
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO COMPARATIVO DEL RENDIMIENTO DE PRODUCCION
DE ALCOHOL DE *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*
A PARTIR DE MELADURA.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
NORMA ANGELICA FLORES MERCADO

GUADALAJARA, JALISCO

1991



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección
 Expediente
 Número

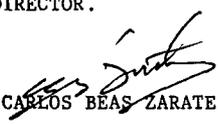
C. NORMA ANGELICA FLORES MERCADO
 P R E S E N T E.

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "ESTUDIO COMPARATIVO DEL RENDIMIENTO DE PRODUCCION DE ALCOHOL DE Zymomonas mobilis Y Saccharomyces cerevisiae A PARTIR DE MELADURA", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis al M. en C. Fernando A. Peraza Luna.

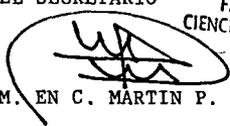
A T E N T A M E N T E
 "PIENSA Y TRABAJA"
 Guadalajara, Jal., 7 de Febrero de 1991
 EL DIRECTOR.



M. EN C.  CARLOS BEAS ZARATE.

EL SECRETARIO

FACULTAD DE
 CIENCIAS BIOLÓGICAS


 M. EN C. MARTIN P. TENA MEZA.



**Biblioteca de la Facultad
 de Ciencias.**

c.c.p.- Al M. en C. Fernando A. Peraza Luna.- Pte.
 c.c.p.- El expediente del alumno.

CBZ/MTM/vsg'

Al contestar este oficio cifrese fecha y número



CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA
Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

Ref. M.F. 043/91.

20 de Marzo de 1991.

M. en C. CARLOS BEAS ZARATE.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.
P R E S E N T E.

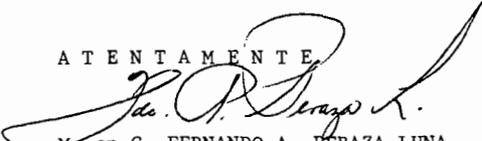
Estimado M. en C. Beas Zárate:

Por este medio le comunico a Usted que la Pasante de la Licenciatura en Biología NORMA ANGELICA FLORES MERCADO, ha concluido satisfactoriamente el Proyecto de la Tesis Titulada: "ESTUDIO COMPARATIVO DEL RENDIMIENTO DE PRODUCCION DE ALCOHOL DE *Z. mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* A PARTIR DE MELADURA", realizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Asimismo 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 su consideración.

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

ATENTAMENTE


M. en C. FERNANDO A. PERAZA LUNA.
JEFE DEL DEPTO. DE MICROBIOLOGIA Y
FERMENTACIONES.
CIATEJ, A.C.



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

FAPL/'nzk.

Dedicada especialmente a mi madre:

Por su constante esfuerzo para mi formación personal,
por haberme dado tanto amor y protección

G R A C I A S

Que Dios te bendiga



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

AGRADECIMIENTOS:

Biol. Mario Gutiérrez Prado: Por haberme dado un gran motivo para ser feliz.

Mi más sincero agradecimiento a:

M en C Fernando Antonio Peraza Luna.

M en C Martín P. Tena Meza.

Q.F.B. Rosa María Domínguez A.

Ing. Jaime Miguel Pérez.

M en C Ma. del Refugio Mora.

Francisco Mercado Camarena.

Biol. Fernando Chiprout Lizárraga.

Biol. Alejandro Mora Ruelas.

Biol. Virginia Negrete Ibarra.

Psicol. Silvia Jiménez González

Biol. Arturo Manzo Fontes.

Biol. Araceli Zañiga Villalpando.

Ing. Carlos Castrillo Sandino.

Ing. Javier Oliva Aguayo.

Q. Ramón García Landeros.

Al CIATEJ

A la empresa Tequila Sauza S.A. de C.V.

Por su amistad y apoyo que tan enormemente contribuyeron no sólo en mi formación académica sino también en mi calidad humana.

El presente trabajo fué realizado en el Departamento de Microbiología y Fermentaciones, de la División de Biotecnología del Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco A.C., bajo la dirección del M. en C. Fernando Antonio Peraza Luna.

1. INTRODUCCION

En las últimas décadas la Biotecnología como disciplina producto de la fusión de la bioquímica, la genética, la ingeniería química y la microbiología aplicadas a la producción y utilización de los microorganismos y de sus productos, ha venido ofreciendo nuevas y mejores alternativas para las industrias como la alimenticia, farmacéutica, agrícola, minera y de alcohol, entre otras.

Es específicamente en la industria del alcohol en donde la Biotecnología ha desarrollado procesos novedosos a los ya existentes en materia de fermentaciones, haciendo que estos aumenten su productividad, eficiencia y rentabilidad.

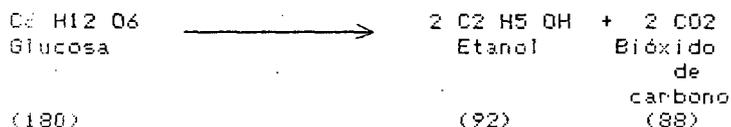
La producción de etanol ha cobrado gran importancia en los últimos años, sobre todo en países donde sus recursos energéticos han disminuido. Brasil y Estados Unidos de Norteamérica, son un ejemplo, donde utilizan el etanol como combustible, en algunos casos mezclado con gasolina y en otros en forma pura.

Tradicionalmente, para la producción de alcohol a partir de sacarosa mediante fermentación de levaduras entre ellas una de las más utilizadas es Saccharomyces cerevisiae, aunque algunos biotecnólogos sienten que en el futuro la importancia industrial de éste grupo de microorganismos disminuirá porque ellos producen pocos metabolitos secundarios de interés comercial. Por otro lado, recientemente se ha observado una mayor producción de etanol por parte de una bacteria del género Zymomonas, la cual utiliza únicamente sustratos puros de glucosa, fructosa y sacarosa. Así mismo, en la industria de las bebidas alcohólicas, se ha estado investigando la posibilidad de utilizar sustratos comerciales, que permitan aumentar la calidad del producto así como mejores rendimientos. Debido a esto es muy importante la investigación de las fermentaciones de Zymomona y de S. cerevisiae en las cuales se utilicen sustratos comerciales para su aplicación a nivel industrial.

II. ANTECEDENTES

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 usa para describir el aspecto efervescente del jugo de uva en fermentación.

En la actualidad se le llama fermentación alcohólica a la formación de alcohol etílico ($C_2 H_5 OH$) a partir de glucosa y otros azúcares como la sacarosa, por la acción de los fermentos de levadura, la cual puede ser representada estequiométricamente como:



La ecuación descrita puede ser aplicada tanto para fermentos de levaduras como de bacterias, la cual marca lo siguiente: Un rendimiento de 51 g de etanol puede ser obtenido de la fermentación de 100 g de glucosa. La pérdida se atribuye al crecimiento del microorganismo y la formación de subproductos (Kirk & Othmer, 1962; Kirk & Othmer, 1981; Jones et al, 1981).

1.- FACTORES Y COMPONENTES CARACTERÍSTICOS, NECESARIOS PARA LA REALIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCION DE ALCOHOL POR FERMENTACION.

Como todo los seres vivos, los microorganismos crecen, se reproducen y segregan algunos compuestos bioquímicos de importancia para el hombre. Esta es una de las características primordiales para la utilización de los microorganismos en los procesos fermentativos, lo que de alguna manera esquemática se puede representar como lo muestra la figura 1. Es decir, que para que una fermentación se realice son necesarios los siguientes requisitos: tener un microorganismo de características idóneas para el proceso y/o producto particular, proveer un medio de cultivo adecuado (que contenga todos los nutrimentos esenciales en las proporciones y cantidades óptimas de producción) y finalmente, establecer y controlar las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de la fermentación. Como resultado se obtendrá una cantidad de microorganismos mayor que la inicial y diversos lproductos, principalmente etanol (Kirk & Othmer, 1962; Prescott

& Dunn, 1976; Kirk & Othmer, 1981; Jones, et al, 1981; Quintero, 1987; Sturión, 1988).

A). MICROORGANISMO.

La selección del microorganismo no solo se limita a que pueda llevar a cabo la reacción deseada, sino el que pueda efectuar el cambio bioquímico necesario en poco tiempo, que produzca el rendimiento máximo posible con un mínimo de atención y que mantenga sus características de generación en generación.

Actualmente se conocen 39 géneros de levaduras con 400 especies, de las cuales las más utilizadas para la producción de etanol son las cepas Saccharomyces cerevisiae y Saccharomyces carbergensis (Murillo, et al, 1984; Cocheiro, 1985; Stewart, 1985).

Por otra parte, en los últimos 10 años ha tomado una enorme importancia una bacteria del género Zymomonas. Es un microorganismo con un potencial de rápida producción de alcohol para aplicaciones industriales. Las Zymomonas ha sido utilizadas en áreas tropicales del mundo, como un agente fermentativo natural para bebidas alcohólicas obtenidas de la savia de las plantas; un ejemplo muy conocido es el pulque, bebida nacional. Zymomonas se ha vuelto un microorganismo popular, principalmente para estudios en ingeniería bioquímica y genética (Buchanan & Gibbons, 1984; Montencour, 1985; Lawford, 1986; Buchholz, et al, 1987).

B). NUTRIMENTOS.

En todo proceso fermentativo, el medio de producción se considera un aspecto de importancia vital desde el punto de vista económico.

Los nutrientes son compuestos del sustrato o materia prima asimilables por el microorganismo. La materia prima contiene a menudo suficientes sustancias nutritivas, aunque en ocasiones es necesario agregar compuestos que juegan un papel esencial. Para la mayoría de las materias primas utilizadas para fermentación alcohólica, utilizando cepas de S. cerevisiae y Z. mobilis, los suplementos más necesarios son los compuestos fuentes de nitrógeno y fósforo, así como pequeñas cantidades de vitaminas, elementos traza, etc.

El nitrógeno se suministra en forma de sales de amonio, urea, aminoácidos, etc. El sulfato de amonio es el más ampliamente utilizado en fermentaciones industriales. Una limitación de iones de amonio en el medio de nutrientes causa

una repentina transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase de crecimiento lineal.

El fósforo se añade en forma de fosfatos; el más utilizado es el fosfato de amonio. La concentración de fosfatos controla la síntesis de lípidos y carbohidratos y mantiene la integridad de la membrana.

Las vitaminas regulan el metabolismo del microorganismo; su función es enzimática. Los requerimientos de las vitaminas esenciales para los rangos de fermentación depende de la cepa. Biotina y pantotenato son vitaminas esenciales para todas las cepas de Saccharomyces y Zymomonas. El inositol es un factor esencial del crecimiento para microorganismos, el cual en forma de fosfatidilinositol juega un papel clave en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular.

Los elementos traza como Mg, Fe, Co, Ca, Ni, Zn, Cu son necesarios en la síntesis de enzimas y son factores de crecimiento.

C). CONDICIONES AMBIENTALES.

Para que un proceso se desarrolle eficientemente, también es de considerable importancia que se establezcan y controlen las condiciones ambientales, para que el microorganismo transforme las sustancias nutritivas al producto deseado con un máximo de eficiencia. Entre las condiciones básicas se encuentran el pH, concentración de azúcar, temperatura y oxígeno.

El efecto del pH es muy importante en el control de la contaminación, en el efecto del crecimiento del microorganismo y en la formación de subproductos.

La concentración de azúcar es otro factor importante debido a que el contenido de carbohidratos determina el rendimiento de fermentación, la eficiencia de conversión de azúcar del microorganismo los cuales son dos parámetros claves para la valoración de la fermentación como tal.

Por otro lado, la temperatura se debe mantener siempre en los intervalos óptimos, tanto para el crecimiento como para la acción enzimática. Se ha observado que operando cerca del rango de la temperatura máxima se reduce la tolerancia al etanol así como también se nota decremento rápido de la viabilidad celular.

El oxígeno es necesario en los primeros momentos de la fermentación, particularmente para la reproducción de las células en condiciones óptimas.

2.- BIOLOGIA DE ZYMOMONAS.

Etimológicamente Zymomonas significa: Zyme = fermentación y monas = una unidad, o sea, una célula con capacidad fermentativa.

Zymomonas fué descrita primeramente por Baker & Hiller en 1912; fué encontrada como un agente causante de la enfermedad de la sidra (putrefacción).

Sin embargo, el descubrimiento de esta bacteria se le atribuye a Lidner en 1928, quien aisló este microorganismo del pulque y lo llamó Thermobacterium mobiles. Esta bacteria se ha preservado y se conoce ahora como Zymomonas mobilis subespecie mobilis (ATCC 10988) (Buchanan & Gibbons, 1984; Montenegour, 1985; Lawford, 1986; Buchholz, 1987).

A.- TAXONOMIA.

El género Zymomonas comprende una sola especie Z. mobilis y dos subespecie: Zymomonas mobilis mobilis y Zymomonas mobilis pomacii (Buchanan & Gibbons, 1984; Montenegour, 1985).

B.- MORFOLOGIA

Forma colonial: Zymomonas forma colonias con bordes enteros, destallantes; de color blanco cremoso; de 1.5 mm de diámetro para la subespecie mobilis y 1.0 para la subespecie pomacii despues de 7 días de incubación a 30°C. Su elevación puede ser convexa o umbonada.

Forma celular: Las células tienen forma de bacilos con puntas redondeadas; ocasionalmente elipsoidales. Se encuentran generalmente en pares; algunas cepas forman agregaciones en forma de rosetas, cadenas o células filamentosas de 2.6 mm de longitud y de 1.0 a 1.4 mm de diámetro. No forman esporas ni cápsulas (Buchanan & Gibbons, 1984; Montenegour, 1985).

C.- FISIOLOGIA

Zymomonas es una bacteria Gram negativa, generalmente sin movimiento; cuando lo posee tiene de 1 a 4 flagelos polares. La motilidad puede perderse espontáneamente. Son comúnmente anaerobias facultativas, aunque algunas cepas son anaerobias obligadas.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C ; el pH de crecimiento óptimo es de 3.5 a 7.5. Zymomonas tolera concentraciones de etanol de 5.5 a 7.7 %, y concentraciones de glucosa de 20 a 40 %. Requiere vitaminas como biotina y pantotenato, además de extracto de levadura y peptona.

Zymomonas es resistente a algunos antibióticos (gentamicina, Kanamicina, neomicina, penicilina, estreptomycin) y es sensible a clorafenicol y tetraciclina. En el caso de ampicilina y eritromicina la resistencia es variable (Buchanan & Gibbons, 1984; Motenecour, 1985).

La membrana celular de Zymomonas está compuesta por cardiolipina, fosfatidiletanolamina, fosfatidiglicerol y fosfatidilcolina, además de ácidos grasos como el ácido vaccénico, mirfístico, palmítico y palmitoleico. La sacarosa y el etanol parecen no tener efectos perjudiciales sobre la membrana celular, ya que se ha observado que la tolerancia a altas concentraciones de estos se debe principalmente a la presencia del ácido vaccénico que representa un 75 % o más del contenido de ácidos grasos en la célula (Carey & Ingram, 1983; Montencour, 1985; Doelle & Greenfield, 1985; Benschoter & Ingram, 1986; Buchholz, Dooley & Eveleigh, 1987). Asimismo, la tolerancia a altas temperaturas es otro factor importante, puesto que a temperaturas mayores de 41 C la proporción de ácido vaccénico disminuye, incrementándose el ácido mirfístico. La proporción de fosfatidilcolina y cardiolipina se incrementan disminuyendo la fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol (Benschoter & Ingram, 1986).

Durante un ciclo de fermentación, el porcentaje de agua intracelular declina y este efecto es más marcado a una alta concentración de sustrato inicial. Estudios microscópicos con levaduras revelan una atrofia celular relacionada con la caída del contenido de agua intracelular el cual no se ve en Zymomonas (Laudrin, Seiller, Torrijos, UribeArrea & Goma, 1984).

Zymomonas carece de diversas enzimas claves para realizar la glucólisis; principalmente las fosfoglucoquinasa. Zymomonas utiliza la vía Entner - Doudoroff para la degradación de carbohidratos en un 100 % (figura 2). Zymomonas utiliza sólo tres carbohidratos: glucosa, fructosa y sacarosa. La habilidad de utilizar sacarosa es presumible debido a la presencia de invertasa. Zymomonas no es capaz de metabolizar otras fuentes de carbono: rafinosa, xilosa, ramnosa, galactosa, manosa, sorbitol, arabinosa, dulcitol y lactosa.

Zymomonas fermenta glucosa a 1.8 a 1.9 moles de etanol y 0.2 moles de lactato por mol de glucosa utilizada. Sólo del 2.0 al 2.6% de glucosa consumida es convertida a biomasa. Las enzimas relevantes para mantener una oxidoreducción balanceada en la fermentación son: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y etanol deshidrogenasa.

Zymomonas es una de las pocas bacterias que poseen una piruvato decarboxilasa tipo levadura y por lo tanto puede producir etanol por reducción de acetaldehído (Dawes, Ribbons & Large, 1966).

Los principales productos formados por Zymomonas son el etanol y CO₂. Bajo condiciones aeróbicas los productos finales formados principalmente son acetaldehído, acetato, lactato, acetilmetilcarbinol y glicerol. Por otro lado, algunos alcoholes superiores, principalmente n-propanol y alcohol isoamílico, son detectables en algunas cepas. El levano, un polímero de fructosa, es un producto importante formado por Zymomonas durante el crecimiento en sacarosa. El 10 % de la sacarosa en el medio es convertida a levano; el resto es convertida a fructosa y glucosa. La formación de levano está ligado a la temperatura; ciertas cepas no producen levano a altas temperaturas (Montenecour, 1985).

3.- BIOLOGIA DE SACCHAROMYCES.

Las levaduras son cuantitativamente y económicamente el grupo más importante de microorganismos comercialmente explotados por el hombre. La importancia de estos reside en su aplicación industrial, para la obtención de productos útiles, debido a las propiedades fermentativas y oxidantes que desarrollan sobre determinados sustratos. Su contribución al progreso del hombre ha sido basada muy ampliamente en su capacidad para producir una rápida y eficiente conversión de azúcares en alcohol y CO₂ (Pelczar & Reid, 1978).

En 1838 J. F. U. Meyen denominó a estos vegetales "hongos azucarados", en latín Saccharomyces, denominación que perduró durante muchos años como nombre genérico de todos los microorganismos unicelulares que se reproducen por gemación y que eran capaces de producir en mayor o menor grado la fermentación alcohólica. Más tarde se subdividió este nombre genérico en varios (Jørgense & Hansen, 1978).

A). TAXONOMIA.

Saccharomyces cerevisiae es una levadura ascosporogena (célula capaz de formar ascosporas en su asca) que se encuentra en el grupo de los Endomycetales, familia Saccharomycetaceae, subfamilia Saccharomycoideae.

B) MORFOLOGIA

La morfología celular depende en alto grado de las condiciones bajo las cuales crecen y se conservan las células. Las células de S. cerevisiae normalmente son redondas o elipsoidales, oscilan de 1.0 a 9.0 micras de diámetro; y de 2.0 a 20.0 micras de longitud (Prescot & Gordon, 1962).

C) FISILOGIA

Las levaduras poseen dos formas de reproducción: sexual y asexual. En contraposición a la mayoría de los hongos filamentosos, la reproducción asexual no se efectúa por medio de órganos especialmente formados. La reproducción vegetativa o asexual ocurre por formación de blastosporos (gemación), por medio de la formación de conidios (fisión binaria o fisiparidad) o por combinación de los dos procesos (gemaparidad).

En el proceso de reproducción sexual, todas las levaduras "verdaderas" producen ascosporas. Por este motivo se incluyen las levaduras verdaderas en el grupo de ascomicetos u hongos con receptáculo o asca. El asca contiene, por lo general, de 1 a 4 esporas pero a veces su número es de 8 o más. Las esporas se producen por divisiones sucesivas del núcleo; cada núcleo así formado se rodea de material citoplásmico, y después, por la pared celular.

Las levaduras son organismos heterotróficos que pueden usar azúcares y una variedad de compuestos orgánicos como fuentes de nutrición. De estos compuestos ellas obtienen los esqueletos de carbono necesarios para realizar sus diferentes reacciones de biosíntesis (Rose & Harrison, 1971). S. cerevisiae tiene la habilidad de fermentar un amplio rango de azúcares por ejemplo: sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, maltotriosa.

El primer paso en la utilización de cualquier azúcar por S. cerevisiae es usualmente el siguiente:

- 1.- Paso intacto a través de la membrana celular, o
- 2.- Una hidrólisis inicial fuera de la membrana, seguida por la entrada a la célula de uno o todos los productos de la hidrólisis.

El transporte de éstos azúcares es por difusión facilitada.

3.- En cuanto estos azúcares entran a la célula, la glucosa se fosforila a la respectiva glucosa-6-monofosfato con la ayuda de una enzima común, la hexoquinasa y ATP (figura 3). Después la glucosa-6-fosfato es convertida a fructosa-6-fosfato y otra enzima fosforila ésta última en fructosa 1,6 difosfato con el gasto de una molécula de ATP. A estas reacciones le siguen una serie de pasos, vía Embden - Meyerhof o glucólisis (figura 3). El resultado total de la degradación de una molécula de glucosa es dos moléculas de CO₂ y dos moléculas de etanol con una ganancia neta de dos moles de ATP. Esta forma de energía (ATP) es usada para suplir los requerimientos energéticos para el crecimiento celular y la síntesis de productos de almacenamiento (Phaff, et al, 1978).

Las levaduras, como las bacterias y otras formas de vida, requieren de ciertos materiales alimenticios y condiciones en el

medio para un apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios, como por ejemplo el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, hierro y magnesio. Un suministro adecuado de agua es esencial para que puedan llevar a cabo actividades vitales (Prescott & Gordon, 1962).

S. cerevisiae requiere de vitaminas para realizar una función catalítica vital, las vitaminas deben por lo menos ser suministradas en el medio o sintetizadas por la misma levadura. Algunas de las vitaminas esenciales son: biotina, niacina y riboflavina, son componentes de coenzimas como NAD y FAD; ácido pantoténico, componente de coenzima A y en reacciones de acetilación; tiamina, funciona como pirofosfato de tiamina en la descarboxilación de piruvato; piridoxina, actúa en reacciones de transaminación; ácido fólico, funciona como tetrahidrofolato. La biotina parece ser la más comúnmente requerida (Jones, et al, 1981).

Los límites absolutos del pH para S. cerevisiae son de 2.8 a 8.6, pero el crecimiento óptimo es normalmente entre el rango de pH 4.5 a 6.5. La temperatura de crecimiento oscila entre 25°C y 30°C, una mayor temperatura causa desestabilización de la membrana y un rápido decremento en la viabilidad celular (Phaff et al, 1978; Jones et al, 1981).

4.- DIFERENCIAS IMPORTANTES ENTRE Zymomonas mobilis Y Saccharomyces cerevisiae

Zymomona mobilis es única porque posee la vía glucolítica Entner - Duodoroff para catabolismo de glucosa y fructosa. Esto es de interés particular porque esta vía de descomposición de azúcar es diferente a la vía Embden - Meyerhoff que utilizan las levaduras.

El rendimiento del producto (cantidad de etanol por glucosa) es el mismo para ambos organismos. El punto de atención es sobre la relación entre el proceso de suministro de energía y la demanda de energía.

En levaduras existe un acoplamiento entre los procesos anabólicos (demanda de energía) y catabolismo (producción de energía). Debido a este acoplamiento son necesarias concentraciones muy altas de levaduras para lograr una aceptable velocidad de fermentación. Este es un contraste directo a la situación existente con Zymomonas mobilis, donde el suministro de energía no es controlado por la demanda de energía de la biosíntesis del organismo y procesos anabólicos.

El rendimiento del crecimiento molar anaeróbico respecto a ATP es constante y el rendimiento molar neto de ATP es dos para

S. cerevisiae y solo un ATP para Z. mobilis, por lo tanto, el rendimiento de crecimiento para S. cerevisiae es dos veces más que de Z. mobilis. Sin embargo, La velocidad específica de crecimiento para S. cerevisiae y Z. mobilis es muy similar, por lo que se predice que la velocidad de utilización de azúcar por Z. mobilis debe ser dos veces más rápido que por S. cerevisiae.

A la misma concentración de biomasa, Zymomonas es capaz de consumir glucosa aproximadamente cinco veces más rápido que S. cerevisiae. Esto se relaciona directamente con la productividad de fermentación y es un parámetro clave en estudios comparativos con levaduras y bacterias fermentativas.

La producción de etanol por S. cerevisiae es normalmente un proceso asociado al crecimiento. El mantenimiento del metabolismo se controla por un no crecimiento de la levadura ya avanzada la fermentación, cuando la concentración de etanol es relativamente alta.

En el tiempo presente, la más seria desventaja de utilizar Z. mobilis en lugar de levaduras está relacionada a una muy restringida lista de sustratos de azúcar fermentable. Diferente de S. cerevisiae que es capaz de producir etanol de un amplio espectro de sustratos (Lawford, 1986).

5.- RENDIMIENTOS DE ETANOL POR Saccharomyces cerevisiae y Zymomonas mobilis A PARTIR DE DIFERENTES SUSTRATOS:

En trabajos realizados para la obtención de alcohol empleando levaduras, se ha observado que la producción de etanol se logra en un tiempo no menor de 36 horas. Saccharomyces cerevisiae, la levadura comúnmente empleada, puede dar rendimientos de 0.43 a partir de 100 g/l de glucosa en 36 horas (Rose, 1976), un rendimiento de 0.40 a partir de 200 g/l de sacarosa en 72 horas (Rose, 1976) y un rendimiento de 0.46 a partir de melazas de caña diluida a 23 °Bx (Pinal, 1990). Por otro lado, la bacteria Z. mobilis puede alcanzar rendimientos del 0.47 a partir de 100 g/l en 36 horas (Lawford, 1986), un rendimiento de 0.47 a partir de 200 g/l de sacarosa en 32 horas (Doelle & Greenfield, 1985) y un rendimiento de 0.50 a partir de 121 g/l de sacarosa de jugo de caña en 29 horas (Doelle & Greenfield, 1985).

6.- MELADURA O MELAZAS RICAS INVERTIDAS.

Es un producto que se obtiene de la caña de azúcar; su producción fué desarrollada durante los últimos 25 años en Cuba y Puerto Rico. La meladura se fabrica en lugar de azúcar, nunca simultáneamente (Meade, 1967).

La caña de azúcar representa un elemento muy importante dentro de la economía de nuestro país. Es una herbácea que pertenece al grupo de las gramíneas que se caracteriza por presentar parte de su constitución un tallo recto, cilíndrico, nudoso y bastante firme que le proporciona gran resistencia y flexibilidad, las hojas planas están insertadas en cada uno de los nudos. Crece por lo general en climas tropicales y subtropicales y es producida aproximadamente en cien países. Su valor principal se deriva de su alto contenido de sacarosa, la cual puede alcanzar hasta un 11 % en peso, aunque su composición está en función de las condiciones del suelo que le dió origen, así como de la variedad de la caña (Enciclopedia Monitor, 1979).

La meladura es un jarabe denso, parcialmente invertido. Debido a su alto contenido de azúcar, se usa principalmente en Estados Unidos e Inglaterra para la producción de alcohol industrial. Durante la segunda guerra mundial se utilizó una considerable cantidad como alimento y como adulcorante comercial, especialmente en Inglaterra (Meade, 1967; Honing, 1977; Kirk & Othmer, 1981; Sturión, 1988).

A) PROCESO (Figura 4):

Extracción del jugo (guarapo)

Esto se realiza mediante la compresión de la caña entre cilindros de gran tamaño llamados "mazas". Para esta extracción se prepara la caña, haciéndola pasar bajo cuchillas giratorias que cortan los tallos y las convierten en astillas. Los mejores procedimientos de molienda logran extraer en forma de jugo, más de 95% de azúcar que contiene la caña.

El bagazo final que sale del último molino contiene el azúcar no extraído, la fibra leñosa y de 40 - 50 % de agua.

Purificación del jugo (clarificación)

El jugo que trae los molinos es ácido, turbio y de color verde oscuro. En el proceso de clarificación, ideado para eliminar tanto las impurezas solubles como las insolubles, es universal el uso de la cal y el calor.

La lechada de cal, preparada con aproximadamente de 5 a 10g de hidróxido de calcio por kilogramo de azúcar, neutraliza la acidez natural del jugo (se alcaliniza a pH 6.5) el guarapo tiene entre 5 a 5.5. Después de la neutralización, el guarapo se deja sedimentar.

Mediante la sedimentación, se logra la separación de los lodos del jugo. El jugo clarificado de color café oscuro, contiene un 85 % de agua y se recircula a los evaporadores sin sufrir tratamiento adicional. Las dos terceras partes de ésta agua se evapora en un quintuple efecto al vacío. El guarapo

entra de 15 °Bx y sale entre 45 a 55 °Bx. Del quintuple efecto de evaporadores pasa al tacho (evaporador abierto) en donde se concentra a 77 °Bx (Meade, 1967).

Es necesaria la inversión parcial de la meladura para prevenir la cristalización de la sacarosa durante el almacenamiento y el transporte. Antiguamente la inversión se hacía mediante la adición de ácido inorgánico (sulfúrico o clorhídrico). Para evitar la corrosión y pérdida de azúcares que destruyen la inversión con ácido, entre los años de 1938 y 1941 se comenzó a adicionar levaduras ricas en invertasa así como enzimas comerciales.

La inversión biológica parcial de las meladuras está relacionada con la formación de notables cantidades de oligosacáridos sintetizados por la invertasa. Esto incluye principalmente la cestona (que está constituida por dos moléculas de fructosa y una de glucosa) y es fermentable (Honing, 1977).

Experimentos hechos para optimizar la fermentación alcohólica de la meladura utilizando levaduras, demostraron deficiencias de nitrógeno y otros factores que afectan el crecimiento de la levadura y la eficiencia fermentativa utilizando esta miel. Estudios realizados para corregir estas deficiencias indican que la meladura contiene la mayoría de estos nutrimentos, inclusive vitaminas y demás factores de crecimiento, excepto el nitrógeno (tabla 1).

La rapidez máxima de fermentación y producción de alcohol se consiguieron añadiendo sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (Murphy, 1984).

Por otra parte, en fermentaciones realizadas a nivel planta piloto para la producción de ron en las cuales se utilizó meladura como materia prima se analizaron los componentes del producto obtenido. Como resultado se obtuvo un destilado con mayor proporción de ésteres y menor proporción de fusel, ambas ventajas favorecieron a la industria del ron obtenidas por fermentación de meladura (Martínez & Murphy, 1984).

7.- JUSTIFICACION DEL PRESENTE ESTUDIO.

De lo anterior, y tomando en base las experiencias de la producción de alcohol por Zymomonas mobilis, puede destacarse lo siguiente:

a) La bacteria Zymomonas mobilis puede producir alcohol dos veces más rápido que la levadura Saccharomyces cerevisiae.

b) La posible producción industrial de etanol por este microorganismo ha estado restringido en parte debido a que los únicos sustratos que puede utilizar son glucosa, fructosa y s a c a r o s a .

c) Con el presente estudio se pretende proporcionar una nueva alternativa biotecnológica de producción de alcohol empleando

esta bacteria, y utilizando como única fuente de carbono la meladura, principalmente porque tiene un costo por kilogramo de un 55 % menor con respecto a la sacarosa.

d) La meladura es una materia prima producida en abundancia en esta zona geográfica, la cual se ha visto a nivel industrial que es una fuente exitosa utilizando Saccharomyces cerevisiae para la producción de alcohol.

III. HIPOTESIS

Empleando condiciones de fermentación en las cuales comúnmente se utilizan levaduras, Zymomonas mobilis, presentará mejor capacidad de producción de alcohol a partir de meladura, que la levadura Saccharomyces cerevisiae.

IV. OBJETIVOS.

1. OBJETIVO GENERAL:

El objetivo de esta tesis es el de comparar la capacidad de producción de alcohol de dos cepas de Saccharomyces cerevisiae, una de colección y otra de uso industrial y una cepa bacteriana de colección Zymomonas mobilis, al emplear meladura comercial como sustrato.

Con base a los resultados obtenidos se propone seleccionar la cepa que presente el mejor rendimiento de producción de alcohol a partir de meladura.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

A. Estandarización de inóculo.

- a) Determinación de población celular y porcentaje de viabilidad de las cepas en cultivos en medio sólido.
- b) Determinación de población celular y porcentaje de viabilidad de las cepas en cultivos en medio líquido.

B. Fermentación a nivel laboratorio en volumen de 5 litros.

- a) Determinación del rendimiento de producción de etanol de las tres cepas empleadas con base al sustrato.
- b) Cálculo de la velocidad de producción de etanol.

C. Fermentación a nivel laboratorio en volumen de 10 litros.

- a) Determinación del rendimiento de producción de etanol de las tres cepas empleadas con base al

sustrato.

b) Cálculo de la velocidad de producción de etanol.

V. MATERIAL Y METODOS

1. MICROORGANISMOS:

- Zymomona mobilis mobilis NRRL B-1960, (cepa Zm) alta productora de etanol (donada por el Dr. Cletus Kurtzman).
- Saccharomyces cerevisiae BCGC L-024, (cepa L) productora de etanol a partir de melaza.
- Saccharomyces cerevisiae, (cepa S) productora de etanol, proporcionada por la empresa Tequila Sauza, S. A. de C.V.

2. REACTIVOS:

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y obtenidos de fuentes comerciales conocidas.

3. EQUIPO:

Agitador magnético Felisa, balanza granataria Sartorius GMBH, balanza analítica E. Mettler Pc 4400, baño de temperatura constante Buchi 011, espectrofotómetro electrónico 20 Bausch & Lomb, estufa de incubación Felisa 131, hematocitómetro Biotecna, microscopio compuesto Collegiate 400, micropipetas Gilson, potenciómetro Hanna instruments HI 8424.

4. MEDIOS:

A.- Medio de mantenimiento:

El medio de mantenimiento (MMZ) para la cepa Zymomonas mobilis, fué sugerido por el Dr. Cletus Kurtzman:

Extracto de levadura	10.0 g/l
Peptona	5.0 g/l
Glucosa	20.0 g/l
Agar	15-20 g/l
pH 4.5	

El medio se esterilizó por calor húmedo, 15 minutos a 121 °C.

Medio de mantenimiento (MML) para las cepas de Saccharomyces cerevisiae L y S:

Meladura	a	12		°Bx	más:
Extracto de levadura		2.0	g/l		
(NH ₄) ₂ SO ₄		2.0	g/l		
KH ₂ PO ₄		2.0	g/l		
Mg SO ₄		1.0	g/l		
agar		30.0	g/l		
pH 4.5					

El medio se esterilizó por calor húmedo, 15 minutos a 121 °C.

Medio	de	fermentación		B.-	
				(MF):	
Meladura	a	14		°Bx	más:
Extracto de levadura		2.0	g/l		
(NH ₄) ₂ SO ₄		2.0	g/l		
KH ₂ PO ₄		2.0	g/l		
Mg SO ₄		1.0	g/l		
pH 4.5					

Esterilizar por calor húmedo, 15 minutos a 121 °C.

5. TECNICAS:

A.- Técnica para conteo directo de células por el método de azul de metileno (Bradsahw, 1985).

Los reactivos utilizados son:

Azul de metileno	10.0	g/l
Citrato de sodio	50.0	g/l

a) Procedimiento:

En un matraz aforado de 50 ml, poner 5 ml de muestra, 2.5 de azul de metileno y aforar con agua destilada. Tomar con una micropipeta de 20 ul una muestra y con ayuda de Cámara de Newbawer, contar la población total. Esta técnica nos permite conocer también la viabilidad ya que la pared celular de las levaduras muertas absorbe el colorante; y de esta forma es fácil identificar las células muertas de las vivas.

B.- Técnica para determinar azúcares reductores libres por el método de DNS (Miller, 1959; Marsdes et al, 1982; Otero, 1986).

Los reactivos utilizados son:

Hidróxido de sodio	10.0	g/l
3.5 Dinitrosalicílico	10.0	g/l
Tartrato de Na y K	200.0	g/l
Metabisulfito de Na	0.5	g/l
Fenol	2.0	g/l

Mezclar uno a uno y aforar en matraz de 1,000 ml.

a) Procedimiento:

A 0.5 ml. de muestra se adicionan 1.5 ml. de solución de DNS, se agita, y se pone en baño maría a punto de ebullición durante 10 minutos. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se agregan 8 ml. de agua destilada y se agita.

Leer absorbancia a 550 nm.

C.- Técnica para determinar azúcares reductores totales por el método de fenol - sulfúrico (Dubois et al, 1956).

Los reactivos utilizados son:

Acido sulfúrico concentrado
Fenol al 5% (v/v).

a) Procedimiento:

A 1 ml de la solución problema se le adiciona 1 ml de fenol al 5 %, enseguida se agregan 5 ml de ácido sulfúrico concentrado en forma brusca para conseguir el efecto de la hidrólisis. Se deja enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se agita y enseguida se pone a baño de agua fría durante 10 minutos.

Finalmente se lee absorbancia a 490 nm.

D.- Técnica para determinar etanol por el método de dicromato de potasio (Amarine & Ough, 1976).

Los reactivos utilizados son:

Dicromato de potasio	33.768	g/l
Acido sulfúrico	325 ml	

Se diluye el ácido sulfúrico en aproximadamente 400 ml de agua destilada, se deja enfriar y se agrega el dicromato diluido en aproximadamente 200 ml de agua destilada; y se afora en matraz a 1,000 ml.

a) Procedimiento:

A 1 ml de muestra se le agregan 2 ml de solución de dicromato y se agita, se deja reposar durante 10 minutos y posteriormente se agregan 5 ml de agua destilada, para finalmente agitar.

Leer absorbancia a 585 nm.

6. METODOLOGIA:

A. Estandarización del inóculo.

- a) Determinación de población celular y porcentaje de viabilidad de las cepas en cultivos en medio sólido:

Se crecieron las cepas en una serie de tubo con agar inclinado (un tubo para cada tiempo de muestra) que contenían el medio de mantenimiento (MMZ, MML) para cada una de las cepas. Estos tubos se sembraron por estrías, a partir de un cultivo en tubo de conservación; se incubaron a una temperatura de 30 °C por un período de 48 horas, sacando muestras a diferentes tiempos de crecimiento, para realizar el conteo de población total y el porcentaje de viabilidad. Posteriormente, a partir de estos tubos, se preparó una suspensión celular adicionando a cada tubo 50 ml de solución fisiológica estéril.

- b) Determinación de población celular y porcentaje de viabilidad de las cepas en cultivo en medio líquido y propagación de inóculo:

Para las cepas L y S, a partir de un tubo de conservación en medio sólido (MML), se tomó una asada para inocular una serie de 13 tubos, cada uno con 10 ml de medio líquido de mantenimiento (MML). Los tubos se incubaron a 30 °C en condiciones estáticas, tomándose un tubo para cada muestreo, en un período de 0 a 72 horas de incubación.

Para la cepa Zm el inóculo se tomó de un cultivo fresco en un tubo con 10 ml, el cual se empleó para inocular 100 ml de medio líquido MMZ. A partir de éste volumen, se inocularon 12 tubos con 10 ml de medio líquido MMZ. Para cada caso, el volumen de inóculo fué de 10 % (v/v), se incubaron a 30 °C en condiciones estáticas. Se tomó un tubo para cada muestreo, en un período de 0 a 72 horas de incubación y poder realizar el conteo de población celular por espectrofotometría a 650 nm a

partir de una dilución 1:25 (Maniatis et al, 1982; Laudrin et al, 1984).

A partir de los resultados obtenidos, en la edad del inóculo para cada una de las cepas, se realizó la propagación de inóculo a nivel matraz, mediante pasos sucesivos en una relación del 10 % (v/v), hasta obtener el volumen necesario de inóculo para cada una de las fermentaciones de 5 y 10 litros, manteniéndose las mismas condiciones de operación.

B. Fermentación a nivel laboratorio en volumen de 5 litros

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 6,000 ml., dos matraces que contenían 5,000 ml. de medio de fermentación; los cuales fueron inoculados al 10 % (v/v) e incubados a 35 °C por un periodo de 72 horas. Cada corrida de fermentación se hizo por duplicado. Se realizaron muestreos periódicos para medir población, azúcares libres y totales y producción de etanol.

A partir de los resultados obtenidos en los análisis, se determinó el rendimiento de producción de etanol en base al sustrato, la eficiencia de fermentación, así como la velocidad de producción de etanol.

C. Fermentación a nivel laboratorio en volumen de 10 litros

Se utilizaron garrafones de plástico de 19.0 litros que contenían 10 litros de medio de fermentación (MF) cada corrida se hizo por duplicado.

Para la preparación del medio de fermentación primeramente se ajustó la meladura a 13 °Bx se hervió por un tiempo de 10 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente para ajustar la meladura a 14 °Bx y añadir los nutrientes. Las condiciones de operación fueron las siguientes: volumen de inóculo de 10%, temperatura 35 °C por 72 horas. Se realizaron muestreos periódicos para medir población, azúcares libres y totales y producción de etanol.

A partir de los resultados obtenidos en los análisis, se determinó el rendimiento de producción de etanol en base al sustrato, la eficiencia de fermentación, así como la velocidad de producción de etanol.

VI. RESULTADOS

A. Estandarización de inóculo.

a) Determinación de población celular y porcentaje de viabilidad de las cepas en cultivos en medio sólido:

En la figura 5 se observa el crecimiento y el porcentaje de viabilidad de la cepa L durante 48 horas. Como se puede apreciar, esta curva de crecimiento no presenta fase de adaptación, empezando la fase logarítmica en las primeras horas la cual se mantiene hasta las 48 horas de incubación. Se decidió tomar como edad del inóculo un tiempo de 32 horas, con una población de 300 E6 cel/ml y una viabilidad de 100 %.

El crecimiento de la cepa S se muestra en la figura 6 en la cual se observa que no hay fase de adaptación, empezando la fase logarítmica en las primeras horas y manteniéndose hasta las 48 horas. No se observa fase estacionaria. Se decidió tomar como edad del inóculo un tiempo de 32 horas, con una población de 300 E6 cel/ml y una viabilidad de 100 %.

b) Determinación de población celular y porcentaje de viabilidad de las cepas en cultivos en medio líquido:

En la figura 7 se observa el crecimiento en medio líquido de la cepa Zm. No se presenta la fase de adaptación, empezando la fase logarítmica en las primeras horas y termina a las 18 horas, inicio de la fase estacionaria. Se tomó como tiempo de inóculo 12 horas con una población de 200 E6 cel/ml.

Para la cepa L, se muestra el crecimiento en la figura 8, en la cual no se observa fase de adaptación, la fase logarítmica se presenta en las primeras horas hasta las 12 horas observándose después de este tiempo la fase estacionaria, se tomó como edad del inóculo las 12 horas, con una población de 150 E6 cel/ml y una viabilidad de 100 %.

En la figura 9 se muestra el crecimiento de la cepa S, en la cual no se observa fase de adaptación, la fase logarítmica empieza en las primeras horas llegando a su fin a las 12 horas para empezar la fase estacionaria. Se tomó como edad de inóculo las 12 horas, con una población celular de 200 E6 cel/ml y una viabilidad de 100 %.

B. Fermentación a nivel laboratorio en volumen de 5 litros:

La figura 10 nos muestra el crecimiento celular de la cepa Zm en volumen de 5 litros. Se observó una posible fase de adaptación de las 0 a las 3 horas aproximadamente y la fase exponencial en el rango de las 3 a las 24 horas, contando con una población final de 400 E6 cel/ml.

La figura 11 nos muestra el consumo de azúcares reductores totales, así como la producción de etanol por la cepa Zm en la fermentación de 5 litros. Como se puede observar, prácticamente el consumo de azúcares y la producción de etanol se estabilizan a las 24 horas. La concentración final de etanol fué de 53.07 g/l, alcanzándose un consumo del 86 % de los azúcares del medio.

La figura 12 nos muestra el crecimiento celular y el porcentaje de viabilidad de la cepa L en la fermentación de 5 litros. No se observó fase de adaptación, empezando la fase exponencial desde las primeras horas de la fermentación, hasta las 12 horas. A partir de entoces, se observó un rápido decremento de la viabilidad hasta llegar a 1.7 % a las 72 horas, aunque la población se mantuvo constante (alrededor de 70 E6 cel/ml). La figura 13 nos presenta el consumo de azúcares totales y la producción de etanol de la cepa L. Se observó lo mismo que para la cepa Zm, con respecto al consumo de azúcares y la producción de etanol. Se alcanzó una producción de 59.84 g de etanol/l y un consumo del 93 % de los azúcares del medio.

En la figura 14 se presenta la población celular y el porcentaje de viabilidad de la cepa S en fermentación de 5 litros. No se observó fase de adaptación; la fase exponencial se inició en las primeras horas hasta las 9 horas, en la cual se alcanza una población de 125 E6 cel/ml. La viabilidad se mantuvo en un 100 % hasta las 12 horas, y fué disminuyendo hasta un 5 % a las 72 horas de fermentación.

En la figura 15 se presenta el consumo de azúcares reductores totales y la producción de etanol de la cepa S en fermentación de 5 litros. El consumo de azúcares y la producción de etanol se estabilizan a las 24 horas, alcanzándose una producción de etanol de 60 g/l y un consumo del 93 % de los azúcares originalmente presentes en el medio.

En la tabla 2 se compara el rendimiento del producto, la eficiencia de fermentación, así como la velocidad de fermentación de las tres cepas en la fermentación de 5 litros. Como se puede observar, con las cepas L y S se obtuvieron rendimientos y velocidades de fermentación semejantes (0.49, 97 % y 2.49, respectivamente), los cuales fueron mayores a los obtenidos con la cepa Zm (0.43, 83 % y 1.86, respectivamente).

C. Fermentación a nivel laboratorio en volumen de 10 litros :

En la fermentación en volumen de 10 litros, las figuras 16 y 17 nos presentan el crecimiento celular y la producción de etanol y el consumo de azúcares de la cepa Zm, respectivamente. La producción de etanol, el consumo de azúcares, así como el crecimiento, se estabilizan a las 20 horas. Se alcanzó una concentración celular de 437 E6 cel/ml y una concentración de etanol de 59.83 g/l. Hubo un consumo del 88 % de los azúcares originalmente presentes en el medio.

En la figura 18 se muestra el crecimiento celular y el porcentaje de viabilidad de la cepa L en la fermentación de 10 litros. Se observa que a las 12 horas se tiene la concentración celular más alta 130 E6 cel/ml y la viabilidad a un 100 %. Después de éste tiempo, el porcentaje de viabilidad declina muy rápidamente hasta un 1 % a las 72 horas, notándose que la población celular también baja hasta 104 E6 cel/ml.

En la figura 19 se muestra la producción de etanol y el consumo de azúcares reductores totales de la cepa L en la fermentación de 10 litros. Se observa que ambos se estabilizan a las 20 horas de fermentación, alcanzándose una concentración final de etanol de 59.6 g/l y un consumo de azúcares de un 97 % de los presentes originalmente en el medio.

En la figura 20 se muestra el crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa S en la fermentación de 10 litros. A las 20 horas se presenta la concentración celular más alta de 138 E6 cel/ml y un porcentaje de viabilidad de , después de éste tiempo ambos empiezan a declinar lentamente, hasta llegar a las 72 horas con una población de 103 E6 cel/ml y una viabilidad de 37 %.

La figura 21 nos muestra la producción de etanol y el consumo de azúcares totales de la cepa S en la fermentación de 10 litros. A las 20 horas de fermentación se estabilizan ambas, alcanzándose una concentración de etanol de 60.48 g/l y un consumo de azúcares del 96 % de los azúcares presentes originalmente en el medio.

La tabla 3 se compara el rendimiento del producto, la eficiencia de fermentación y la velocidad de fermentación de las tres cepas en la fermentación de 10 litros. Como se puede observar las tres cepas presentaron la misma velocidad de fermentación, los valores mas altos de rendimiento y eficiencia los obtuvo la cepa L (0.49 y 97 %, respectivamente), posteriormente la cepa Zm obtuvo 0.48 y 94 % respectivamente y finalmente la cepa S obtuvo 0.47 de rendimiento y 92 % de eficiencia.

VII. DISCUSION

A. Estandarización de inóculo.

Con el objeto de conocer el tiempo en que la célula está en óptimas condiciones para llevar a cabo la transformación de los azúcares a etanol, se realizó la estandarización del inóculo, ya que al conocer las fases de crecimiento y la viabilidad se refleja el estado fisiológico del microorganismo.

Se realizaron diferentes pruebas de crecimiento en medio sólido para la cepa Zm, pero en ninguna se obtuvo un resultado positivo, la cepa solamente creció en el mismo MMZ. Al parecer, la bacteria sufría de inhibición por causa de algún componente presente en las fuentes de azúcar probadas (meladura, mascabado, azúcar refinada) (Rhee, 1984).

Se obtuvo buen crecimiento de la cepa Zm en medio líquido MML, sólo que no se pudo determinar el porcentaje de viabilidad, ya que éste sólo se podía realizar por crecimiento en placa y ésta cepa no creció en medio sólido, por lo que sólo se realizó conteo de población por espectrofotometría.

Al observar el comportamiento en medio líquido de las tres cepas, el tiempo de inóculo recomendado de 12 horas resultó adecuado para nuestro trabajo, pudiéndose comparar con los tiempo de inóculo empleados en los procesos comerciales, que usan una edad de inóculo no menor de 24 horas. Sturión reporta tiempo de inóculo de 24 a 28 horas para la producción de alcohol a partir de melazas y meladura; Presscot reporta un tiempo de 24 horas como edad del inóculo a partir de melazas.

B. Fermentación a nivel laboratorio en volumen de 5 litros

En la fermentación de 5 litros, la cepa Zm fué la que obtuvo los valores más bajos de las tres cepas, tanto en rendimiento, eficiencia como en la velocidad de fermentación, sin embargo, los valores obtenidos están dentro del rango que se han manejado en otros trabajos realizados con Z. mobilis.

Doelle & Greenfield reportan un rendimiento de 0.33 para la cepa Z. mobilis UQM 2716, a partir de 400 g/l de sacarosa y de 0.39 a partir de azúcar refinada a una concentración inicial de 110 g/l.

Los valores obtenidos por las cepas L y S están entre los valores más altos que se reportan en otros trabajos, Pinal en 1990 reporta un rendimiento de 0.46 a partir de melazas de caña para la cepa L. Por lo que todavía resulta una buena alternativa para la producción de alcohol a partir de meladura.

C. Fermentación a nivel de 10 litros.

En esta fase, se intentó verificar los resultados anteriormente obtenidos, lográndose alcanzar aún resultados más altos (en rendimiento, eficiencia y velocidad de fermentación) que los encontrados en 5 litros para la cepa Zm, mientras que para las cepas L y S se mantuvieron los mismos resultados.

Este cambio pudo deberse a que las corridas de fermentación en 10 litros se realizaron con un lote nuevo de meladura, debido a que el lote utilizado para estandarización de inóculo, mantenimiento de las cepas y la fermentación de 5 litros se terminó y quizás en éste lote era más marcada la presencia de algún inhibidor para la cepa Zm.

Los resultados obtenidos apoyan la posibilidad de usar meladura con respecto a lo mencionado: costo de la materia prima, contenido de nutrientes, buenos rendimientos de producción

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES :

- 1.- Se obtuvo una edad de inóculo de 12 horas, la cual es mejor que las usadas en la industria alcoholera. Se considera, sin embargo, necesario hacer algunos experimentos posteriores para su aplicación a escala industrial.
- 2.- Las concentraciones de alcohol alcanzadas, tanto para la cepa Zm (59.83 g/l) como por la levadura L (59.6 g/l) y la levadura S (60.48 g/l) son más altas que las reportadas en trabajos experimentales empleando melazas (57.2 g/l). Por lo cual, se considera factible la utilización de meladura como una buena alternativa para la producción de alcohol.
- 3.- De las dos levaduras, la levadura L fué mejor que la levadura S, la primera logró alcanzar un rendimiento de 0.49 y una eficiencia de 97%, o sea, presenta mejores probabilidades para la producción de alcohol a partir de meladura, aunque esto falta comprobarse a escala industrial.
- 4.- La Z mobilis resulta menos eficiente que la levadura Saccharomyces cerevisiae para la producción de alcohol a partir de meladura, alcanzándose solamente una eficiencia de 92% mientras que la levadura obtuvo un 97% de eficiencia.
- 5.- Una causa probable, por la cual la Z. mobilis resultó menos eficiente, fué que el sustrato contenía algunos inhibidores, por lo cual se recomienda que en trabajos posteriores:
 - (1) se realicen experimentos para detectar la influencia de algún elemento que pueda resultar inhibitorio;
 - (2) desarrollar algún método para eliminar este inhibidor,
 - y
 - (3) llevar a cabo algún mejoramiento genético de Z. mobilis, para que la presencia de este elemento no la inhiba.

TABLA 1. COMPOSICION QUIMICA DE LA MELADURA

CONSTITUYENTES PRINCIPALES (%)

CONSTITUYENTES	DATOS DE UNDERKOFLER Y HICKEY	DATOS DE WHITE
AGUA	14 - 19	8 - 14
MATERIA SECA	81 - 86	86 - 92
AZUCAR TOTAL INVERTIDO	72 - 79	70 - 86
N TOTAL	0.07 - 0.20	0.05 - 0.25
CARBONO	-----	28 - 36
CENIZAS TOTALES	2 - 3	1.8 - 3.6
P ₂ O ₅	0.2 - 0.6	0.03 - 0.22
CaO	0.03 - 0.30	0.15 - 0.35
MgO	0.01 - 0.03	0.12 - 0.25
K ₂ O	0.7 - 1.4	0.2 - 0.7

CONSTITUYENTES MENORES (γ /100g)

CONSTITUYENTES	DATOS DE ROGERS Y MICKELSON	DATOS DE WHITE
VITAMINA B ₁	160	---
VITAMINA B ₂	62	---
VITAMINA B ₆	160	---
FACTOR PP	240	---
AC. PANTOTENICO	270	250
AC. FOLICO	1.5	---
BIOTINA	32	30 - 40
INOSITOL	----	85 - 100

FUENTE: Honing P., 1967.

TABLA 2. COMPARACION DE RESULTADOS DE LAS TRES CEPAS EN LA FERMENTACION DE 5 LITROS.

CEPA	Y P/S	EFICIENCIA DE FERMENTACION (%)	VELOCIDAD DE FERMENTACION (g/l.h)
Zm	$\frac{44.55-3.19}{124.44-27.06} = 0.43$	83	1.86
L	$\frac{60.06-3.53}{120.47-5.69} = 0.49$	97	2.50
S	$\frac{59.84-4.58}{117.82-5.62} = 0.49$	97	2.50

Y P/S (r ndimiento del producto en base al sustrato).

TABLA 3. COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LAS TRES CEPAS EN LA FERMENTACION DE 10 LITROS.

CEPA	Y P/S	EFICIENCIA DE FERMENTACION (%)	VELOCIDAD DE FERMENTACION (g/l.h)
Zm	$\frac{59.60-2.24}{134.68-14.98} = 0.48$	94	2.48
L	$\frac{59.60-3.80}{124.76-6.36} = 0.47$	92	2.48
S	$\frac{59.60-3.71}{119.72-6.36} = 0.49$	97	2.48

Y P/S (rendimiento del producto en base al sustrato).

MICROORGANISMO + NUTRIMENTOS + CONDICIONES
AMBIENTALES
ADECUADAS

→

F E R M E N T A C I O N

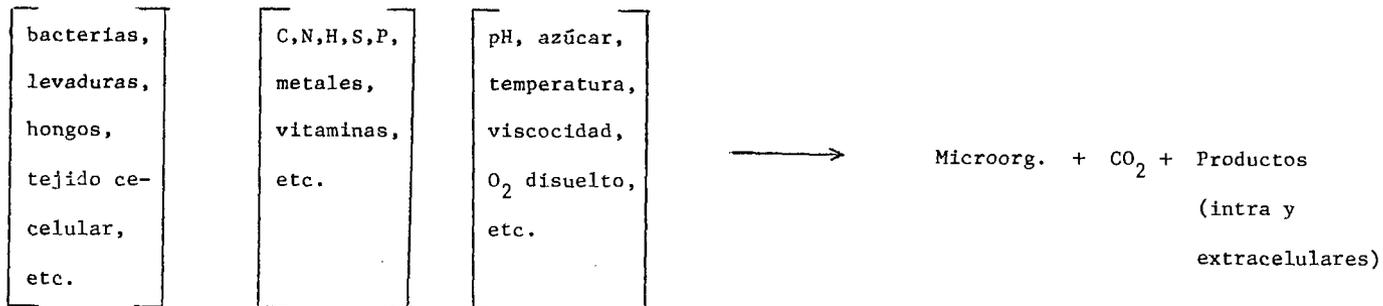


FIGURA 1. FACTORES Y COMPONENTES CARACTERISTICOS, NECESARIOS PARA LA REALIZACION DEL PROCESO DE PRODUCCION DE ALCOHOL POR FERMENTACION.

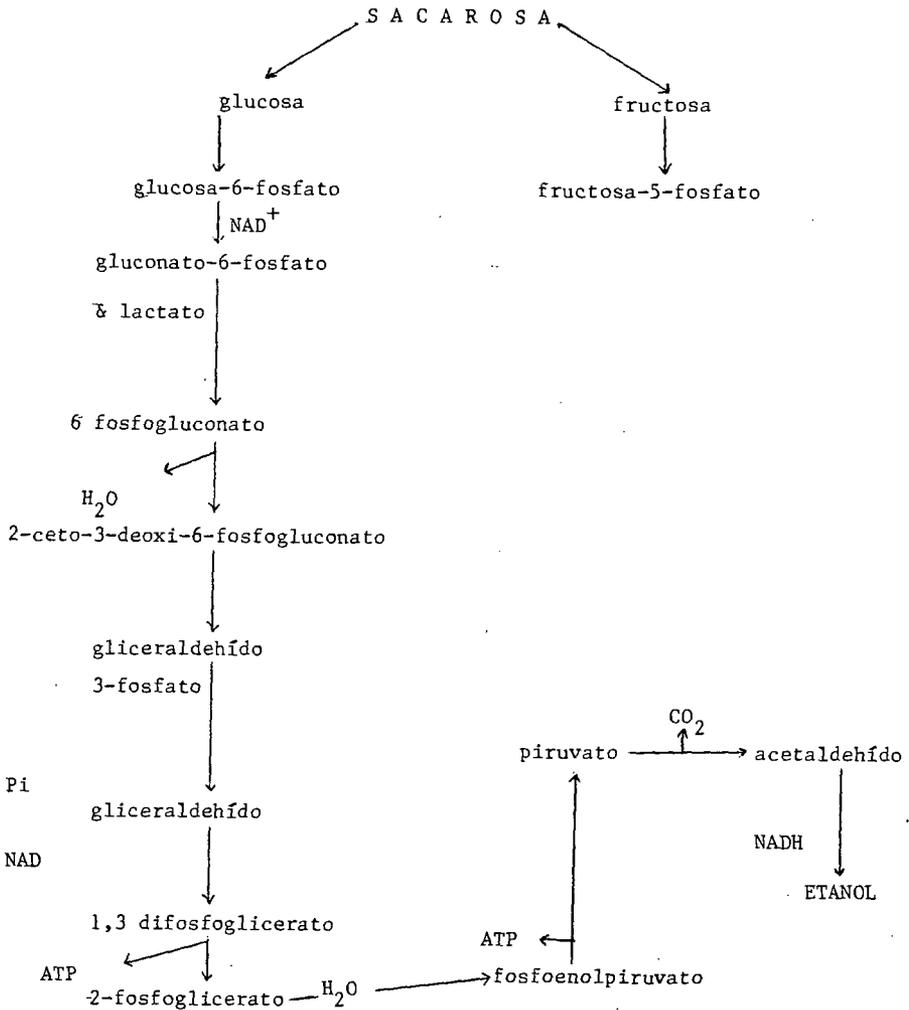


FIGURA 2. VIA METABOLICA ENTNER DOUDOROFF :

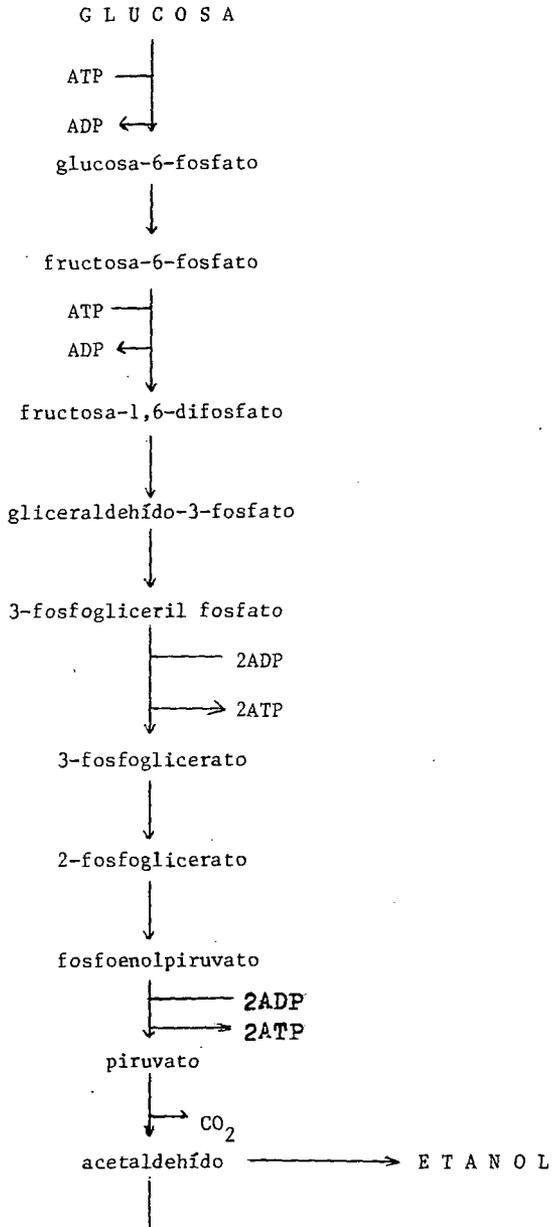


FIGURA 3. VIA METABOLICA EMBDEM-MEYER-HOFF :

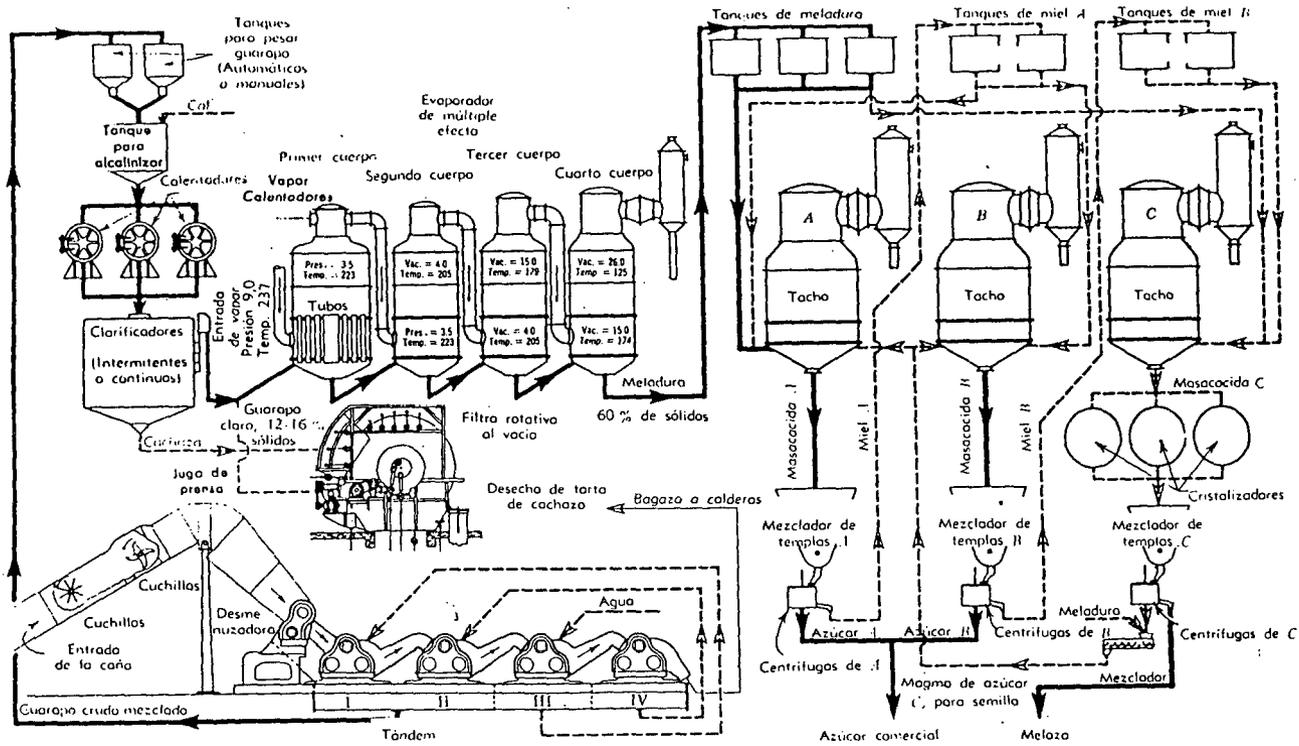


FIGURA 4. PROCESO DE PRODUCCION DE MELADURA.

fuentes: Meade, 1967.

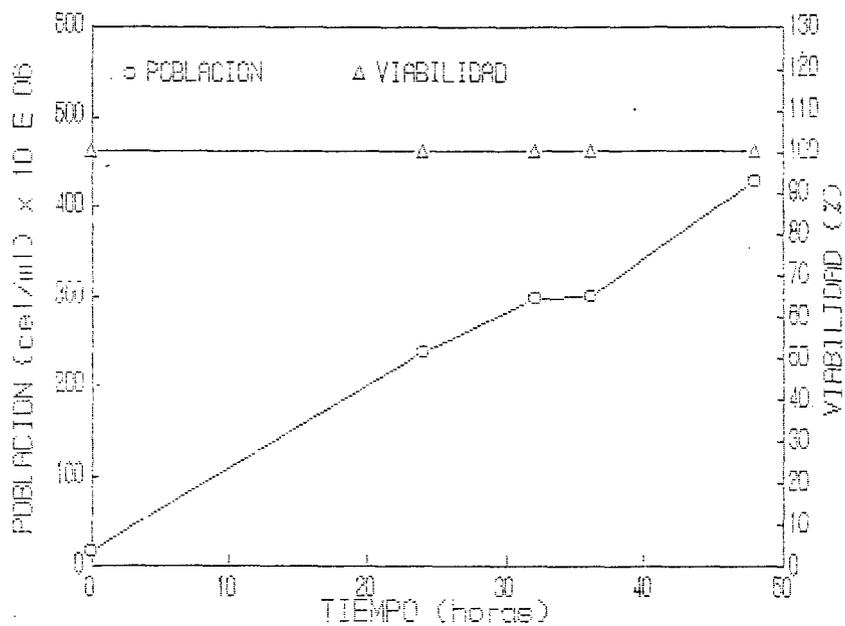


FIGURA 5. CRECIMIENTO CELULAR Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA CEPA Sacharomyces cerevisiae (L) EN MEDIO SOLIDO (MML).
CONDICIONES: 30 °C, 48 h.

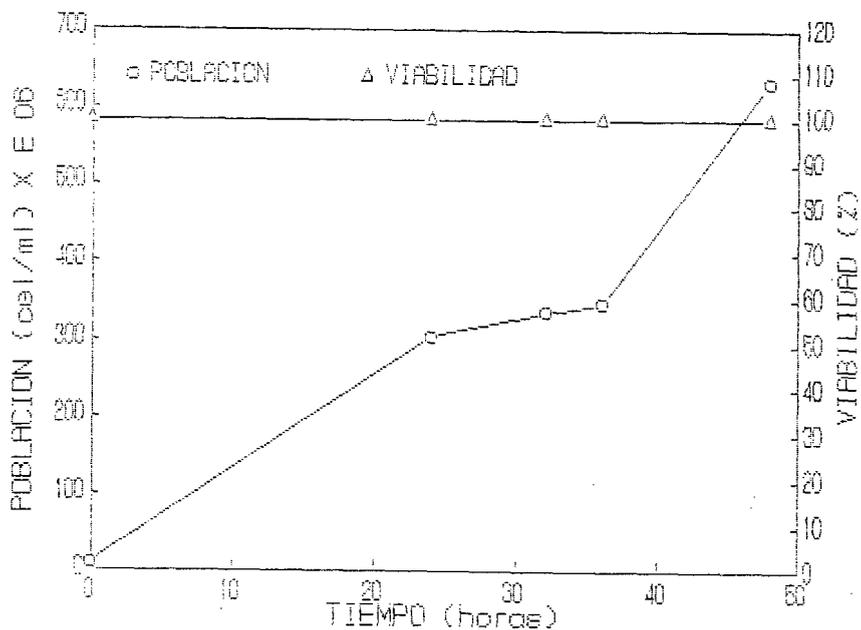


FIGURA 6. CRECIMIENTO CELULAR Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* (S) EN MEDIO SOLIDO. (MML) CONDICIONES: 30 °C, 48 h.

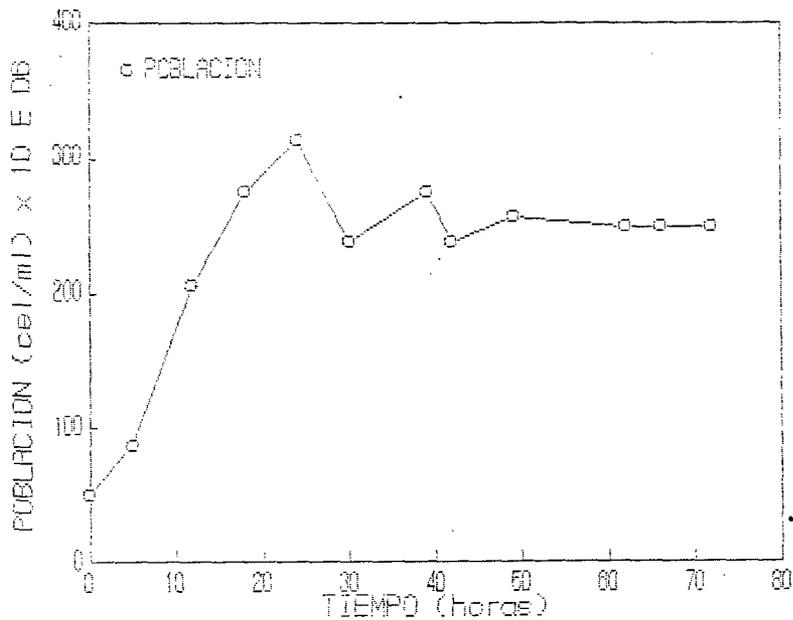


FIGURA 7. CRECIMIENTO CELULAR DE LA CEPA *Zymomonas mobilis* (Zm) EN MEDIO LIQUIDO (MML).
CONDICIONES: Inóculo 10 % (v/v), 30 °C, 72 hs.

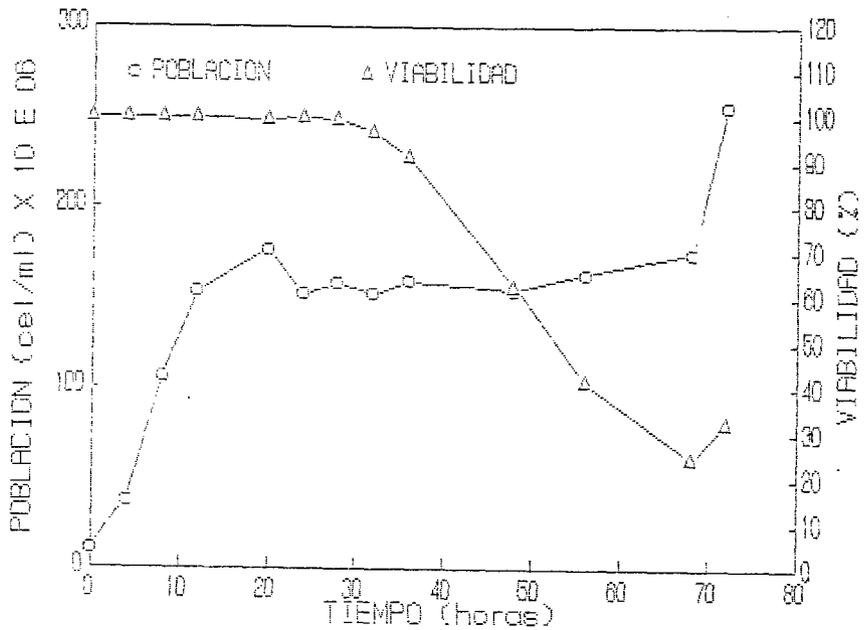


FIGURA 8. CRECIMIENTO CELULAR Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA CEPA Saccharomyces cerevisiae (L) EN MEDIO LIQUIDO (MML).
CONDICIONES: Inóculo 10 % (v/v), 30 °C, 72 h.

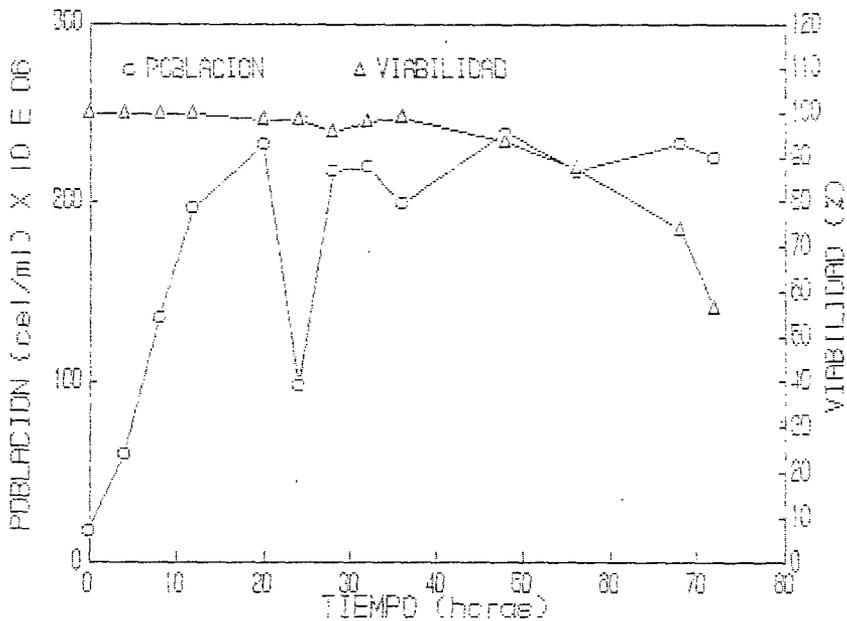


FIGURA 9. CRECIMIENTO CELULAR Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* (S) EN MEDIO (MML).
CONDICIONES: Inóculo 10 % (v/v), 30 °C, 72 h.

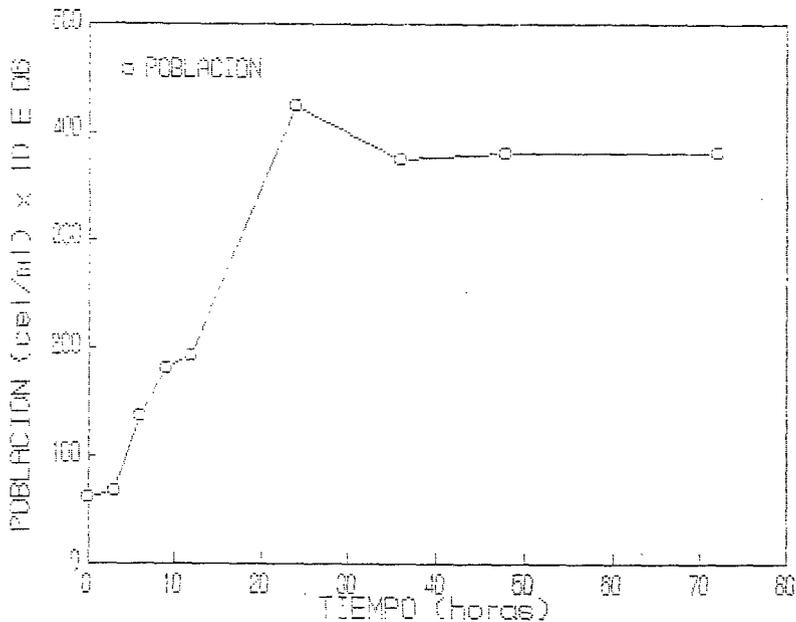


FIGURA 10. CRECIMIENTO CELULAR DE Zymomonas mobilis (Zm) EN FERMEN-
TACION DE 5 LITROS.

CONDICIONES: Vol. 5 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C,
72 h.

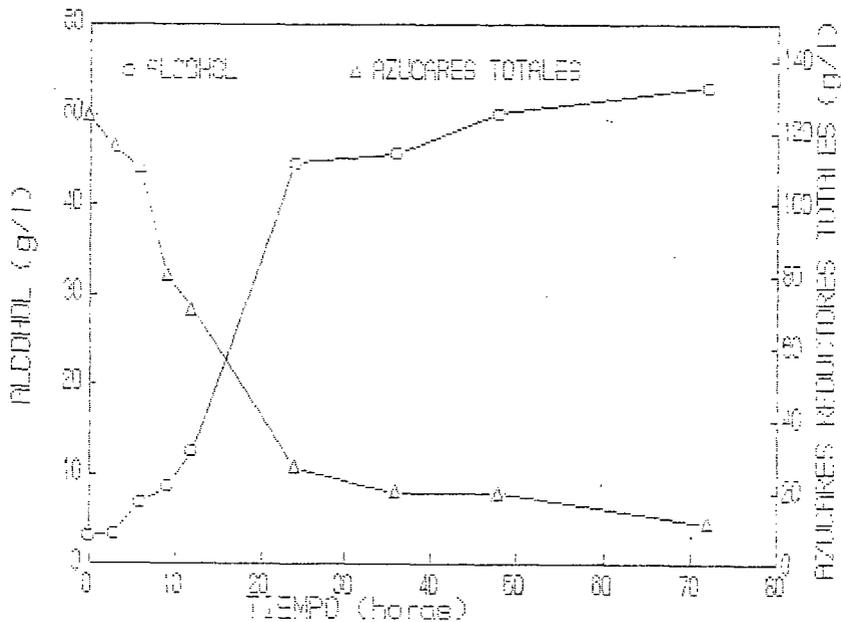


FIGURA 11. CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES Y PRODUCCION DE ALCOHOL DE LA CEPA *Zymomonas mobilis* (Zm) EN FERMENTACION DE 5 LITROS.

CONDICIONES: Vol. 5 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C, 72 h.

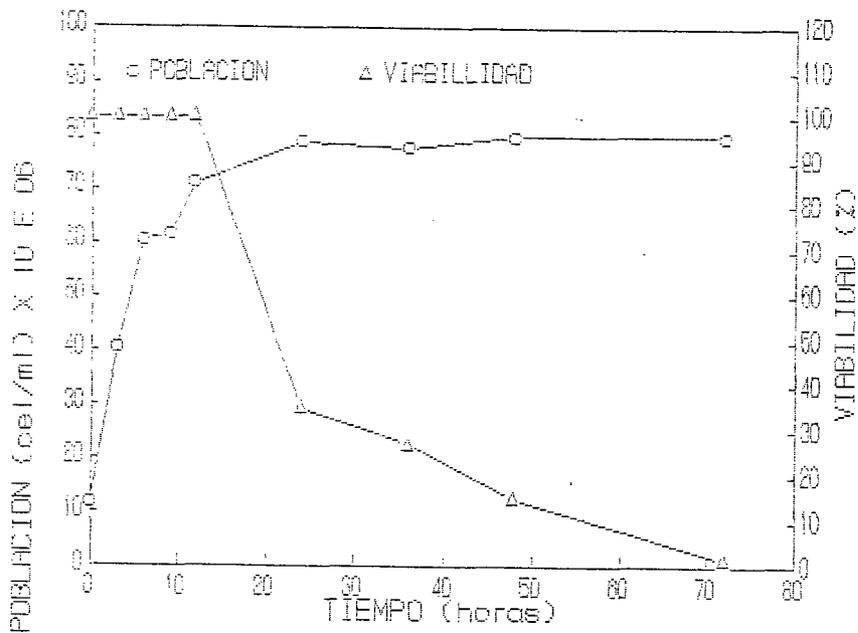


FIGURA 12. CRECIMIENTO CELULAR Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA CEPA Saccharomyces cerevisiae (L) EN FERMENTACION DE 5 LITROS. CONDICIONES: Vol. 5 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C, 72 h.

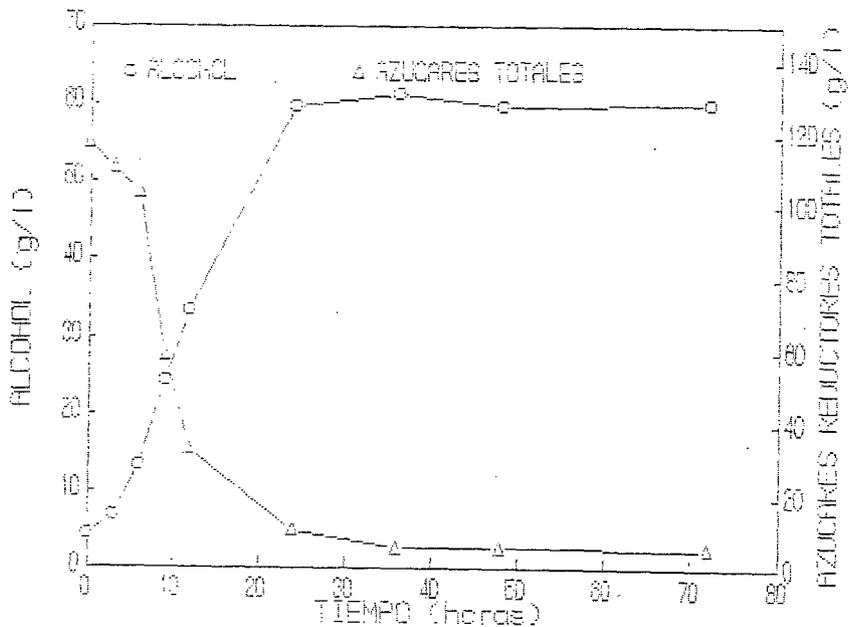


FIGURA 13. CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES Y PRODUCCION DE ALCOHOL DE LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* (L) EN FERMEN-TACION DE 5 LITROS.

CONDICIONES: Vol. 5 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C, 72 h.

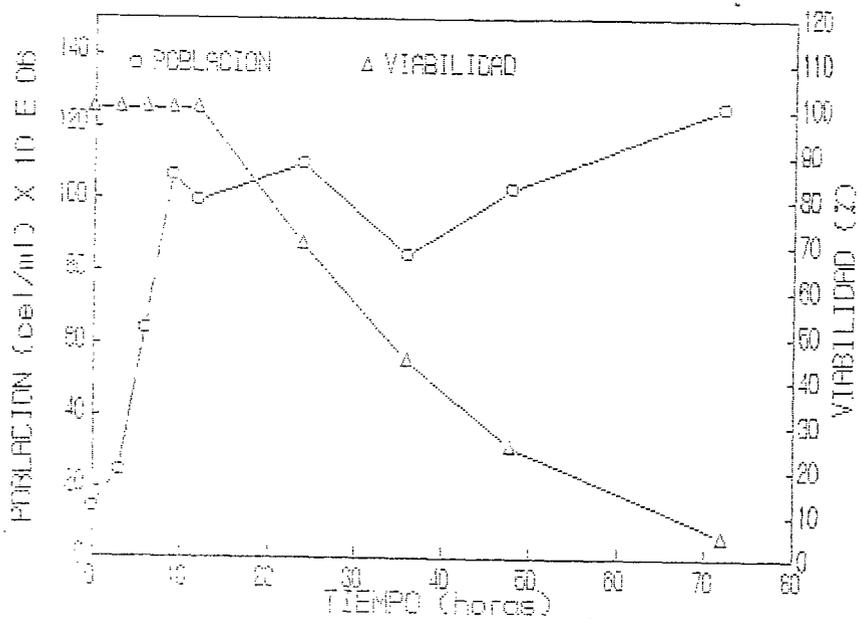


FIGURA 14. CRECIMIENTO CELULAR Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* (S) EN FERMENTACION DE 5 LITROS. CONDICIONES: Vol. 5 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C, 72 h.

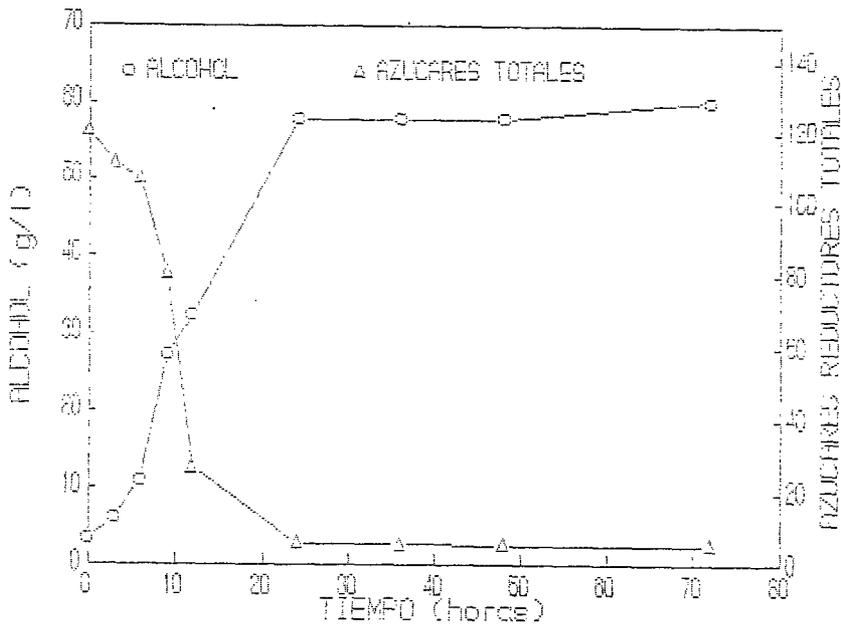


FIGURA 15. CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES Y PRODUCCION DE ALCOHOL DE LA CEPA Saccharomyces cerevisiae (S) EN FERMEN TACION DE 5 LITROS.
 CONDICIONES: Vol. 5 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C, 72 h.

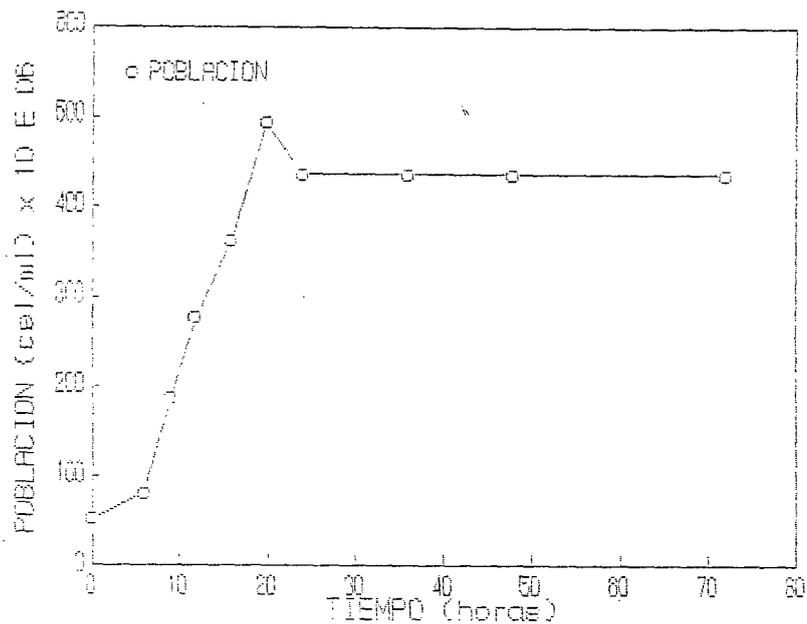


FIGURA 16. CRECIMIENTO CELULAR DE LA CEPA *Zymomonas mobilis* (Zm) EN FERMENTACION DE 10 LITROS.
 CONDICIONES: Vol. 10 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C, 72 h.

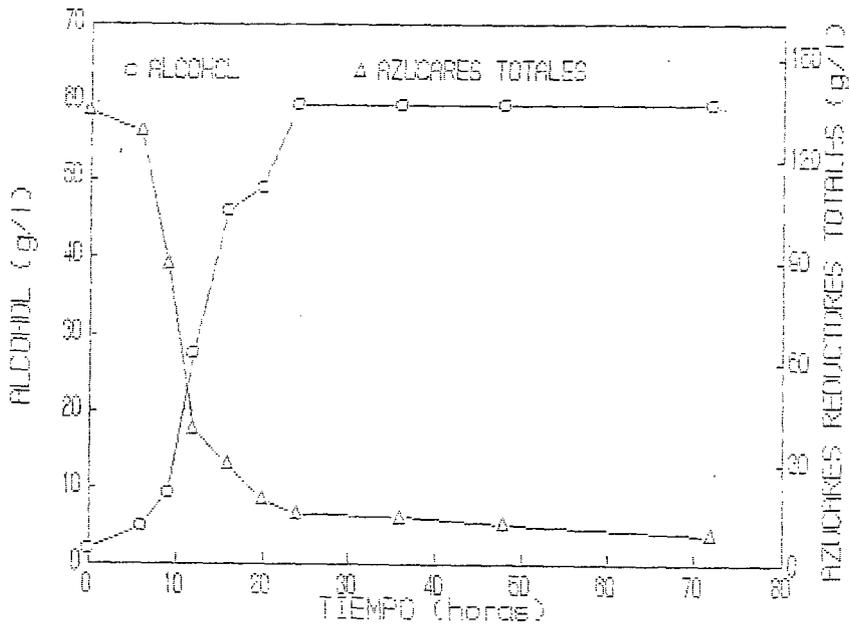


FIGURA 17. CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES Y PRODUCCION DE ALCOHOL DE LA CEPA *Zymomonas mobilis* (Zm) EN FERMENTACION DE 10 LITROS.

CONDICIONES: Vol. 10 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C, 72 h.

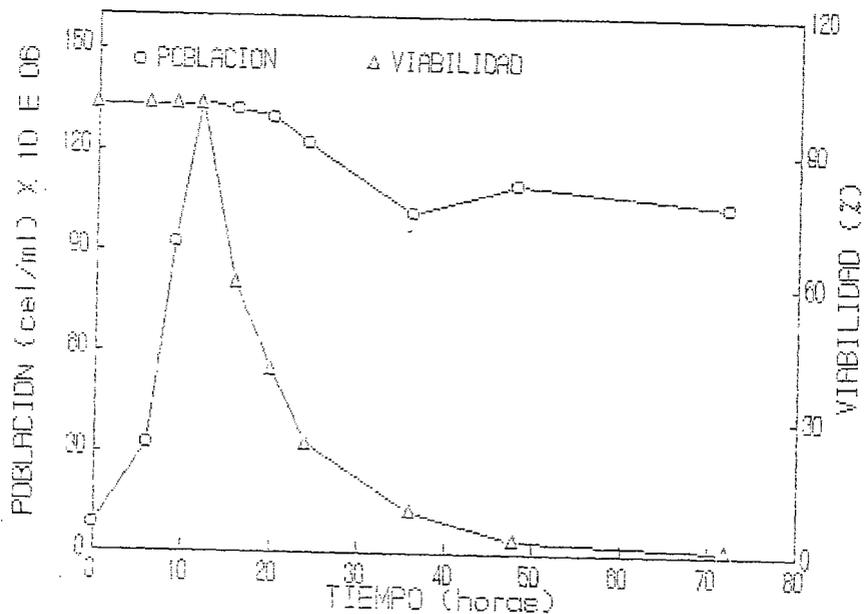


FIGURA 18. CRECIMIENTO CELULAR Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* (L) EN FERMENTACION DE 10 LITROS. CONDICIONES: Vol. 10 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C, 72 h.

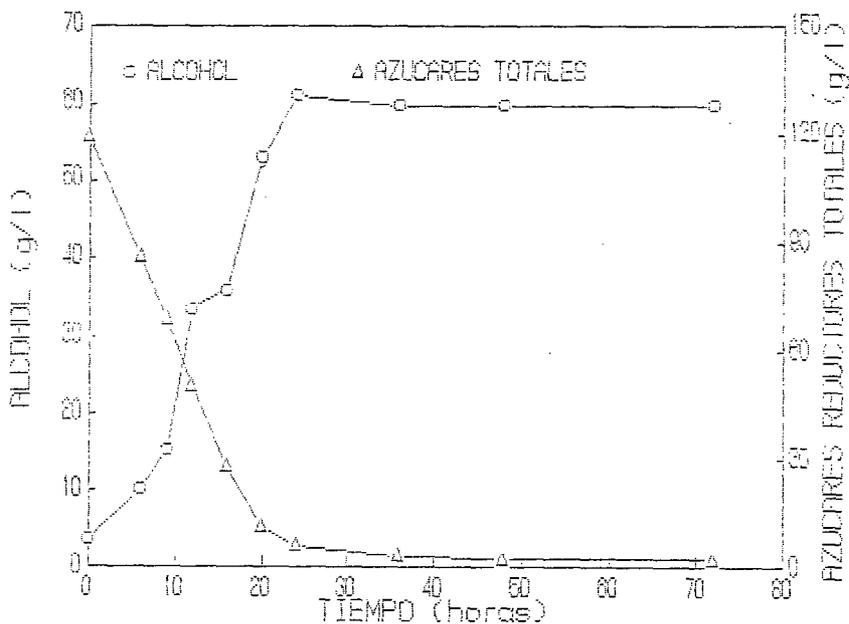


FIGURA 19. CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES Y PRODUCCION DE ALCOHOL DE LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* (L) EN FERMEN-TACION DE 10 LITROS.
CONDICIONES: Vol. 10 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C, 72 h.

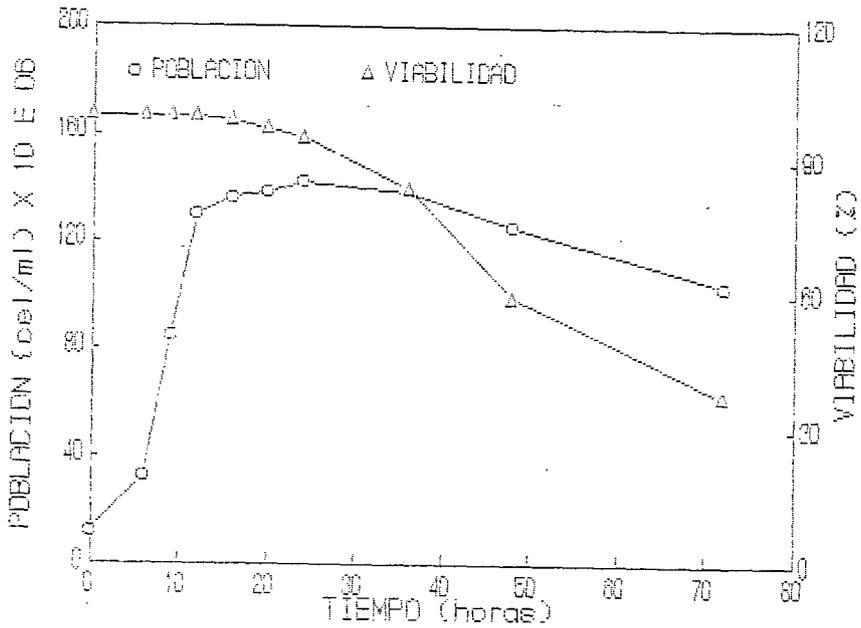


FIGURA 20. CRECIMIENTO CELULAR Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* (S) EN FERMENTACION DE 10 LITROS. CONDICIONES: Vol. 10 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C, 72 h.

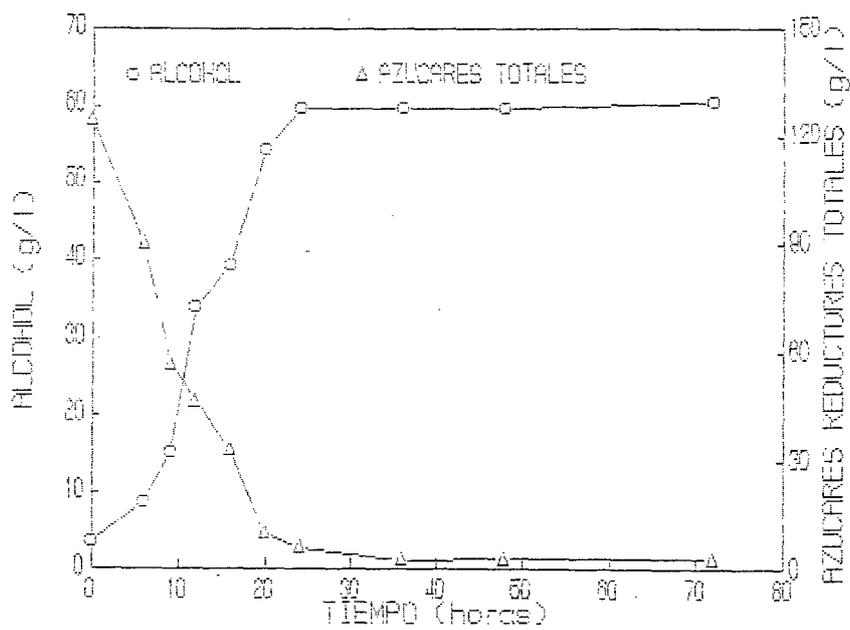


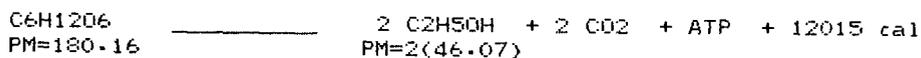
FIGURA 21. CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES Y PRODUCCION DE ALCOHOL DE LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* (S) EN FERMEN-TACION DE 10 LITROS.
 CONDICIONES: Vol. 10 litros, inóculo 10 % (v/v), 35 °C, 72 h.

ANEXO 1.

- 1.- El rendimiento ($Y_{p/s}$): Son los gramos del metabolito en cuestión entre los gramos de sustrato consumido.

$$Y(p/s) = \frac{g \text{ de etanol (final)} - g \text{ etanol (inicial)}}{g \text{ ART (final)} - g \text{ ART (inicial)}}$$

- 2.- La eficiencia de fermentación: se calcula en base al máximo teórico por una regla de tres.



$$Y(p/s) \text{ máximo teórico} = \frac{92.14}{186.16} = 0.51$$

$$- Y(p/s) \quad \frac{0.51}{\text{-----}} \quad \frac{100 \% \text{ eficiencia}}{X}$$

- 3.- La velocidad de fermentación: se calcula dividiendo la concentración máxima de alcohol entre el tiempo de fermentación requerido para alcanzarla.

$$V = \frac{g \text{ de etanol}}{\text{tiempo h}}$$

IX. BIBLIOGRAFIA

- Amarine M. A. & Ough., 1976. Determinación de Etanol en el Destilado In: Análisis de Vinos y mostos. Ed. Acribia España: 54-59.
- Bradsahw J., 1985. Microbiología de laboratorio. Ed. Manual Moderno: 24-61.
- Buchanan R. E. & Gibbons N. E., 1984. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. Noe R. Krieg. 1: 576-580.
- Buchholz S. E., Dooley M. M. & Eveleigh D. E., 1987. Zymomonas-an alcoholic enigma. Trends in Biotechnology 5 (7): 199-203.
- Carey V. C. & Ingram L. O., 1983. Lipid Composition of Zymomonas mobilis Effects of Etanol and Glucosa. J. Bacteriol. 154: 1291-1306.
- Cocheiro A. A., 1985. Biotecnología y Energía In: Prospectivas de la Biotecnología en México. Ed. Ramirez O. R. CONACYT: 445-461.
- Correa L., 1978. Estudio de la acción de las enzimas sobre la fermentación. Tesis profesional, Ingeniero Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas, U de G.
- Dawes E. A, Ribbons D. W. & Large P. J., 1966. The Route of Formation in Zymomonas mobilis. Biochem. J. 98: 795-803.
- Doelle H. W. & Greenfield P. F., 1985. The Producción of Ethanol form Sucrose Using Zymomonas mobilis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 405-410.
- Doelle H. W. & Greenfield P. F., 1985. Fermentation Pattern of Zymomonas mobilis at High Sucrose Concentration. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 411-415.
- Dubbois M. Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. & Smith F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. Analytical Chemistry. 28 (3): 350-356.

Honing P., 1967. Principios de Tecnología Azucarera. Ed CECSA. 3 : 473- 474.

Jones R. P., Pamment N. & Greefield P. F., 1981. Alcohol Fermentation by Yeast - The Effect of Enviromental and Other Variables. Process Biochemistry 16 (3): 42.

Kirk R. E. & Othmer D. F., 1962. Enciclopedia de Tecnología Química. UTEHA. primera edición. 7: 876.

Kirk R. E. & Othmer D. F., 1981. Alcohol Industrial. Producción de Alcohol. Enciclopedia de Tecnología Química. UTEHA. 1: 745-781.

Lawford H., 1986. Zymomonas mobilis: An alternative alcohol producer. Alltech's 6TH Annual Alcohol School: 1-25.

Lehninger A. C., 1985. Bioquímica. Ed. Omega S. A. Barcelona España: 427-449.

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

Marsden W. L., Gray P. P., Nippard G. J. & Quilan M. P., 1982. Evaluation of the DNS method for analysing lignocellulosic hydrolyisates. J. Chem. Tech. Biotechnol. 32 (11): 1016-1022.

Martínez G. & Murphy N. F., 1984. Congeneres from High Test Molasses Alcoholic Fermentation. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico 3: 59-66.

Meade G. P., 1967. Manual del Azúcar de Caña. Ed. Montaner y Simón, Barcelona: 323-325.

Miller G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reaget for Determination of Reducing Sugar. Analitycal Chemistry. 3: 426-428.

Montenecour B. S., 1985. Zymomonas A Unique Genus of Bacteria In: Biology of Industrial Microorganis. Demaind A. L. & Solomon A. L., 1985. Ed. Benjamin/Cummings 9: 261-289.

Murillo, M. E., Gallagos M. & Galan W., 1984. Producción de etanol por diversas cepas de Zymomonas mobilis aisladas de diferentes fuentes naturales. Congreso Nacional de Microbiología, MI-2: 142.

Murphy N. F., 1984. Fermentation of High Test Molasses. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico, 3: 33-44.

Otero M. A., Reyes A. & Martínez S., 1986. Limitaciones del Acido 3-5 dinitro-salicílico en mieles finales. ICIDCA, 20 (1): 20-25.

Phaff H. J., Miller M. W. & Mraak E. M., 1978. The life of yeast. Ed 2, Revised and Enlarged, Harvard University Press Cambridge Massachusetts and London, England.

Pelczar M. J., Reid R. N., 1978. Microbiología. Ed. McGraw-Hill, México: 211-222.

Pellón J. R., 1986. La ingeniería Genética y sus Aplicaciones. Ed. Acribia S. A. Zaragoza, España: 175-180.

Presscot & Dunn., 1976. Producción de alcohol por fermentación In: Microbiología Industrial. Ed. Aguilera: 110-133.

Presscot K. & Gordon S. C., 1962. Microbiología Industrial Ed. Aguilera: 15-21, 121.

Pinal Z. L., 1990. Comparación de cuatro cepas de Saccharomyces cerevisiae. Tesis profesional, Lic. en Biología. Facultad de Ciencias, U de G.

Quintero R. R., 1987. Ingeniería Bioquímica. Ed. Alhambra Mexicana: 15-38.

Ramírez G. R., 1985. Prospectiva de la Biotecnología en México In: Prospectiva de la Biotecnología en México. CONACYT: 461-478.

Rhee S. K., Pagan R. J., Lefebure M. F., Wong L. & Rogers P. C., 1984. Ethanol Production from Desalted Molasses Using Saccharomyces uvarum and Zymomonas mobilis. J. Ferment. Technol. 62 (3):297-300.

Rose D., 1976. Yeasts for Molasses Alcohol. Process Biochemistry 11 (10): 10-12.

Rose A. & Harrison J. S., 1985. The yeast fisiology and biochemistry of yeast. Ed. Academic- press. 2: 122-124.

Seiller L., Torrijos M., Uribelarrea J. L. & Goma G., 1984. Alcoholic Fermentation by Zymomonas mobilis: Effect of initial substrate on physiological parameters. Biotechnology Letters 6 (7): 477-480.

Stewart G. G. & Rusell I., 1971. The Biology of Saccharomyces In: Biology of Industrial Microorganisms. Demain A. L. & Solomon N. A. (comp) Biotechnology series: 515-536.

Sturión C. A., 1988. Tecnología de la producción de alcohol por fermentación. GEPLACEA: 25-38.