



**"Picudo negro":
Plaga del plátano, banano y abacá**

**Proyecto de cebada en el sur
del Ecuador**

**Control de gusanos de la mazorca
de maíz**



DURAZNO

Beatriz Brito Grandes
 Ing. Quím. MS., Investigadora Departamento Nutrición y Calidad, E.E. Santa Catalina
 Pedro Lozano Rodríguez
 Doctor en Química, PhD., Profesor Titular, Facultad de Química, Universidad de Murcia-España

Fermentación Alcohólica

*de procesados industriales de
 durazno utilizando bacterias
 Zymomonas mobilis*

INTRODUCCION

En este artículo se presentan los resultados de una investigación realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Química de la Universidad de Murcia en España, con el auspicio de una beca de la UNESCO Biotechnology Action Council.

A la Biotecnología Alimentaria se la podría definir como el conocimiento y la utilización de los microorganismos para producir más y mejores alimentos, además de la manipulación genética en plantas y animales con los mismos fines.

Así, tenemos a las industrias agro-alimentarias, que son la sucesión de operaciones de separación que conducen a la purificación de una molécula, o bien, más a menudo, a la de una familia de moléculas, de las cuales a través de las industrias químicas se llega rápidamente a la biotecnología, cuando la extracción va acompañada de bioconversiones.

En este aspecto, la elaboración de bebidas alcohólicas (cerveza, vino, vino de frutas, etc.), constituye un ejemplo típico, ya que supone la extracción de un sustrato y el aislamiento de un producto obtenido por fermentación o por conversión enzimática. (3), (5)

La investigación de técnicas nuevas que permitan conservar las frutas después de las cosechas, así como la búsqueda de nuevas formas de consumo tras el procesamiento industrial, ha permitido el desarrollo de alternativas biotecnológicas para la obtención de bebidas derivadas de las frutas, pues existe una diversidad de microorganismos, con diferentes particularidades fisiológicas y metabólicas, que permiten la producción biológica de etanol. Entre ellas, hay un tipo de bacterias mesófilas, del género *Zymomonas*, que se ha empleado en países tropicales como agente fermentativo natural, para la producción de bebidas alcohólicas a partir de savia de plantas.



Una de las características especiales de este microorganismo, es que metaboliza glucosa y fructosa a etanol y CO_2 con rendimientos cuantitativos a través de una modificación de la ruta de Entner-Doudoroff, siendo el único reportado hasta 1988, que emplea esta vía anaeróbicamente. El balance neto de la ruta es la formación de un mol de Adenosín trifosfato (ATP) y dos de etanol y dióxido de carbono por mol de glucosa o fructosa metabolizada, de ahí que la formación de biomasa sea menor que en el caso de levaduras (dos moles de ATP por mol de glucosa por la vía glicolítica), debido a una limitación en la disponibilidad de energía para los procesos de biosíntesis. Este hecho es de fun-

damental importancia para la potencial aplicación industrial de *Zymomonas*, puesto que, como consecuencia del bajo rendimiento en biomasa, el rendimiento en el producto deseado, etanol, es próximo al teórico.

El objetivo del presente trabajo se centró en la realización de fermentaciones anaeróbicas en discontinuo, utilizando bacterias *Zymomonas mobilis* a condiciones naturales de anaerobiosis, temperatura y pH, en dos procesados de durazno: un concentrado clarificado y un cremogenado despectinizado, para la obtención de un licor con alto grado alcohólico.

METODOLOGIA



Se utilizó como sustratos un concentrado clarificado de durazno estéril, diluido a diferentes concentraciones, realizando los experimentos sin y con adición de glucosa, y un cremogenado de melocotón, con tamaño de partícula menor de 0.2 mm, no estéril.

La preparación enzimática empleada para despectinizar el cremogenado fue de naturaleza comercial, compuesta de una enzima péctica de origen fúngico (*A. niger*), denominada Pectinol D, usada en procesos de clarificación a nivel industrial, y una enzima especial para la descomposición del material vegetal, denominada Rohament Cw, los cuales fueron suministrados por la casa Rohm GmbH.

El microorganismo utilizado es *Zymomonas mobilis* ZM4, conservada en glicerol al 20% a -20°C , se cultivó en el siguiente medio de fermentación (g/l): glucosa, 100; extracto de levadura, 10; KH_2PO_4 , 2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; teniendo en cuenta que la esterilización de la glucosa y de las sales y extracto de levaduras debe realizarse por separado. Posteriormente, ambas disoluciones deben mezclarse en condiciones estériles, dando lugar al medio de cultivo, el cual se deja aproximadamente 15 horas a 35°C , para que crezcan las células.

Para la fermentación se utilizaron como reactores anaeróbicos discontinuos, erlenmeyers estériles de 250 y 2000 ml en

los diferentes experimentos, los cuales se adaptaron con tapones de caucho con dos orificios, a través de los cuales se introdujo tubo de vidrio acoplado a mangueras, los cuales sirvieron para la toma de las muestras, y el escape de gases producto de la fermentación.

Los experimentos se iniciaron inoculando el cultivo de *Z. mobilis* en fase exponencial de crecimiento en los reactores que contenían las muestras, los cuales se añadieron en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar, los sustratos se utilizaron sin esterilizar, para evitar pérdidas en sus cualidades organolépticas. Se utilizó un agitador con control de velocidad, oscilando de 120 a 100 rpm y la salida de los gases se recibieron en una probeta con agua, controlando así la anaerobiosis.

Durante los procesos fermentativos se analizaron los siguientes parámetros analíticos: sólidos solubles mediante un refractómetro manual, la medida de la concentración de biomasa se determinó espectrofotométricamente a 660 nm, la concentración de glucosa (azúcares reductores totales) según el método de Nelsón-Somogy medido espectrofotométricamente a 740 nm, el contenido de etanol se cuantificó mediante un kit enzimático determinado colorimétricamente a 340 nm y el pH en un potenciómetro digital.



RESULTADOS Y DISCUSION

Considerando los resultados de las diferentes experimentaciones realizadas, se obtuvo los mejores resultados con la utilización del concentrado clarificado, dejando el cremogenado despectinizado para investigaciones futuras.

En cuanto a la evolución de la concentración de sólidos solubles, pH, biomasa, glucosa y etanol desde las 0 hasta las 279 horas en que se tomó periódicamente las muestras, se pudo observar las tres fases características del crecimiento microbiano; la fase de retardo hasta las 87 horas en el tratamiento con dilución a 10° Brix y las 48 horas para los tratamientos a 10° Brix y con diferente concentración en la adición de glucosa. Luego, un crecimiento de la población bacteriana, paralelo a un aumento en la concentración de etanol en el medio. A pesar de no haberse agotado el sustrato (glucosa), se produjo la entrada de la población celular en la fase estacionaria de crecimiento.

El crecimiento celular en *Zymomonas mobilis* es inhibido más fuertemente por etanol que el catabolismo, debido a los elevados requerimientos de energía para el mantenimiento de las funciones celulares, que además aumentan al incrementarse la concentración de etanol en el medio. Este tipo de trabajos, relacionados con el mecanismo de inhibición por etanol ya reporta Jinghong Li, et al (1995), donde se indica que la concentración de etanol no tiene efecto significativo sobre la capacidad fermentativa de *Z. mobilis*, pero que esos cambios sí afectan totalmente su efecto inhibitorio. (4)

En el Cuadro 1, se presenta los rendimientos en etanol ($Y_{p/s}$) y biomasa ($Y_{x/s}$), los cuales se determinaron teniendo en cuenta en cada caso las concentraciones finales en la máxima producción de etanol y biomasa, y glucosa consumida. La productividad volumétrica (P_E) se calculó de forma global, teniendo en cuenta el etanol producido y el tiempo de fermentación en cada tratamiento.

Cuadro 1

Parámetros cinéticos de *Zymomonas mobilis* a diferentes concentraciones iniciales de glucosa en reactores discontinuos, utilizando concentrados clarificados de durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch)

Parámetro	Concentración Inicial de Glucosa (g/l)			
	144.65	279.66	299.81	364.38
q_s (g/g.h)	0.756	0.481	0.508	0.542
q_p (g/g.h)	0.322	0.244	0.294	0.327
P_E (g/l.h)	0.264	0.505	0.466	0.569
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.408	0.347	0.393	0.351
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.011	0.008	0.008	0.008
T (h)*	111-183	159-183	111-207	87-187
pH final	3.9	3.8	3.8	3.8

* Intervalos de tiempo para realizar los cálculos de q_s y q_p

Según diversos autores, en cultivos discontinuos el cálculo de las velocidades específicas de consumo de sustrato (q_s) y de producción de etanol (q_p) es difícil, debido a que la concentración de biomasa cambia exponencialmente con el tiempo, sin embargo, se puede realizar una estimación de dichos valores considerando un intervalo de tiempo en la fase exponencial de crecimiento, y haciendo una aproximación a la linealidad. Teniendo en cuenta este hecho, se puede emplear las ecuaciones de Stevnsborg y Lawford.

Se realizó una prueba de catación a nivel del Departamento donde se desarrolló el experimento, para ver la aceptabilidad de los productos obtenidos, a nivel de aroma, color y sabor. Se encontró que no había variación en el color obtenido en los tratamientos, el sabor tuvo mucha aceptabilidad y hubo diferencia de criterios con el sabor a sidra de cada producto obtenido, a pesar de la diferencia en la composición con respecto al contenido de etanol y glucosa.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Las fermentaciones alcohólicas con el uso de cremogenados deben realizarse, utilizando este sustrato pasteurizado, con las debidas pérdidas que afecten sus cualidades organolépticas. El pardeamiento en el producto final puede evitarse mediante un escaldado previo, la adición de disoluciones de ácido ascórbico, etc.; a la vez que puede ser utilizado en fermentaciones secundarias o adicionarse al final de las fermentaciones, para obtener el color y/o aroma característico de la fruta. Existe la posibilidad de adición de aromas y etanol en el refinado, para dar el acabado final de los productos obtenidos, así como, para la obtención de elaborados de mayor grado alcohólico.
2. Debe compararse los resultados de la fermentación con la bacteria *Zymomonas mobilis*, con los que se obtuvieran utilizando levaduras, para, entonces decidir cuál es la mejor alternativa biotecnológica; además de su uso en frutas tropicales, que ya tienen su significación comercial en los mercados internacionales.
3. Una aplicación práctica en nuestro país sería la obtención de cremogenados de frutas, en vista de que la obtención de este procesado está más al alcance de los productores de fruta y es una transformación inmediata, que ayuda a disminuir las pérdidas post cosecha ocasionadas en el almacenamiento. Como ejemplo, tenemos que en la Región de Murcia en España, seis cooperativas que representan a más de 1800 socios y una facturación superior a 2000 millones de pesetas, invertirán 500 millones de pesetas para construir la primer factoría industrial de los agricultores "Cremofruit" (Periódico La verdad, sección "El Campo", noviembre 20 de 1997).
4. En esta fase de experimentos, los mejores resultados de las fermentaciones con la bacteria *Zymomonas mobilis*, se obtuvieron con el uso del concentrado clarificado, con un contenido alcohólico de 7% v/v, cuando se utilizó diluido a 10° Brix, y de 13% v/v utilizando como sustrato para la fermentación diluido a 10° Brix y con adición de 125 g glucosa/l. Así, bien podrían comercializarse como vino de fruta, pues cumplen la reglamentación de la Asociación de Productores de Sidra y Vinos de Fruta de la Unión Europea.
5. Los parámetros cinéticos reportados, son comparables con los obtenidos en otras condiciones de trabajo con esta bacteria. Los valores que corresponden al rendimiento de etanol que caracteriza el comportamiento de *Z. mobilis*, son más o menos similares. El rendimiento de biomasa es ligeramente menor, lo cual es razonable, cuando se observa que el pH final de la fermentación es 3.8 en comparación con rangos de 4.5 a 5.0, obtenidos en otras condiciones de experimentación.
6. Los procesos fermentativos típicos en la elaboración de sidra duran de 2 a 12 semanas, sin control de temperatura, pH u otros parámetros, hasta que el azúcar fermentable se halla metabolizado y transformado en etanol; en base a esto los valores correspondientes a las productividades volumétricas de etanol, son menores con relación a los obtenidos bajo condiciones controladas donde se obtienen perfiles de fermentación y productos más constantes.
7. Se ha obtenido información sobre el comportamiento de la bacteria *Zymomonas mobilis*, cuando se utiliza como sustratos dos procesados industriales de durazno. Hay pocas investigaciones de este tipo reportadas en la bibliografía especializada.

Bibliografía

1. Buchholz, S.E., Dooley, M.M. and Eveleigh, D.E. *Zymomonas*-an alcoholic enigma. *Trends Biotechnol.*, 5 (1987) 199-204
2. Castellar, M.R., Borrego, F., Cánovas, M., Iborra, J.L. Optimization of the Start-up of a Passively Immobilized *Zymomonas mobilis* System for Continuous Ethanol Production. *Process Biochemistry*, 29 (1994) 569-574
3. Colagrande, O., Silva, A. and Fumi, M.D. Recent Applications of Biotechnology in Wine Production. *Biotechnol. Prog.*, 10 (1994) 2-18
4. Jinghong, Li, P. James McLellan, and Andrew, J. Daugulis. Inhibition effects of ethanol concentration history and ethanol concentration change rate on *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 17 (1995) 321-326
5. Mafart, P., Béliard, E. *Ingeniería Industrial Alimentaria. Vol II: Técnicas de Separación*. Lavoisier (1992). Editorial Acribia, S.A. Zaragoza-España