

Fermentación de sacarosa suplementada con azúcares monoméricas¹

Angel Moret Figueroa² y Carlos Basilio Reyes³

RESUMEN

Zymomonas mobilis es una bacteria que presenta varias ventajas sobre la levadura para producir etanol. Esta bacteria fermenta la glucosa y la fructosa con un alto rendimiento etanólico. Sin embargo, la fermentación de sacarosa es menos eficiente. Como la sacarosa es el azúcar que más se usa en los procesos fermentativos en la zona del Caribe es muy importante encontrar condiciones de cultivo o factores que mejoren su rendimiento etanólico. En este trabajo se encontró que añadiéndole los monómeros glucosa y fructosa o una combinación de ellos, al medio básico suplementado con 6% de sacarosa, puede lograrse un aumento significativo en el rendimiento etanólico.

ABSTRACT

Fermentation of sucrose supplemented with monomeric sugars

Zymomonas mobilis is a bacterium which presents several advantages over yeast with respect to ethanol production. It ferments monosaccharides with higher yields and tolerates higher concentrations of ethanol and sugars. However, the alcoholic fermentation of sucrose, which is the most widely used sugar for alcohol production in the Caribbean area, is poor. Therefore, it is important to find how to increase ethanol yield by using *Zymomonas mobilis* with sucrose as starting material. Our experimental results demonstrated that the addition of monosaccharides to a basic medium containing 6% sucrose increased ethanol yield by at least 10%. The addition of 2% fructose at the beginning of the fermentation period increased ethanol yield from 87.4% to 100%, whereas the addition of 2% glucose produced a yield of 97.5%. When 1% of both monosaccharides was added the final yield was 99.8%.

INTRODUCCIÓN

Zymomonas mobilis es una bacteria con capacidad para fermentar azúcares con un alto rendimiento alcohólico. Es gramnegativa y de gran motilidad, la cual pierde luego de 3 a 4 días en cultivo. No forma esporas ni cápsulas.

¹Manuscrito sometido a la Junta Editora el 9 de marzo de 1989. Este estudio se hizo conforme al proyecto 279, "Factors affecting fermentation efficiency of molasses and their effects on quality of rums." Esta contribución está parcialmente basada en la tesis sometida por el autor al Departamento de Bioquímica del Recinto de Ciencias Médicas para completar su grado de Maestro en Ciencias.

²Investigador Ayudante, Planta Piloto de Ron.

³Profesor, Departamento de Bioquímica, Recinto de Ciencias Médicas, U. P. R., Río Piedras, Puerto Rico 00928.

A *Z. mobilis* la han estudiado para producir etanol varios autores, quienes han señalado algunas ventajas sobre otros microorganismos fermentadores (e.g. *Saccaromyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum*) utilizados tradicionalmente en la fermentación alcohólica (1,13,14). Estas ventajas incluyen: a) mayor rendimiento en la producción de etanol; b) mayor tolerancia a altas concentraciones de azúcares y etanol; c) capacidad para convertir glucosa en etanol vía Entner-Doudorof bajo condiciones anaeróbicas; ch) manipulación genética más simple que la de las levaduras y d) menor consumo de energía para su metabolismo, lo que deja mayor cantidad de sustrato para sintetizar etanol (5,7,9).

Z. mobilis se usa para producir bebidas alcohólicas populares en América Central, Asia y Africa a partir de extractos acuosos de plantas ricas en hidratos de carbono como el *Agave* (maguey) y la palma Cactus (14). En Alemania se ha usado para producir etanol industrialmente a partir de azúcar de remolacha (6). En la Planta Piloto de Ron esta bacteria se ha usado para fermentar miel de caña de azúcar (11). *Z. mobilis* es capaz de fermentar glucosa, fructosa y sacarosa. No fermenta lactosa, rafinosa, maltosa, sorbitol ni manosa.

La fermentación de la sacarosa, el azúcar que más se usa en la zona del Caribe para los procesos fermentativos, resulta en rendimientos alcohólicos bajos, los cuales disminuyen cuanto mayor es la concentración de sacarosa en el medio al comenzar la fermentación. La disminución de la concentración de sacarosa parece deberse a que durante la fermentación, además de etanol, se sintetizan productos secundarios a partir de la glucosa y de la fructosa que se liberan luego de la hidrólisis de sacarosa (13).

Por un tiempo se pensó que el único producto secundario que se formaba era leván, un polímero de fructosa de un peso molecular medio de 10^7 D (10). Ahora se sabe que además de leván se sintetizan sorbitol (D-glucitol) y oligómeros de fructosa y glucosa (2). Las cantidades que se sintetizan de leván, sorbitol y oligómeros pueden llegar a 2, 11 y 7%, (13). La cantidad que se sintetiza de estos productos la determinan las condiciones bajo las cuales se lleve a cabo la fermentación y la cepa de *Z. mobilis* que se use en el proceso (16). Se sabe que el sorbitol se sintetiza a partir de fructosa sólo cuando en el medio de fermentación hay fructosa y glucosa (13). Al fermentar fructosa individualmente no se sintetiza sorbitol. Además se sabe que la glucosa inhibe la fructoquinasa, enzima encargada de fosforilar la fructosa; de esta forma bloquea el metabolismo de la fructosa vía fructosa-1-fosfato (14). La glucosa también influye en el metabolismo de la sacarosa y en la síntesis de leván. Esto ocurre debido a que la glucosa inhibe la levansacarasa, que es la enzima encargada de la hidrólisis de sacarosa y la síntesis de leván (16). El efecto inhibitorio sobre estas dos enzimas ocurre, sin embargo, a concentraciones altas de glucosa.

Las condiciones o factores que rigen la formación de productos secundarios en los cultivos de *Z. mobilis* no se saben totalmente. No hay, por ejemplo, estudios sistemáticos sobre la influencia que ejercen las concentraciones de los diferentes azúcares en la formación de estos productos. Si se supieran mejor los procesos por los cuales *Z. mobilis* produce etanol y productos secundarios se podría influir para convertir esta bacteria en un organismo más apropiado para producir etanol masivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usó la cepa B-5 de la bacteria *Zymomonas mobilis* de la colección del laboratorio de bacteriología de la Planta Piloto de Ron. Esta bacteria se adquirió de la "American Type Culture Collection" (ATCC-31821). La bacteria se cultivó en medio básico que contenía (g./100 ml.): KH_2PO_4 , 5.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4. Las concentraciones de los azúcares usados aparecen en los calces de la tablas 1 y 2. Todos los cultivos se hicieron a 30° C. sin agitación, en matraces Erlenmayer de 500 ml. con 300 ml. de medio básico suplementado con los azúcares en estudio. El inóculo consistió de 30 ml. de un cultivo de la bacteria de 16 a 18 horas en un medio básico suplementado con 2% de glucosa e incubado a 30° C. En estas condiciones el inóculo contiene 10^9 bacterias/ml., aproximadamente.

La preparación de los grupos experimentales se hicieron agregándole a un medio básico (que contenía 6 g./100 ml. de sacarosa) 2 g./100 ml. de sacarosa, glucosa o fructosa, o una combinación de las últimas según el siguiente esquema:

TABLE 1.—*Fermentación de la sacarosa por Zymomonas mobilis. Producción de etanol, sorbitol y leván. Influencia de la fructosa y la glucosa*

| Adiciones | Concentración (g./100ml.) | | | Rendimiento % |
|-------------|---------------------------|-------------|-------------|---------------|
| | Etanol | Sorbitol | Leván | |
| Sacarosa 8% | 3.42 + 0.01 | 0.09 ± 0.01 | 0.66 ± 0.01 | 87.4 |
| Sacarosa 6% | | | | |
| Glucosa 2% | 3.85 ± 0.03 ¹ | 0.20 ± 0.02 | 0.49 ± 0.02 | 97.5 |
| Sacarosa 6% | | | | |
| Fructosa 2% | 3.94 ± 0.06 ¹ | 0.19 ± 0.02 | 0.54 ± 0.01 | 100.0 |
| Sacarosa 6% | | | | |
| Glucosa 1% | | | | |
| Fructosa 1% | 3.93 ± 0.01 ¹ | 0.14 ± 0 | 0.57 ± 0.01 | 99.8 |

¹ Estos valores difieren significativamente del control con sacarosa sola (p < 0.01).

TABLE 2.—Eficiencia de la conversión de sacarosa a etanol en presencia de hexosa por *Z. mobilis*

| | mmoles de hidrato de carbono ¹ | mmoles de etanol | Producción máxima ² | Eficiencia |
|----------------------------------|---|------------------|--------------------------------|------------|
| 1. Sacarosa | 46.8 | 74.4 | 93.6 | 1.59 |
| 2. Sacarosa + Glucosa | 46.1 | 83.7 | 92.2 | 1.82 |
| 3. Sacarosa + Fructosa | 46.1 | 85.7 | 92.2 | 1.86 |
| 4. Sacarosa + Glucosa + Fructosa | 46.1 | 85.4 | 92.2 | 1.85 |

¹Expresado como hexosa.²Producción máxima teórica de etanol.

Cultivo # Azúcares al comienzo de la fermentación

| | |
|---|--|
| 1 | Sacarosa 6% + sacarosa 2% |
| 2 | Sacarosa 6% + glucosa 2% |
| 3 | Sacarosa 6% + fructosa 2% |
| 4 | Sacarosa 6% + glucosa 1% + fructosa 1% |

A las 100 horas de fermentación se tomaron muestras para determinar las concentraciones de azúcares, etanol y sorbitol mediante HPLC (8). Con el mismo método se estimó leván.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra la producción y el rendimiento etanólico, la producción de sorbitol y leván en cultivos de *Z. mobilis* incubados por 100 horas con 8% adicional de azúcares. Los azúcares añadidos se usaron totalmente, puesto que no se detectaron al cabo de las 100 horas de cultivo.

La producción máxima esperada de etanol en estas condiciones debe alcanzar la cifra de 4.32 g./100 ml. En cambio, la fermentación de sacarosa sólo produjo 3.42 g./100 ml, un rendimiento etanólico de 87.4%. Esta merma en producción y rendimiento se explican porque parte de la fructosa se convirtió en sorbitol y leván. El añadir un 2% de glucosa o fructosa, o una mezcla de ambas, elevó los rendimientos a 97.5, 100 y 99.8%, respectivamente. La conversión a sorbitol aumentó ligeramente al añadir hexosas separadamente o en una mezcla; la producción de leván fue más baja en estas condiciones.

La eficiencia de la fermentación de sacarosa en las condiciones descritas se aprecia mejor cuando los resultados se expresan en milimoles de etanol producidos. Los resultados aparecen en la table 2, en la que se observa que la adición de glucosa o fructosa, o una mezcla de ambas,

aumenta sustancialmente la eficiencia de la fermentación de sacarosa, alcanzándose un valor aproximado de 1.85 (valor máximo = 2).

DISCUSIÓN

La sacarosa representa el sustrato fermentable más abundante en la zona del Caribe y en particular en Puerto Rico. De los tres azúcares que *Z. mobilis* fermenta, la sacarosa es la que más lentamente se usa. Muchas cepas de esta bacteria no pueden fermentar la sacarosa y las que lo hacen, al parecer, son de condición dudosa (3,4).

Debido a estas consideraciones se escogió un lapso de 100 horas para estudiar la fermentación de sacarosa. A este tiempo, el medio de cultivo básico con 8% de sacarosa añadido produce 3.42 g./100 ml. de etanol y un rendimiento de 87.4%. Añadir glucosa o fructosa, o una mezcla de ambas, aumentó la eficiencia en la producción y el rendimiento etanólico. La presencia de hexosas aumentó ligeramente la producción de sorbitol, pero disminuyó concomitantemente la síntesis de leván de tal modo que la cantidad de productos secundarios sintetizados permanecieron casi constantes. Alrededor del 8% de la sacarosa se convierte en leván. En presencia de las hexosas este porcentaje disminuyó a 6%. Esta cifra es bastante alta si se toma en consideración la optimización de la fermentación de sacarosa. Según Park y colaboradores mantener los cultivos a un pH de 7 y elevar la temperatura de 25° C. durante la fermentación disminuye considerablemente la producción de leván (12). Sin embargo, bajo estas mismas condiciones disminuye el rendimiento etanólico. La levansacarasa produce leván según la siguiente reacción:



La misma enzima cataliza la siguiente reacción:



Por lo tanto, la levansacarasa actúa también como invertasa. Aunque esta enzima no ha sido bien caracterizada en *Z. mobilis*, se sabe que es diferente a la de otros microorganismos que producen leván, como *Acetobacter levonicum* y *Bacillus subtilis*.

El estudio de esta enzima podría proporcionar información crucial para solucionar el problema de la producción de leván durante la fermentación de sacarosa. Un hallazgo podría ser conseguir un inhibidor específico para esta enzima. Otra alternativa que parece más directa sería estudiar la influencia de las concentraciones de hexosas al comenzar la fermentación. Se podría también aislar una cepa de *Z. mobilis* que carezca de la actividad sintética de leván en la enzima levansacarasa. Para esto se podrían usar agentes mutagénicos y seleccionar cepas con características especiales como otra alternativa de investigación. De esta

manera se podría optimar la fermentación de sacarosa y aumentar el número de sustratos fermentables por la *Z. mobilis*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barati, J. and J. D. Buluck, 1986. *Zymomonas mobilis*: a bacterium for ethanol production. *Biotechnol. Adv.* 4: 95-115.
2. Barrow, K. D., J. G. Collins, D. A. Leigh, P. L. Rogers and R. G. Warr, 1984. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 225-32.
3. Belaich, J. P. and J. C. Senez, 1965. Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* 95: 1750-757.
4. Dadds, M. J., P. A. Martin and J. C. Carr, 1973. The doubtful status of species *Zymomonas anaerobia* and *Zymomonas mobilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 36: 531-39.
5. Dawes, E. A., D. W. Ribbon and P. G. Large, 1966. Route of ETOH formation in *Zymomonas mobilis*. *Biochem. J.* 98: 785-803.
6. Dietrich, Z., 1984. Competencia para la levadura del alcohol. *Noved. Cient. Alem.* 16: 4.
7. Gibbs, M. and R. D. DeMoss, 1954. Anaerobic dissimilation of C₁₄ labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. *J. Biol. Chem.* 207: 689-94.
8. Hartwitz, W., 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC, 13th ed.
9. Karsch, T., U. Sthal and K. Esser, 1983. Ethanol production by *Zymomonas* and *Saccharomyces* advantages and disadvantages. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18: 387-91.
10. Lee, K. J., M. L. Skotnicki, D. E. Tribe and P. L. Rogers, 1981. Novel process with advantages over yeast fermentation: the *Zymomonas*. *Biotechnol. Lett.* 3: 207-12.
11. Murphy, N. F., 1988. *Zymomonas mobilis* batch and fed-batch fermentation of high test molasses. *J. Agric. Univ. P. R.* 72: 485-88.
12. Park, Y. K., M. P. L. Mortati and H. H. Sato, 1983. Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. *Biotechnol. Lett.* 5: 515-18.
13. Rogers, P. L., K. J. Lee, M. L. Scotnicki and D. E. Tribe, 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng.* 23: 37-84.
14. Swings, J. and J. Deley, 1977. The biology *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* 41: 1-46.
15. Viikari, L., 1984. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 252-55.
16. — and M. Linko, 1986. Rate yield limiting factor in fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 8: 139-44.