg/cm² durante 15 min.

Caldo RM-VP (Rojo de Metilo-Voges Proskauer)

	g/l
Peptona	7.0
Glucosa	5.0
K ₂ HPO ₄	5.0

Se esterilizó por autoclave 15 min a una presión de 1.15 kg/cm².

Indicador Rojo de Metilo

Rojo de Metilo	0.1 g
Etanol (95%)	250.0 ml
Agua destilada	250.0 ml

El rojo de metilo se disolvió en etanol y se le agregó el agua destilada. La solución se filtró en papel Whatman No. 1.

Medio LB

	g/l
Peptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
NaCl	10.0
Agar	15.0

Se esterilizó por autoclave a 1.15 kg/cm² durante 15 min.

Caldo Nutriente

Caldo de nutrientes	8.0 g
o alternativamente	g/l
Extracto de Res	5.0
Peptona	3.0

Se esterilizó por autoclave durante 15 minutos a 1.15 kg/cm².

Solución de Azul de Metileno

Azul de Metileno	0.3 g
Etanol (95%)	30.0 ml
Aqua destilada	100.0 ml

Se disolvió el azul de metileno en el etanol y se le agregó el agua destilada. se mezclaron y se filtró en papel filtro Whatman

No. 1.

Medio para Anaerobios Brewer

(Marca comercial)	51.0 g/l
cuya composición es	g/l
Peptona de Caseína	10.6
Peptona de soya	5.0
Extracto de levadura	5.0
L-Cistina	0.4
D(+)-Glucosa	10.0
Cloruro de Sodio	5.0
Tioglicolato de Sodio	2.0
Sodio formaldehído sulfoxilato	1.0
Azul de Metileno	0.002
Agar	12.6

Se esterilizó por autoclave durante 15 min a 1.15 kg/cm².

Colorante de Leifson

	ml
Sulfato Aluminico Potásico en solución acuosa saturada	20.0
Sol. acuosa de Acido Tánico al 20%	10.0
Agua destilada	10.0
Etanol (95%)	15.0
Fucsina Básica en solución alcohólica saturada	3.0

Se mezclaron los ingredientes uno a uno en el orden indicado, filtrándose en membrana Millipore de 0.45 μ m. La mezcla fue preparada un día antes de su uso.

FERMENTACION ALCOHOLICA DE LAS CEPAS AISLADAS

De acuerdo a las pruebas de caracterización se seleccionaron 2 cepas que presentaran la mayoría de resultados positivos para realizar los ensayos de fermentación que a continuación se describen.

Las condiciones de fermentación alcohólica fueron establecidas de acuerdo al medio citado por Doelle y Greenfield en 1985b. La composición de dicho medio es la siguiente:

	g/l
Sacarosa	200.0
Peptona de Caseína	2.0
Extracto de Levadura	2.0
MgSO ₄	2.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
KH ₂ PO ₄	2.0

El pH fue ajustado a 6.0 con NaOH 1.0 M.

Fermentación en tubo

Se preparó un preinóculo en tubos de 25x150 mm con medio antes mencionado a partir de una colonia aislada de un cultivo bacteriano en medio sólido y fue incubado a 35oC durante 24 hrs en un Incubador Orbital.

Un matraz con 100 ml del mismo medio fue inoculado con el cultivo anterior (preinóculo) e incubado a 35oC durante 24 hrs (este matraz fue determinado como inóculo).

La fermentación de las cepas aisladas de jugo de caña se realizó en tubos con 10 ml inoculados con 10% (v/v) de crecimiento bacteriano (Inóculo en matraz). Los tubos fueron incubados a 35oC. monitoreando crecimiento bacteriano, azúcares reductores y producción etanólica a las 4, 8, 12, 24, 28, 30, 32, 34, 36 y 38 hrs.

Conforme se muestreó se determinó el crecimiento bacteriano por

espectrofotometría (Espectrofotómetro LKB Ultrospec II) a 600 nm de absorbancia (Maniatis, y col., 1982). Después de determinar el crecimiento bacteriano, las muestras se centrifugaron a 7 000 rpm durante 15 min en un rotor de cubeta oscilatoria Sorvall HS-4 en una centrifuga Sorvall RC50. el paquete celular se desechó recuperándose el sobrenadante para cuantificación de azúcares reductores y concentración de etanol.

Los azúcares reductores fueron cuantificados por el método Acido Dinitril-Salicílico • también conocido por las siglas DNS (Miller, 1959).

La cuantificación de etanol se realizó por cromatografía de gases, previa destilación.

Cuantificación de Azúcares reductores

Método DNS (Miller, 1959)

Reactivo DNS	g
NaOH	1.0
DNS	1.0
Tartrato de Sodio y Potasio	20.0
Fenol	0.2
Metabisulfito de Sodio	0.05

Se mezclaron uno por uno en el orden indicado y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Se realizó una curva estándar con glucosa, cuya concentración fue de 1.0 mg/ml. La curva se elaboró de la siguiente manera:

No. Tubo	Sol. Glucosa ml	Agua ml	DNS ml	Aforo a 20.0 ml
0 (Bco)	0.0	1.5	3.0	15.5
1	0.1	1.4	3.0	15.5
2	0.2	1.3	3.0	15.5
3	0.3	1.2	3.0	15.5
4	0.4	1.1	3.0	15.5
5	0.5	1.0	3.0	15.5
6	0.6	0.9	3.0	15.5
7	0.7	0.8	3.0	15.5
8	0.8	0.7	3.0	15.5
9	0.9	0.6	3.0	15.5
10	1.0	0.5	3.0	15.5

Antes de aforar a 20 ml con agua las muestras se pasaron por baño de agua a punto de ebullición durante 5 min.

La lectura se tomó por espectrofotometría a 550 nm y se graficó D.O. vs concentración.

La cuantificación de azúcares de las muestras se realizó de la siguiente manera: Se tomaron de 250 a 500 μ l dependiendo del crecimiento bacteriano registrado anteriormente. La alícuota de la muestra se aforó a 1.5 ml de agua destilada, se le agregaron 3 ml de reactivo DNS y se colocaron en agua a punto de ebullición por 5 min exactamente y por último se aforó a 20 ml con agua destilada (de la misma manera que la empleada para la curva estándar). Se utilizó un blanco preparado con agua y reactivo DNS. La lectura se tomó por espectrofotometría a 550 nm y se graficó D.O. vs concentración.

Se realizaron diluciones 1:10 y 1:30 de las muestras con el objeto de que las lecturas de tales cayeran dentro de los rangos de la curva estándar.

Cuantificación de Etanol

Microdestilación

Se destilaron 10 ml de muestra de cultivos fermentados en un

microdestilador de 25 ml de capacidad. La temperatura de dicha destilación fue de 96oC y obteniéndose un volumen destilado de 3 a 6 ml a partir de 10 ml de muestra. Las muestras se conservaron a 4oC para su posterior cuantificación.

Cuantificación de Etanol

Se realizó en un cromatógrafo de gases (Marca Varian 401 con un equipo de cómputo integrado para establecer las condiciones de corrida).

Condiciones de Corrida

Tipo de columna: Carbowax 10%

Temperatura de columna: 80oC

Gas de transporte: Nitrógeno

Flujo de Columna: 30 ml/min

Temperatura de Invector: 100oC

Temperatura del Detector: 170oC

Tipo del Detector: Ionización de Flama

Estándar: Etanol al 0.4%

Análisis de Datos: Por el método de estandarización externa.

Area Estándar
----- = F.R.A.
g injectados del estándar

Area Muestra
----- = Concentración de la muestra.
F.R.A.

Nota: F.R.A. = Factor de Respuesta Absoluta.

RESULTADOS

Muestreos

Los parámetros obtenidos en los 3 muestreos se observan en la

Tabla No. 3.

Origen de la Muestra	Muestra*	Temperatura °C	pH
Local comercial	1	23	5.9
Ingenio Tala. Jal	1	28	5.8
	2	25	6.9
	3	24	5.6
	4	36	8.7
Ingenio de Puga Tepic. Nay.	1	30	5.4
	2	32	7.9
	3	35	5.4
	4	42	6.5

Tabla No. 3. Parámetros registrados de las muestras para aislamiento.

*Nota: El registro de las muestras provenientes de Tala. Jal y Puga. Nay. corresponden a: 1. Sulfitado, 2. Alcalizado, 3. Clarificado y 4. Filtrado.

Aislamiento Bacteriano

Se obtuvieron 4 cepas en el primer muestreo, cuyas características se enlistan en la Tabla No. 4.

De acuerdo a las observaciones microscópicas la morfología de las células fue la siguiente:

La cepa M-1-A presentó una forma de bacilos alargados en cadena. Tanto la cepa M-1-A presentó una forma de bacilos cortos dispuestos en pares y la cepa M-1-D presentó morfología levaduriforme. Las características morfométricas se muestran en la Tabla No. 5.

Después de realizar la fermentación se aislaron 2 cepas cuyas características de colonia se muestran en la Tabla No. 6.

Tanto la cepa JF1 como la JF2 presentaron morfología de bacilos cortos dispuestos en pares (Tabla No. 7).

Cepa	Morfología de colonia			Color	Diámetro de colonia (mm)	Consistencia
	Forma	Elevación	Borde			
M-1-A	Amiboide	Plana	Ondulado	Amarillo	1.8	Cremosa
M-1-B	Puntiforme	Elevada	Entero	Blanca	0.3	Cremosa
M-1-C	Circular	Convexa	Entero	Crema	2.0	Viscosa
M-1-D	Circular	Pulvinada	Ondulado	Blanca	>2.0	Cremosa

Tabla No. 4. Características de Colonia de las cepas aisladas del Muestreo No.1.

Cepa	Longitud (μ m)	Amplitud (μ m)
M-1-A	1.5	0.4
M-1-B	0.4	0.2
M-1-C	0.6	0.3
M-1-D	5.0	3.0

Tabla No. 5. Características morfométricas de las células aisladas del Muestreo No. 1.

Cepa	Morfología de colonia			Color	Diámetro de colonia (mm)	Consistencia
	Forma	Elevación	Borde			
JF1	Circular	Convexa	Entero	Crema	0.5 - 1.0	Cremosa
JF2	Circular	Convexa	Entero	Blanca	1.0	Cremosa

Tabla No. 6. Características de colonia de las cepas aisladas después de la fermentación del Jugo de Caña.

Cepa	Longitud (um)	Amplitud (um)
JF1	0.7	0.3
JF2	1.1	0.3

Tabla No. 7. Características morfométricas de las células aisladas del Jugo de Caña fermentado.

En el segundo muestreo se observó una homogeneidad de colonias, en cuanto a morfología, color y tamaño, para las cuatro muestras, por lo cual se procedió a tomar las colonias que estuvieron más aisladas en el medio. De aquí que se aislaron 2 cepas cuyas características aparecen en la Tabla No. 8.

La morfología celular para ambas fue la misma consistiendo en bacilos cortos dispuestos en pares unidos por los extremos, o solos (Tabla No. 9).

Por último en el tercer muestreo se obtuvieron 3 cepas cuyas características de colonia se muestran en la Tabla No. 10.

Las 3 cepas mostraron la misma morfología celular, bacilos cortos individuales o dispuestos en pares, con los extremos unidos (Tabla No. 11).

Como puede observarse en la Tabla No. 12, las cepas aisladas en los muestreos, resultaron ser anaeróbicas Gram (-) que carecen de

Cepa	Morfología de colonia			Color	Diámetro de colonia (mm)	Consistencia
	Forma	Elevación	Borde			
**M-2-A	Circular	Convexa	Entero	Blanca	1.4	Cremosa
*M-2-B	Circular	Convexa	Entero	Crema	0.5	Cremosa

Tabla No. 8. Características de colonia de las cepas aisladas del Muestreo No. 2.

Nota: * Aislada del Jugo Sulfitado

** Aislada del Jugo Alcalizado

Cepa	Longitud (um)	Amplitud (um)
M-2-A	0.6	0.3
M-2-B	0.9	0.3

Tabla No. 9. Características morfométricas de las células aisladas del Muestreo No. 2.

Cepa	Morfología de colonia			Color	Diámetro de colonia (mm)	Consistencia
	Forma	Elevación	Borde			
*M-3-A	Circular	Convexa	Entero	Crema	1.0	Cremosa
**M-3-B	Circular	Convexa	Entero	Blanca	1.2	Cremosa
*M-3-C	Circular	Convexa	Entero	Crema	0.8	Cremosa

Tabla No. 10. Características de colonia de las cepas aisladas del Muestreo No. 3.

Nota: * Aislada del Jugo Sulfitado

** Aislada del Jugo Alcalizado

Cepa	Longitud (μ m)	Amplitud (μ m)
M-3-A	0.8	0.4
M-3-B	1.0	0.3
M-3-C	0.9	0.3

flagelos por lo tanto no presentaron motilidad. de igual forma no presentan actividad hidrolítica de la gelatina.

La prueba de rojo de metilo presentó resultados negativos en las cepas, excepto para las cepas M-1-B y M-3-C .

La cepa M-1-B presentó un resultado negativo a la prueba del azul de metileno. a diferencia del resto de las otras.

En la prueba de reducción de catalasa. se mostró un resultado positivo, con excepción de la cepa M-1-B. La producción de indol y ácido sulfhídrico fue negativa para todas las cepas (Tabla No. 13).

En el ensayo de Tolerancia a diversas concentraciones de sacarosa. (200, 300 y 400 g/l) (Tabla No. 14) utilizando las cepas M-1-C y M-3-B. se observó un crecimiento máximo de 10.78×10^8 cel/ml a las 48 hrs en una concentración de 200 g/l

Cepa	Gram	Anaerobiosis	Presencia de Flagelos	Reducción		Hidrólisis de Gelatina
				Roja de Metilo	Azul de Metileno	
M-1-B	-	+	-	+	-	-
M-1-C	-	+	-	-	+	-
JF1	-	+	-	-	+	-
JF2	-	+	-	-	+	-
M-2-A	-	+	-	-	+	-
M-2-B	-	+	-	-	+	-
M-3-A	-	+	-	-	+	-
M-3-B	-	+	-	-	+	-
M-3-C	-	+	-	+	+	-

Tabla No. 12. Pruebas Bioquímicas para Características de Zymomonas. Grupo No. 1

Cepa	Producción		
	Catalasa	Indol	Ac. Sulfhídrico
M-1-B	-	-	-
M-1-C	+	-	-
JF1	+	-	-
JF2	+	-	-
M-2-A	+	-	-
M-2-B	+	-	-
M-3-A	+	-	-
M-3-B	+	-	-
M-3-C	+	-	-

Tabla No. 13. Pruebas Bioquímicas para
Caracterización de Zymomonas.
Grupo No. 2.

Sacarosa (g/l)	Tiempo (Hrs)	Población (10 E8 cel/ml)	
		M-1-C	M-3-B
200	24	9.99	9.96
	32	8.69	10.64
	48	10.18	10.77
	72	10.28	9.92
300	24	8.19	6.44
	32	7.74	6.87
	48	8.21	7.89
	72	8.09	8.28
400	24	6.51	4.65
	32	6.34	4.42
	48	7.36	6.37
	72	8.10	6.04

Tabla No. 14. Densidad poblacional de las cepas M-1-C y M-3-B en el ensayo de tolerancia a

para la cepa M-3-B . Utilizando 300 g/l el crecimiento mayor se obtuvo en la cepa M-3-B con una población de 8.3×10^8 cel/ml a las 72 hrs. Finalmente la cepa M-1-C mostró un crecimiento de 8.1×10^8 cel/ml a las 72 hrs de cultivo (Gráficas No. 1 y 2).

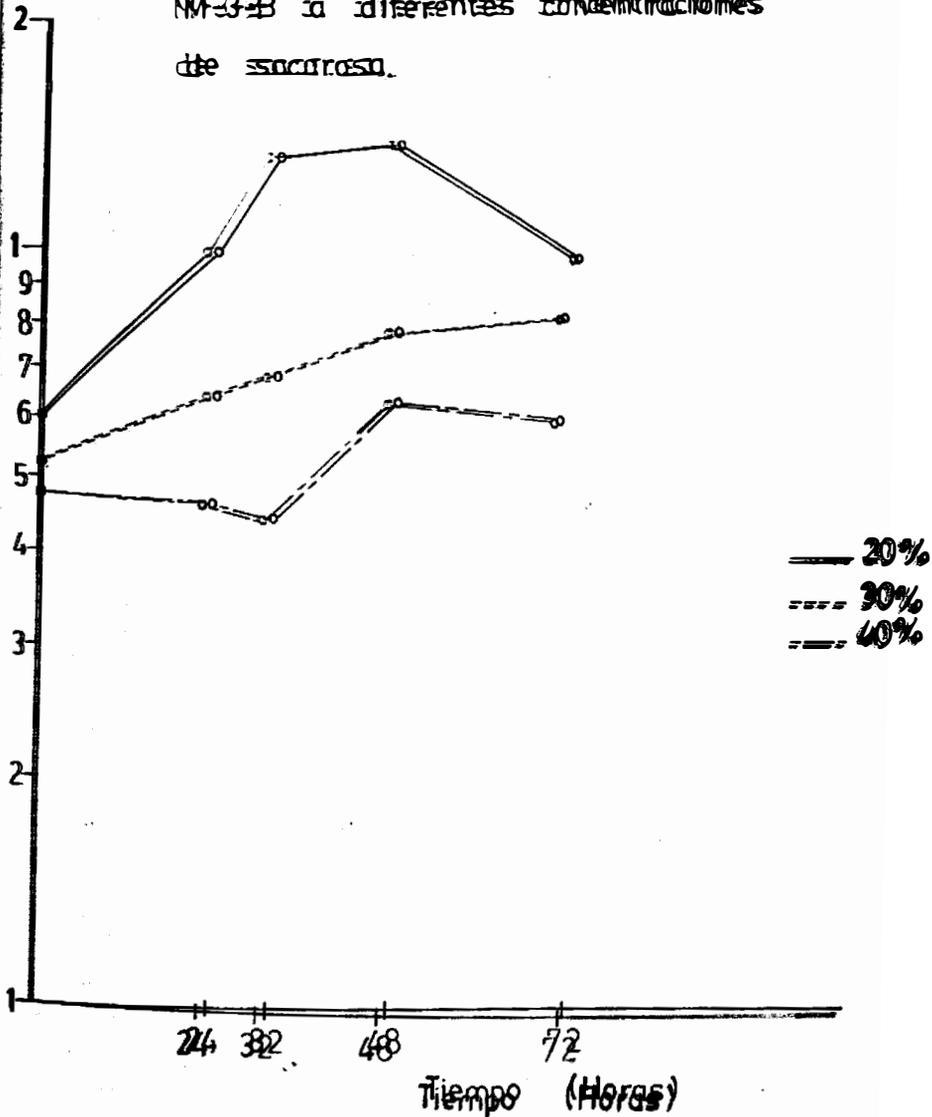
El tercer grupo de pruebas bioquímicas para caracterización (Tabla No. 15) mostró una gran variedad de datos. Primeramente la prueba de crecimiento en glucosa al 20.0% resultó ser positiva para las cepas M-1-B y M-1-C, mientras que el resto no presentó crecimiento, a una concentración de 40.0% no hubo crecimiento.

La prueba de fructosa presentó resultados positivos para las cepas M-1-B, M-1-C, M-2-B, M-3-B y M-3-C, presentando estas tres últimas tan solo un crecimiento residual. Las cepas JF1, JF2 y M-2-A no mostraron crecimiento.

En manitol se presentó un crecimiento positivo en las cepas excepto en la M-3-B.

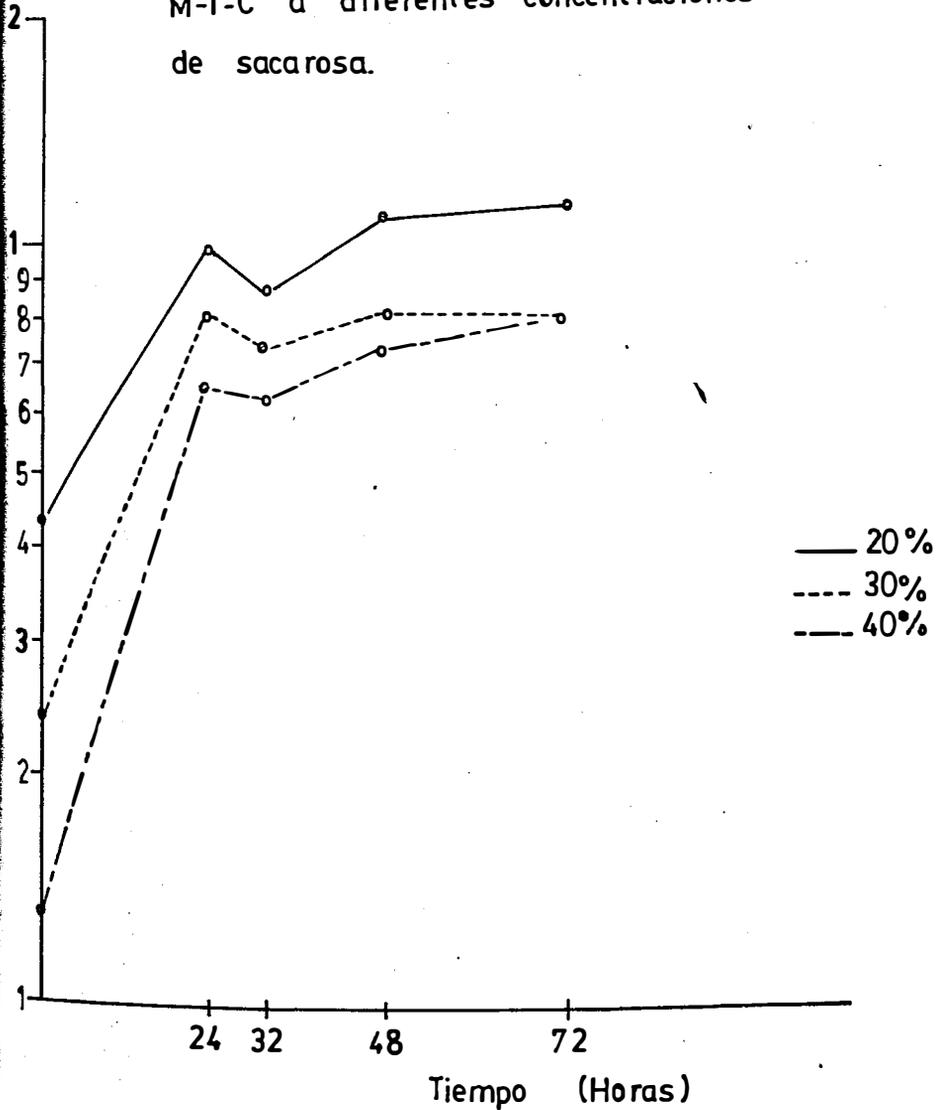
GRAFICA No. 11

Crecimiento Bacteriano de la cepa
NA-3-B a diferentes concentraciones
de sacarosa.



GRAFICA No. 2

Crecimiento Bacteriano de la cepa M-1-C a diferentes concentraciones de sacarosa.



El crecimiento en sorbitol resultó ser positivo para las cepas

M-1-C, JF1, M-2-A y M-3-A.

El total de las cepas fue capaz de crecer en el medio con glicerol.

La prueba de crecimiento en diferentes temperaturas fue de la siguiente manera: a 30oC un crecimiento total. A 40oC, un crecimiento positivo tan sólo en la cepa M-1-C. al igual que a 60oC pero con un crecimiento residual.

La tolerancia a Cloruro de Sodio mostró ser positiva a concentraciones de 0.5 y 1.0%. A 2.0% de concentración de esta sal sólo las cepas JF1 y JF2 presentaron crecimiento.

En la prueba de crecimiento en etanol el total de las cepas fueron capaces de crecer a 5.5%; de igual forma a 7.7% de etanol. excepto la cepa JF2. A diferencia de las anteriores

C R E C I M I E N T O

Epa	Glucosa (%)		Fructosa*	Manitol	Sorbitol	Glicerol	Temperatura (oC)*				NaCl (%)			Etanol (%)				pH
	20	40					30	40	60	0.5	1.0	2.0	5.5	7.7	9.9	3.0	6.0	
-1-B	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	
-1-C	+	-	+	+	+	+	+	+	+R	+	+	-	+	+	+	-	+	
JF1	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	
JF2	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	
-2-A	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	
-2-B	-	-	+R	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
-3-A	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	
-3-B	-	-	+R	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	
-3-C	-	-	+R	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	

Tabla No. 15. Pruebas Bioquímicas para Caracterización de Zygomonas. Grupo 3.

Nota: R = Crecimiento Residual.

concentraciones de etanol, el crecimiento fue positivo únicamente en las cepas M-1-C y M-3-B.

Finalmente, la prueba de crecimiento a diversos pH arrojó los siguientes resultados: las cepas JF1, JF2 y M-2-B presentaron un crecimiento positivo en todos los casos. Una diferencia notable se presentó a pH 8.0, las cepas M-1-B y M-3-C fueron las únicas capaces de crecer.

Una última prueba confirmativa, consistió en observar la resistencia a antibióticos (Tabla No. 16). En esta prueba las cepas resultaron ser sensibles a Ampicilina, Cloramfenicol y Tetraciclina. En Eritromicina sólo la cepa M-1-C presentó resistencia. Una gran variación de resistencia se dió en Gentamicina, las cepas M-1-C, M-2-B y M-3-A presentaron resistencia, mientras que las cepas JF1, JF2, M-2-A, M-3-B y M-3-C presentaron una resistencia variable. La cepa M-1-B mostró ser sensible. La resistencia a Kanamicina fue evidente en la cepa

M-1-C. variable para la cepa JF1 y negativa para el resto de las cepas.

La sensibilidad a Neomicina fue positiva en el total de las cepas, sin embargo la cepa M-1-C mostró cierta variabilidad en su resistencia a este antibiótico. Para el caso de la Penicilina fueron 3 las cepas que presentaron una resistencia variable.

M-1-C: JF1 y JF2, las demás resultaron ser sensibles. Por último se presentó una resistencia variable en las cepas M-1-C, JF1, JF2 y M-3-B para Streptomina, mientras que las cepas M-1-B, M-2-A, M-2-B, M-3-A y M-3-C fueron sensibles.

Fermentación Alcohólica de las Cepas Aisladas

Una vez realizadas las pruebas de caracterización y habiendo determinado que las cepas M-1-C y M-3-B muy posiblemente fueran Zymomonas se procedió a realizar una prueba de fermentación en tubo con dichas cepas.

Cepa	Ampicilina	Cloramfenicol	Eritromicina	Gentamicina	Kanamicina	Neomicina	Penicilina	Streptomicina	Tetraciclina
M-1-B	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M-1-C	S	S	R	R	R	V	V	V	S
JF1	S	S	S	V	V	S	V	V	S
JF2	S	S	S	V	S	S	V	V	S
M-2-A	S	S	S	V	S	S	S	S	S
M-2-B	S	S	S	R	S	S	S	S	S
M-3-A	S	S	S	R	S	S	S	S	S
M-3-B	S	S	S	V	S	S	S	V	S
M-3-C	S	S	S	V	S	S	S	S	S

Tabla No. 16. Prueba de Resistencia a diversos Antibióticos. Grupo 4.

Nota: S = Sensible

R = Resistente

V = Con y sin crecimiento en diversos ensayos

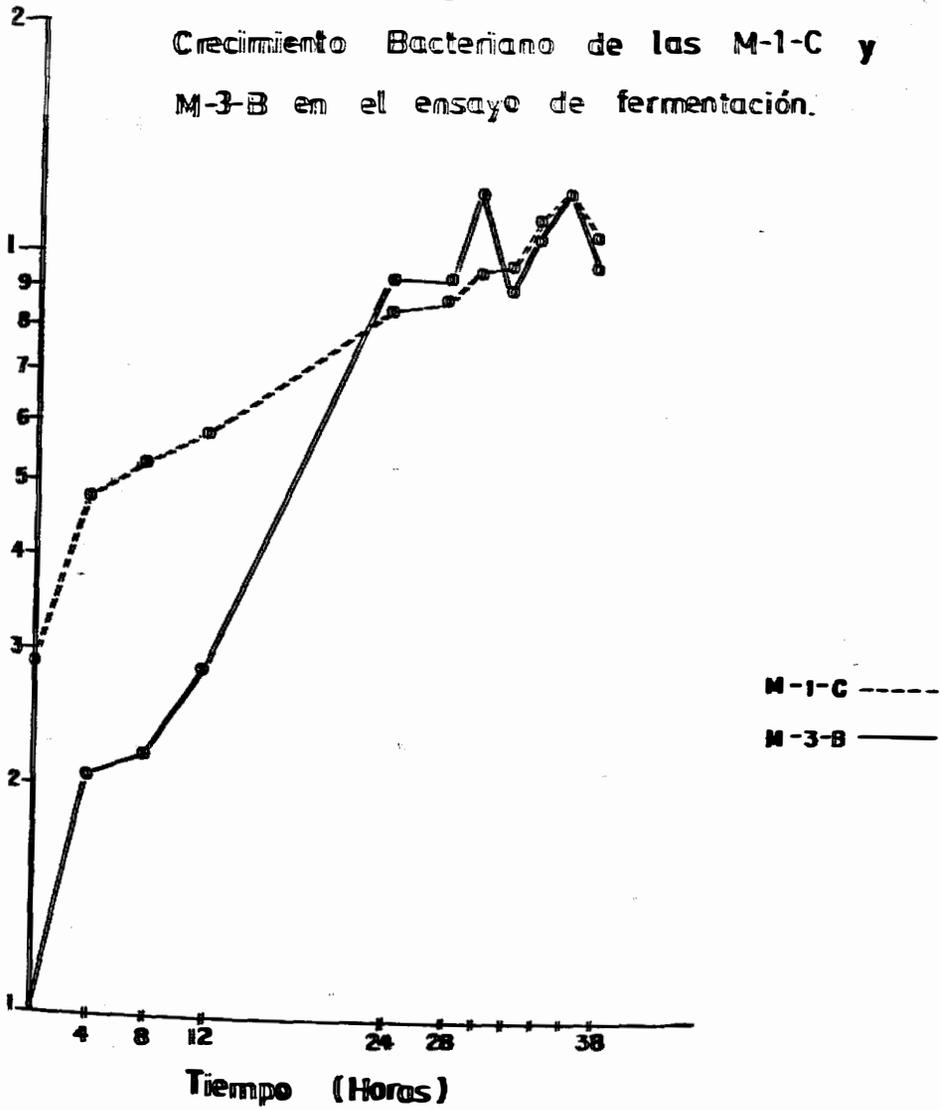
La Gráfica No. 3 muestra las curvas de crecimiento de las 2 cepas tratadas. obteniéndose un máximo de crecimiento de 1.04×10^8 EB cel/ml en ambas cepas. a las 36 hrs para la cepa M-1-C y 30 hrs para la cepa M-3-B (Tabla No. 17).

Primeramente para la cepa M-1-C el valor máximo de azúcares reductores totales (Gráfica No. 4) se presentó a las 36 hrs de fermentación siendo este de 32.13 g/l. (Tabla No. 17) y de 19.63 g/l a las 8 hrs para la cepa M-3-B (Gráfica No. 5. Tabla No. 18).

La producción de alcohol mostró una gran diferencia entre ambas cepas, siendo mayor para la cepa M-3-B (Gráfica No. 6. Tabla No. 18) con 45.92 g/l a las 38 hrs de fermentación y tan solo de 3.25 g/l para la cepa M-1-C a las 24 hrs (Gráfica No. 7, Tabla No. 17).

GRAFICA No. 3

Crecimiento Bacteriano de las M-1-C y
M-3-B en el ensayo de fermentación.

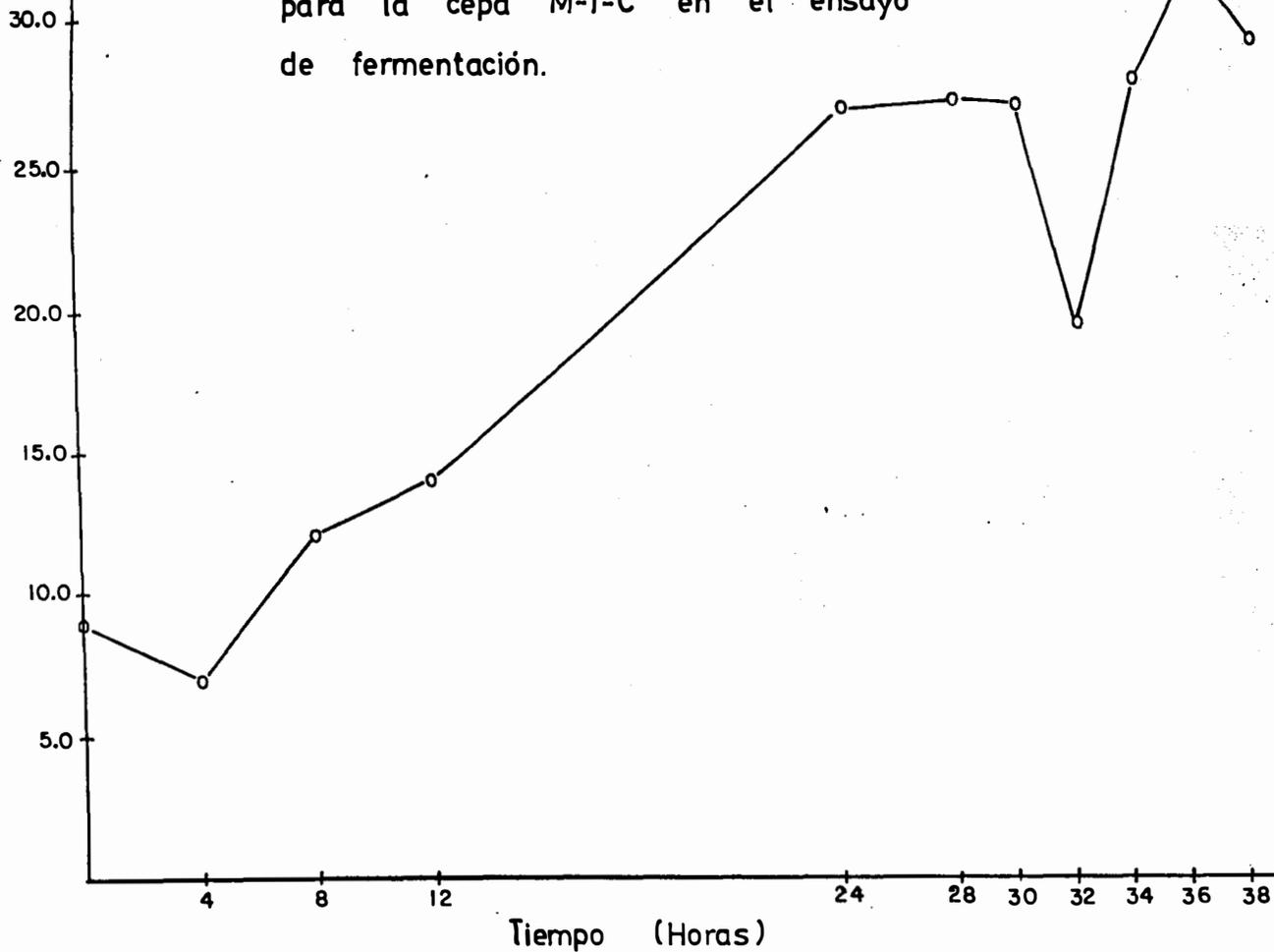


Cepa	Tiempo (Hrs)	Población (10 ⁸ cel/ml)	Azúcares Reductores Totales (g/l)	Producción de Etanol (g/l)
M-1-C	0	2.90	8.88	0.00
	4	4.80	7.00	1.37
	8	5.30	12.15	2.52
	12	5.80	14.15	3.06
	24	8.40	27.07	3.25
	28	8.60	27.37	2.52
	30	9.50	27.17	1.56
	32	9.60	19.50	1.75
	34	10.20	28.00	1.27
	36	10.40	32.13	1.74
	38	10.10	29.13	2.96

Tabla No. 17. Resultados de crecimiento poblacional, azúcares reductores y producción de etanol del ensayo de fermentación para la cepa M-1-C.

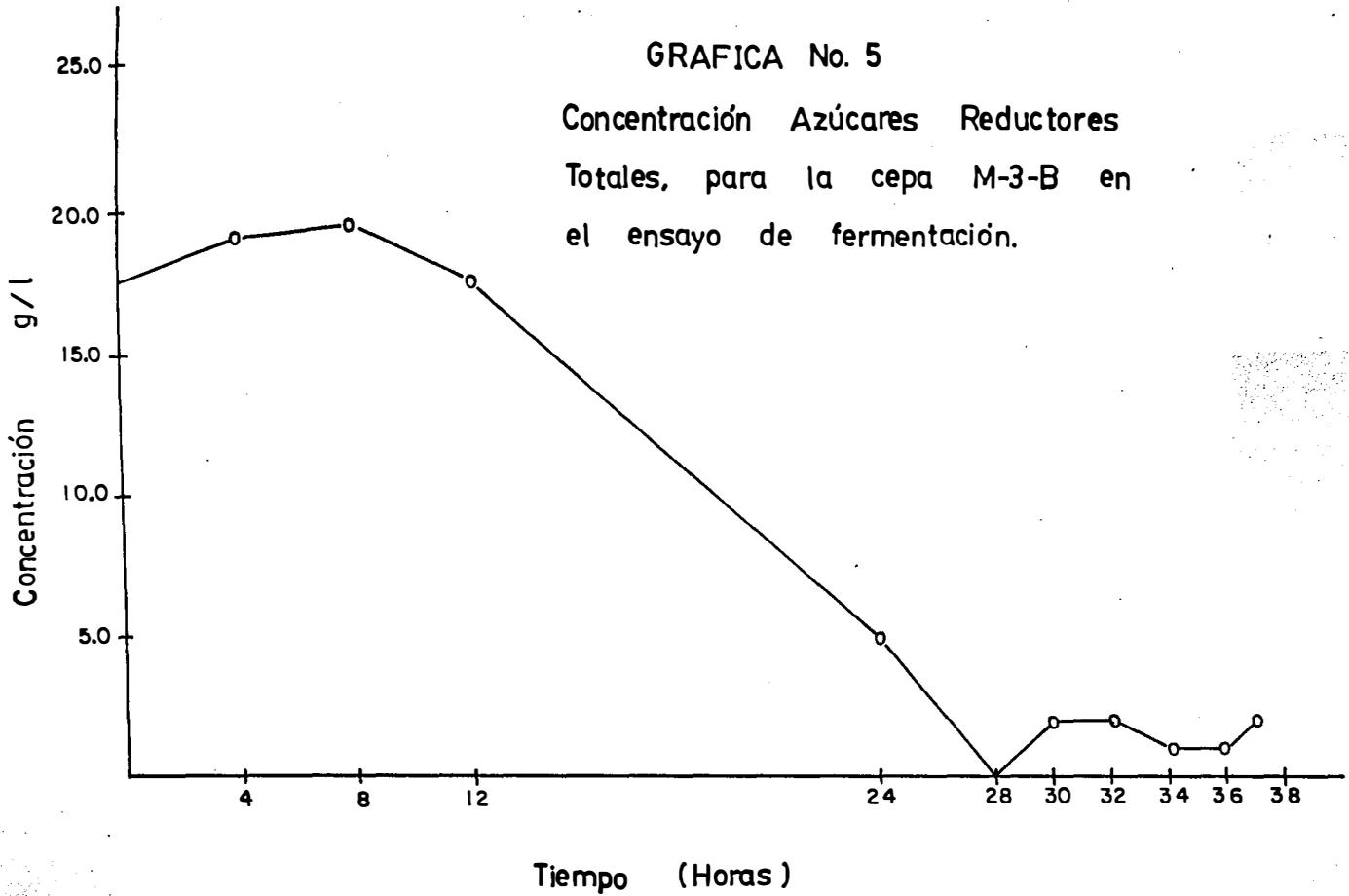
Concentración de Azúcares Reductores Totales
para la cepa M-1-C en el ensayo
de fermentación.

Concentración
g / l



GRAFICA No. 5

Concentración Azúcares Reductores
Totales, para la cepa M-3-B en
el ensayo de fermentación.



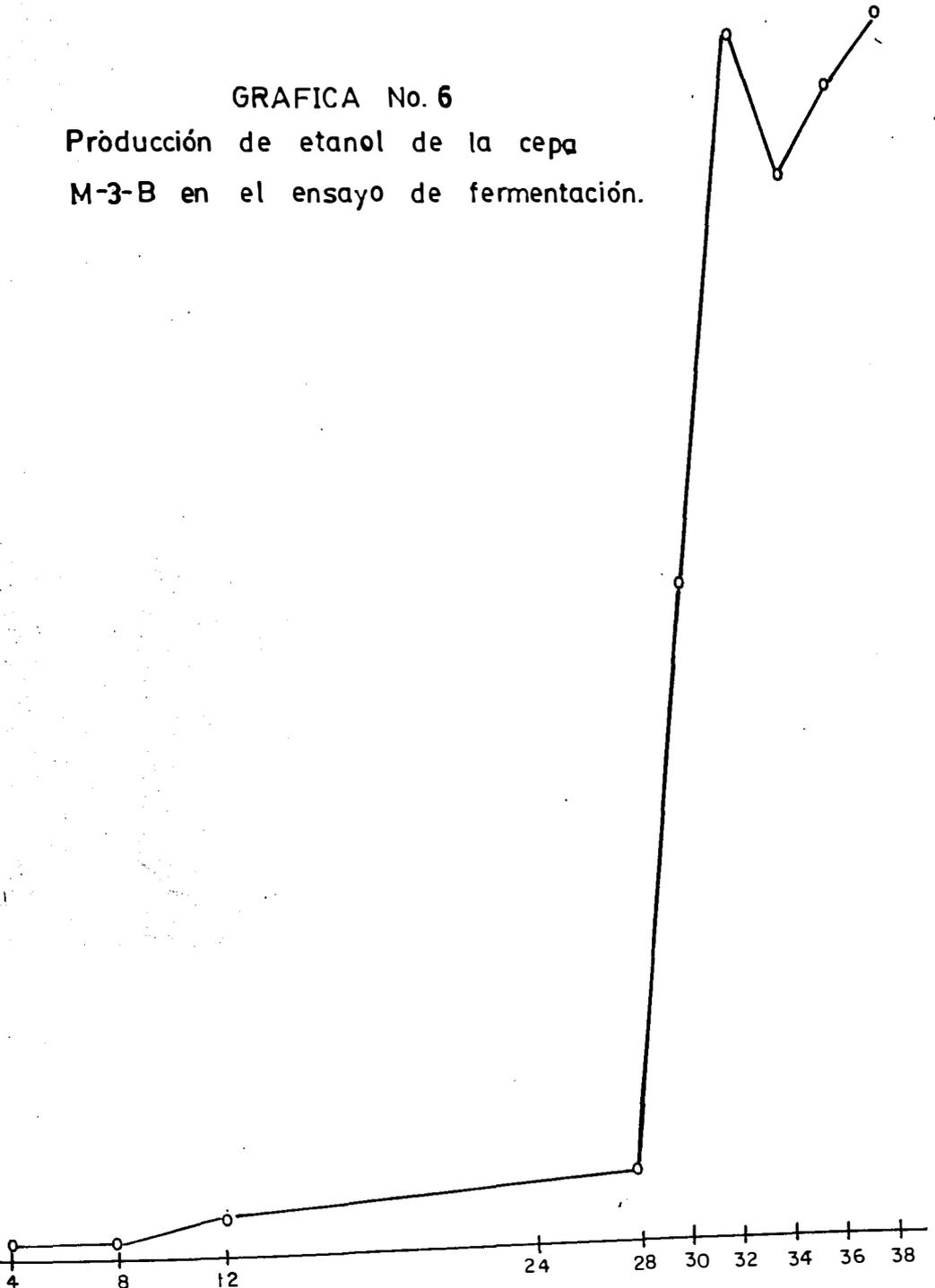
Cepa	Tiempo (Hrs)	Población (10 ⁸ cel/ml)	Azúcares Reductores Totales (g/l)	Producción de Etanol (g/l)
M-3-B	0	0.90	17.50	0.00
	4	2.08	19.13	0.56
	8	2.20	19.63	0.57
	12	2.88	17.75	0.77
	24	9.30	5.00	2.40
	28	9.17	0.00	2.66
	30	10.40	2.00	24.60
	32	8.80	2.00	45.60
	34	9.50	1.00	39.91
	36	10.40	1.00	43.12
	38	9.60	2.00	45.92

Tabla No. 18. Resultados de crecimiento poblacional, azúcares reductores y producción de etanol del ensayo de fermentación para la cepa M-3-B.

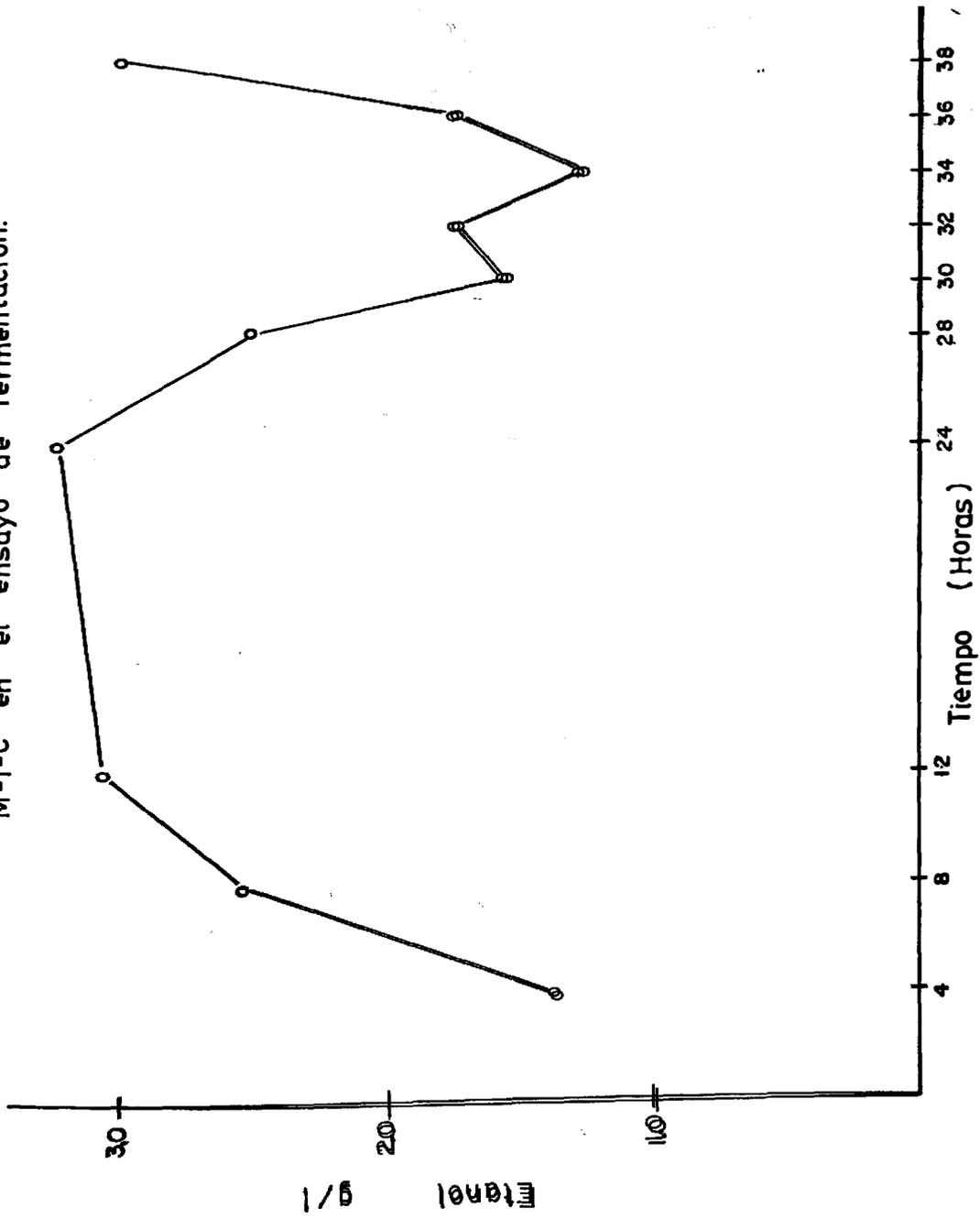
GRAFICA No. 6

Producción de etanol de la cepa
M-3-B en el ensayo de fermentación.

Etanol g/l



M-1-C en el ensayo de fermentación.



DISCUSION

Muestreos.

Conforme a la Tabla No. 3. se observó una gran variabilidad de las temperaturas registradas. Estas cayeron dentro de los rangos tolerables para Zymomonas las cuales son de 25 a 40 oC (Buchanan y Gibbons. 1984; Montenecourt. 1985).

De igual forma. los valores de pH abarcaron el rango registrado por la literatura para Zymomonas. de 4.0 a 7.0 (Buchanan y Gibbons. 1984; Montenecourt. 1985).

De acuerdo a estos dos parámetros. y aunado a que las fuentes fueron a partir de derivados de caña de azúcar. el aislamiento de cepas bacterianas del género Zymomonas se volvía más confiable.

Aislamiento

Muestreo 1

La cepa M-1-A se descartó por las características discordantes a lo referido en la literatura, ya que consistían en colonias grandes de color amarillo y olor desagradable, y bacilos de mayor tamaño a lo citado.

La cepa M-1-D también fue descartada debido a su morfología levaduriforme.

Las cepas M-1-B y M-1-C se conservaron para su caracterización.

Con este aislamiento se observó que el jugo de caña contenía una población microbiana mixta. Ahora bien, con los cambios obtenidos por la fermentación, las cepas JF1 y JF2 pudieron expresar su crecimiento.

Muestreo 2

El segundo método aquí empleado fue de mayor utilidad para el aislamiento bacteriano, ya que se evitó otro tipo de crecimiento. Se pudo observar que el crecimiento en las muestras no fue muy variable encontrándose colonias con las mismas características morfológicas.

El paso de sulfitado se realiza con el objeto de eliminar la flora microbiana presente en el jugo de caña, mientras que la alcalinización se lleva a cabo para precipitar los sólidos disueltos. Es importante notar que las cepas aisladas soportan estos dos cambios del proceso de producción de azúcar.

Muestreo 3

Las características de colonia y celulares de las cepas aquí aisladas mostraron ser similares a las obtenidas del Ingenio de Tala. De igual forma estas cepas son resistentes a los dos primeros pasos del proceso de producción de azúcar.

Pruebas Bioquímicas de Caracterización

Buchanan y Gibbons en 1984 en su Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa menciona que las bacterias del género Zymomonas son bacilos Gram (-), anaerobios facultativos y en algunos casos anaerobios obligados, generalmente no presentan motilidad, sin embargo cuando esta se manifiesta es debido a la presencia de 1 a 4 flagelos lofótricos.

El total de las cepas resultaron ser Gram (-) presentaron crecimiento en condiciones anaeróbicas y no presentaron flagelos, de acuerdo a lo mencionado anteriormente.

La prueba del rojo de metilo mostró dos variantes, las cepas M-1-B y M-3-C presentaron resultados positivos a diferencia de lo referido por Buchanan y Gibbons en 1974. De igual forma la prueba de reducción de azul de metileno, en la cepa M-1-B, el resultado es discordante a lo mencionado a la literatura. Todas las cepas presentaron el patrón negativo de la hidrólisis de gelatina.

En el segundo grupo de pruebas bioquímicas la única variación se presentó de igual forma en la cepa M-1-B. la cual no produjo la enzima catalasa. esto indica que es incapaz de degradar el H₂O₂ producido por su metabolismo. Tanto la prueba de producción indol como la de ácido sulfhídrico no presentaron resultado diferentes a lo citado.

El grupo No. 3 arrojó resultados de suma importancia en cuanto a la variación encontrada en las distintas cepas. Buchanan y Gibbons en 1984 mencionan que Zymomonas mobilis es capaz de crecer en 20% de glucosa y su crecimiento es variable en 40%. En base a esto se observó que solamente las cepas M-1-B y M-1-C. provenientes de jugo de caña comercial. crecieron en 20% de glucosa. En el ensayo de crecimiento utilizando las cepas M-1-C y M-3-B que fueron cultivadas en un medio que contenía 400.0 g/l de sacarosa (esto implica una concentración de glucosa de 210.5 g/l). mostraron crecimiento. la cual indica que posiblemente en este caso estén utilizando la fructosa del

disacérido para su crecimiento, esto fue parcialmente comprobado con los crecimientos obtenidos utilizando fructosa como única fuente de carbono por las cepas M-1-B, M-1-C, M-2-B, M-3-B y M-3-C (aunque residual en estas últimas tres).

Zymomonas mobilis ha sido reportada como incapaz de crecer en diferentes fuentes de carbono diferentes a su fuente primaria (sacarosa) (Buchanan y Gibbons, 1984; Montencourt, 1985). Los resultados aquí obtenidos muestran cierta discrepancia; en manitol el crecimiento fue positivo excepto en la cepa M-3-B. En sorbitol las cepas M-1-B, JF2, M-2-B, M-3-B y M-3-C, no mostraron crecimiento; en glicerol todas las cepas fueron capaces de crecer. Apparently las cepas que crecieron en estas tres fuentes de carbono pueden metabolizarlas para su crecimiento.

El crecimiento reportado por Buchanan y Gibbons en 1984 es positivo a 30°C, variable a 40°C y negativo a 60°C. Esto fue confirmado para las cepas aisladas cuyo crecimiento fue positivo

a 30oC, negativo a 40oC con excepción de la cepa M-1-C y negativo a 60oC. a esta temperatura la misma cepa presentó tan solo un crecimiento residual.

Sin conocerse aún el origen de la tolerancia a cloruro de sodio.

Zymomonas ha sido reportado como tolerante a concentraciones de 1.0% inhibiéndose su crecimiento a concentraciones mayores. En el presente estudio, el total de las cepas aisladas presentaron crecimiento a 0.5% y 1.0% de cloruro de sodio en medio rico y en 2.0% sólo las cepas JF1 y JF2 presentaron crecimiento.

Una de las características de mayor importancia en el metabolismo de Zymomonas es la tolerancia a concentraciones elevadas de etanol, esto es debido a la composición de lípidos en la membrana celular, probablemente una adaptación evolutiva de este género. Carey e Ingram en 1983 reportaron que en ácido vaccínico representa más del 75% del total de cadenas acilo de la capa polar de la membrana lipídica y quizás este le confiera la resistencia.

Las cepas aisladas en el laboratorio, toleraron concentraciones de 5.5% y 7.7% (con la excepción de la cepa JF2 que mostró crecimiento a 7.7%). En 9.9% de etanol solo las cepas M-1-C y M-3-B presentaron crecimiento. A raíz de este resultado se presumía que ambas cepas fueran Zymomonas.

De igual forma que para cloruro de sodio se desconoce el origen de la tolerancia al pH, reportándose crecimiento en un rango de pH de 3.5 a 7.5, fuera del mismo no es capaz de crecer. Las variantes aquí encontradas fueron JF1, JF2 y M-2-B que crecieron a pH 3.0 (las cuales presentaron resultados diferentes en las pruebas anteriores), las cepas M-1-B y M-3-C toleraron un pH 8.0.

Finalmente y como prueba confirmativa, se realizó el ensayo de resistencia a antibióticos. Zymomonas mobilis presenta una resistencia a ciertos antibióticos, según varios autores (Wise, 1983; Buchanan y Gibbons, 1984; Montencourt, 1985), sin conocerse aún el origen de esta resistencia.

Como se observa en la Tabla No. 14, para los antibióticos Ampicilina, Cloramfenicol, Tetraciclina y Eritromicina, las cepas se mostraron sensibles, tan sólo la cepa M-1-C mostró cierta tolerancia a estos tres antibióticos con un crecimiento variable. Por otro lado tanto la cepa JF1 como la cepa JF2 tuvieron el mismo patrón para Penicilina y Streptomina, además la cepa M-3-B para éste último.

El ensayo con Kanamicina registró la resistencia de la cepa M-1-C y el crecimiento variable para la cepa JF1. Un patrón de resistencia muy distinto se presentó en Gentamicina. Tres cepas fueron resistentes, M-1-C, M-2-B y M-3-A; JF1, JF2, M-2-A, M-3-B y M-3-C con crecimiento variable y la cepa M-1-B con una respuesta sensible.

Con este ensayo de resistencia a antibióticos se puede presumir que las cepas M-1-C y M-3-B pertenezcan al género Zymomonas de acuerdo a lo citado en la literatura (Buchanan y Gibbons, 1984; Montencourt, 1985).

Las pruebas bioquímicas aquí realizadas, sugieren la presencia de 2 cepas del género Zymomonas, aisladas de jugo de caña comercial (M-1-C) y del proceso de producción de azúcar del Ingenio de Puga en Tepic, Nay. (M-3-B).

Fermentación alcohólica de las cepas aisladas

Montenecourt en 1985, menciona que la velocidad de desdoblamiento de la molécula de sacarosa es mayor que el consumo de la misma. Los resultados aquí obtenidos muestran que la presencia de azúcares reductores se incrementó paralelamente al crecimiento de población aunque ambas velocidades fueron diferentes, esto para la cepa M-1-C; por otro lado, en el ensayo con la cepa M-3-B, los azúcares reductores totales decayeron a partir de las 8 hrs mientras que la población comenzaba su fase exponencial de crecimiento lo que indica que muy posiblemente la cepa estuviera aprovechando los azúcares para su crecimiento.

Doelle y Greenfield en 1985 reportan una producción 95.5 g/l de etanol para la cepa Zymomonas mobilis ATCC 39676, a partir de una fermentación en batch utilizando 200.0 g/l de sacarosa inicial en período de 32 hrs a 35°C.

La producción de etanol en la cepa M-1-C mostró niveles muy bajos (3.25 g/l) lo que indica que los azúcares fueron aprovechados en su gran mayoría para crecimiento de biomasa.

Un resultado muy distinto se observó para la cepa M-3-B, como ya se indicó durante las primeras 28 hrs aprovechó los azúcares para su crecimiento y a partir de ese tiempo aparentemente empezaron a ser utilizados para la producción de etanol (siendo el nivel más alto de 45.92 g/l) y a su vez para crecimiento hasta las 30 hrs.

CONCLUSIONES

Durante el presente estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Los parámetros registrados en las muestras. Temperatura y pH, mostraron ser acordes con la literatura, dando por consiguiente la seguridad de que las cepas aisladas a partir de tales muestras fueran del género Zymomonas.
2. El jugo de caña contenía una población microbiana mixta consistente en bacilos largos y cortos al igual que organismos levaduriformes.
3. El método descrito por Rodríguez y Callieri en 1985 resultó ser el más efectivo para el aislamiento bacteriano ya que se evitó el crecimiento de otro tipo de microorganismos.

4. La población bacteriana aislada en su mayoría no presentó resultados positivos en las pruebas bioquímicas indicando así la presencia de bacterias ajenas al género Zymomonas, que podrían estar interfiriendo en el rendimiento de la producción etanólica.
5. Las cepas aisladas fueron capaces de metabolizar fuentes de carbono alternas a la glucosa.
6. La razón de que la cepa M-1-C resista temperaturas de 40oC o mayores (60oC) la hace más tolerable a concentraciones altas de etanol.
7. Las cepas M-1-C y M-3-B mostraron resultados positivos en la mayoría de las pruebas bioquímicas de caracterización para Zymomonas, esto sienta bases firmes para suponer que ambas caen dentro de este género.

8. Una característica de suma importancia de las cepas M-1-C y M-3-B fue la tolerancia a 9.9% de etanol. esto indica que si ambas cepas son capaces de soportar esta concentración en el medio. en un proceso fermentativo podría existir la producción de etanol hasta este nivel (99.0 g/l).
9. Las condiciones de crecimiento empleadas para las cepas aquí aisladas. fueron las optimizadas por Doelle y Greenfield en 1985b para una cepa mejorada en laboratorio. lo que implica que estas cepas nativas pueden alcanzar niveles altos de producción optimizando sus condiciones de cultivo.
10. En el ensayo de fermentación con las cepas M-1-C y M-3-B se alcanzaron niveles de producción de 45.92 g/l de etanol para la cepa M-3-B y 3.25 para la cepa M-1-C.
11. Los azúcares fueron aprovechados para crecimiento y producción de etanol aunque este en mínimas cantidades para la cepa M-1-C.

12. En la cepa M-3-B los azúcares fueron aprovechados en las primeras 28 hrs para su crecimiento poblacional y a partir de entonces la producción de etanol se incrementa hasta alcanzar niveles de 45.92 g/l a las 38 hrs.

13. Las cepas M-1-C y M-3-B aisladas de jugo de caña comercial y del Ingenio de Puga, respectivamente, muy probablemente pertenezcan al género Zymomonas, faltando por realizarse pruebas confirmativas para su caracterización.

BIBLIOGRAFIA

- Bajpai, P.K. and Margaritis 1985. Kinetics of Ethanol of Immobilized cell of *Zymomonas mobilis* at Varying D-Glucose Concentration. Enz. Microb. Technol., 7: 762-764.
- Bayardo, P.B. 1982. Análisis Bacteriológicos y Bacteriología Determinativa. U. de G., 326.
- Bradsaw, J. 1976. Microbiología de Laboratorio. Ed. El Manual Moderno, 24-61.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The William and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A., Eighth Edition, Vol 1: 353-354.

Buchanan R.E. and N.E. Gibbons 1984. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Noel R. Krieg (Editor), Blard Ed. Ninth Edition, Vol 1: 576-580.

Carey, V.C. and L.O. Ingram 1983. Lipid composition of Zymomonas mobilis: Effects of Ethanol and Glucose. J. Bacteriol. 154: 1291-1306.

CONACyT. 1980. El petróleo en México y en el Mundo. Ciencia y Desarrollo. Segunda Edición, 141-157.

Concheiro. A.A. 1985 Biotecnología y Energía. En: *Prospectiva de la Biotecnología en México*. Ramírez Q.R. (Editor). CONACyT. 445-461.

Cromie, S. and H.W. Doelle 1980b. Relationship between Maintenance Energy Requirement, Mineral Salts and Efficiency of Glucose to Ethanol Conversion by Zymomonas mobilis. Biotech. Lett., 2: 257-262.

Crueger, W. and A. Crueger 1984. Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology. T.D. Brock (Editor), First Edition. Sanaver Associates Inc., 121-126.

Deleito, C.J.C. y J.R. Cabrero 1984. La Energía Eólica. Tecnología e Historia. Hermann Blume Ed., 9-26.

Doelle, H.W.; H.J. Preusser and H. Rostek 1982. Electron Microscopic Investigation of Zymomonas mobilis Cell Grown Low and High Glucose Concentrations. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 16: 136-141.

Doelle, H.W. and P.F. Greenfield 1985a. The Production of Ethanol from Sucrose Using Zymomonas mobilis. Appl. Microbiol. Biotechnol., 22: 405-410.

1985b. Fermentation Pattern of Zymomonas mobilis at High Sucrose Concentration. Appl. Microbiol. Biotechnol., 22: 411-415.

Kirk, R.E. y D.F. Othmer 1962. Enciclopedia de Tecnología Química. Unión Tipográfica Editorial Hispanoamericana. Primera Edición, 7, 876.

Kirsop, B.E. and J.S. Snell 1984. Maintenance of Microorganisms. Academic Press, London, 72-78.

Lee, K.J.; D.E. Tribe and P.L. Rogers 1979. Ethanol Production by Zymomonas mobilis. Biotech. Lett., 1: 421-426.

Lynes, E. and H.W. Doelle 1980. Effect of Temperature on Sucrose to Ethanol Conversion by Zymomonas mobilis Strain. Biotech. Lett., 2: 549-554.

1981. Fermentation Pattern of Sucrose to Ethanol Conversion by Zymomonas mobilis. Biotech. and Bioeng. 23: 1449-1460.

Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem., 31, 3: 426-428.

Maia, A.B.R.A.; P. Strehaiana y G. Goma 1987. Tecnologias Alternativas para a Fermentacao Alcoólica em Saccharomyces cerevisiae. Rev. Lat-Amer. Microbiol., 29: 175-182.

Maniatis, T.; E.F. Fritsch and J. Sambrook 1982. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 61.

Moreira, J.R. y J. Goldemberg 1981. El Programa de Alcohol en Brasil. Investigación y Ciencia, 61: 96-104.

Montenecourt, B.S. 1985. Zymomonas A Unique Genus of Bacteria. In: Biology of Industrial Microorganisms. Demain, A.L.

and N.A. Solomon 1985. The Benjamin/Cummings Pub. Co.,
9:261-289.

Murillo, M.M.E.; M. Gallegos y L.J. Galan Wong 1984. Producción
de Etanol por Diversas Cepas de Zymomonas mobilis
Aisladas de Diferentes Fuentes Naturales. Congreso
Nacional de Microbiología MI-2, 142.

Peppler, H.J. and D. Perlman 1979. Microbial Technology,
Fermentation Technology. Academic Press, Second Edition,
2: 157-159.

Ramírez, Q.R. 1985. Prospectiva de la Biotecnología en México
En: Prospectiva de la Biotecnología en México 1985.
Ramírez, Q.R..CONACyT, 461-478.

Rodríguez, E. and M.R. Callieri 1985. High Yield Conversion of
Sucrose into Ethanol by a Flocculent Zymomonas sp.

Isolated from Sugarcane Juice. Biotech. Lett., **8**,

10: 745-756.

Wise, D.L. 1983. Organic Chemics from Biomass. Julian E. Davies

(Editor). Board Ed. 75-77.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 569/87

Srita. Antonia Gutiérrez Mora
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el -
tema de Tesis "ESTUDIO DEL RENDIMIENTO EN LA PRODUCCION DEL ALCOHOL EN-
UNA CEPA DE Zymomonas mobilis AISLADA DE JUGO DE CAÑA" para obtener la-
Licenciatura en Biología con Orientación Biomédica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como -
Director de dicha Tesis el M.en C. Rogelio Camacho García.



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Mayo 26 de 1987

El Director

Dr. Carlos Astango Osuna

El Secretario

José Manuel Copeland Gardiel.

c. c. p. El M. en C. Rogelio Camacho García, Director de Tesis. - Pte.
c. c. p. El expediente de la alumna.

'mjsd

BOULEVARD A TLAQUEPAQUE Y CORREGIDORA, S. R.

TELEFONOS 17-58-29 Y 17-09-71

Guadalajara, Jal; Diciembre 14 de 1987

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Presente.

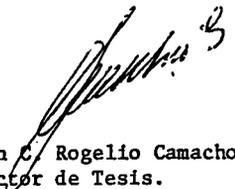
Estimado Dr. Astengo Osuna:

Por este medio comunico a usted que la srita. Antonia Gutiérrez Mora, pasante de la Licenciatura en Biología, ha concluido satisfactoriamente el proyecto de tesis titulada: ESTUDIO DEL RENDIMIENTO EN LA PRODUCCION DE ALCOHOL EN UNA CEPA DE Zymomonas mobilis AISLADA DE JUGO DE CAÑA, realizado en el CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

Así mismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la facultad y lo presentamos a consideración.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E


M. en C. Rogelio Camacho García.
Director de Tesis.