

# ESTUDIO COMPARATIVO DE LA GENERACIÓN DE CO<sub>2</sub> EN FERMENTACIONES CON CÉLULAS LIBRES E INMOVILIZADAS DE *Zymomonas mobilis*

Ing. Luis Alfonso Caicedo M.,

Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

## RESUMEN

La bacteria *Zymomonas mobilis* es estudiada actualmente como agente de la fermentación alcohólica gracias a las ventajas que presenta en relación con las levaduras, tales como, su alto factor de conversión sustrato a producto y la baja producción de células, entre otras. La inmovilización de microorganismos es una técnica que permite altas productividades y menores tiempos de fermentación.

El presente trabajo hace un estudio comparativo de la generación de CO<sub>2</sub>, como medida indirecta de la formación de etanol en la fermentación alcohólica, cuando se emplean células libres e inmovilizadas en alginato de calcio y en procesos por lotes.

Los resultados muestran que en las fermentaciones con células libres y en la primera fermentación con células inmovilizadas la fase lag puede llegar a 24 horas, pero la reutilización de las células inmovilizadas disminuye la duración de la fase lag llegando a valores de cero. Un período largo de almacenamiento, a bajas temperaturas, puede llevar a una inactivación de las células aumentando ligeramente el tiempo de adaptación.

## INTRODUCCIÓN

El sistema de células inmovilizadas es considerado como un caso particular de la catálisis heterogénea y se ha definido como: "el confinamiento físico o localizado en una región definida del espacio con retención de sus actividades catalíticas y con posibilidad de ser usadas en forma repetida y continua" (1).

Su estudio ha aumentado, en los últimos quince años, con miras a dar solución a los problemas presentados en los procesos por lotes o continuos con uso de células libres, como: baja productividad volumétrica, baja concentración de producto y alta concentración de sustrato a la salida, gran riesgo de contaminación y dificultad de separación de las células.

En los diferentes métodos de inmovilización de células como unión a superficies, entrampamiento, re-

tención en barreras y agregados celulares, según revisión realizada por VARGAS y col. (1), se debe comparar el comportamiento de los microorganismos en estado libre respecto de los inmovilizados.

La *Zymomonas mobilis* es una bacteria aislada inicialmente de vinos de palma, la cual crece en medios que contienen sacarosa, glucosa o fructosa. En la actualidad ha adquirido importancia como agente de fermentación alcohólica, gracias a las ventajas enumeradas por SWINGS & De LEY (2), entre las que sobresalen su bajo factor de producción de células ( $Y_{x/s}$ ), alta conversión de sustrato a producto, que puede llegar a 1.9 moles de etanol por mol de glucosa, y sus condiciones de operación muy semejantes a las de las levaduras que comúnmente se emplean en este proceso.

Muchos investigadores han estudiado el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre el cre-

cimiento y rendimiento de la fermentación (3), (4), encontrando que las cepas en general soportan concentraciones iniciales de azúcar entre 2 y 30% p, aunque su mayor rendimiento depende de la cepa y condiciones ambientales. La generación de CO<sub>2</sub> como indicativo de la fermentación ha sido utilizado por ALHADEFF (5) en el estudio con levaduras, ya que, según la ecuación estequiométrica existe una relación directa entre la formación de etanol y del gas carbónico. Este hecho también puede ser utilizado en el caso de la *Zymomonas mobilis*, donde a pesar de emplear la ruta metabólica de ENTNER DOUDOROFF y no la de EMBDEN-MEYERHOF, la ecuación estequiométrica general es idéntica con CO<sub>2</sub> y etanol, así como productos principales finales.

El presente trabajo estudia el comportamiento de la cepa de *Zymomonas mobilis* CP4 cuando se trabaja como célula libre en suspensión o inmovilizada en alginato de Calcio, empleando como parámetro la cantidad de CO<sub>2</sub> generado por unidad de volumen de mosto inicial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Microorganismo.** Fue empleada una cepa de *Zymomonas mobilis* CP4 del cepario de la Escuela de Química de la Universidad Federal de Rio de Janeiro. Como medio de conservación fue usado el propuesto por VIIKARI y LINKO (6): Glucosa 20 g/l, Extracto de levadura 10 g/l, peptona 10 g/l. La cepa fue repicada cada 4 semanas.

**Métodos de Análisis.** La glucosa fue determinada por el METODO DE SOMOGY (7), las células por peso seco correlacionado con absorbancia a 580 nm. El etanol final fue analizado por cromatografía gaseosa con nitrógeno como gas de arrastre y detector de ionización de llama.

**Preparación del Inóculo.** Cuatro erlenmeyers de 500 ml que contenían 200 ml de medio de adaptación (50 g/l de glucosa, 1 g/l de fosfato monobásico de potasio; 1 g/l de sulfato de amonio, 10 g/l de extracto de levadura y 0.5 g/l de sulfato de Magnesio heptahidratado) fueron inoculados con 20 ml de medio de mantenimiento y dejados en agitador a 125 movimientos/min y 20°C por 16 horas.

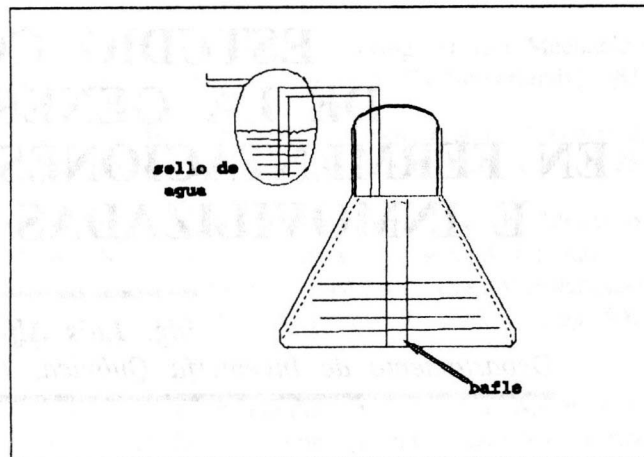


Figura 1. Esquema del fermentómetro construido para las fermentaciones.

Después de este tiempo las células fueron separadas por centrifugación a 7000 g, 10°C por 10 minutos, lavadas y resuspendidas en 50 ml de solución isotónica.

**Medio de Fermentación.** El medio empleado para los ensayos de fermentación con células libres e inmovilizadas tenía la siguiente composición: Glucosa 100 g/l; extracto de levadura 10 g/l; sulfato de amonio 1 g/l; fosfato monobásico de potasio 1 g/l y sulfato de magnesio heptahidratado 0.5 g/l.

**Preparación de las partículas de Biocatalizador.** Para la inmovilización de las células se siguió el método propuesto por ALHADEFF (5). Se prepararon 250 ml de alginato de sodio al 3%p y se mezclaron con 250 ml de suspensión de células (4.554 g/l), la mezcla resultante se dejó gotear en una solución de cloruro de calcio 0.1M. Las esferas fueron dejadas en la solución por 24 horas antes de ser usadas en la fermentación. Su diámetro promedio fue de 3.2 mm.

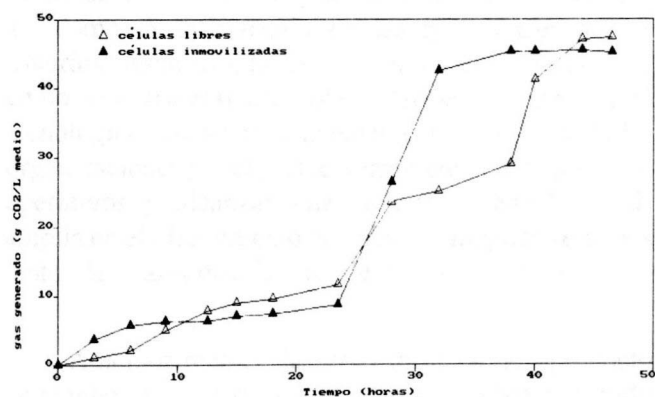
**Ensayos de Fermentación con células libres.** Después de 14 horas de haber sido preparada la suspensión de células (4.554 g/l); fueron inoculados con 9.0 ml de dicha suspensión 3 fermentómetros como los esquematizados en la figura 1, que contenían cada uno 200 ml de medio de fermentación. El proceso de fermentación se llevó a cabo en un agitador a 125 agitaciones/minuto a 30°C. Periódicamente fueron hechas pesadas para cuantificar la pérdida de CO<sub>2</sub>.

**Ensayos de Fermentación con células inmovilizadas.** Tres fermentómetros como los indicados en el punto anterior, que contenían 200 ml de medio de fermentación fueron inoculados con 14 ml de esferas de biocatalizador que contenían 4.22 g de células/l de gel. Periódicamente fueron hechas pesadas del fermentómetro hasta peso constante. Al final de la fermentación las partículas de biocatalizador fueron separadas y usadas en la inoculación de 200 ml de nuevo medio de fermentación. Esta operación fue repetida por tres veces. Luego las esferas fueron separadas, almacenadas en agua destilada en la nevera a 4°C y usadas después de 15 días de almacenamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fermentación con células libres e inmovilizadas.

La generación de CO<sub>2</sub>, contra el tiempo, tanto para la fermentación con células libres como inmovilizadas se observa en la Figura 2. Se puede notar una fase "lag" o de retraso bastante larga que puede llegar a las 24 horas; sin embargo, durante este tiempo la cantidad de gas generado por las células libres es un poco mayor respecto a las inmovilizadas, esto indica una posible influencia de la difusión dentro de la partícula que retiene parte del CO<sub>2</sub>. Una fase "lag" o de retraso tan larga puede deberse a la inactividad de las células por el tiempo que permanecieron en suspensión acuosa, antes de la inoculación. Durante la fase de rápido crecimiento, la tasa de generación

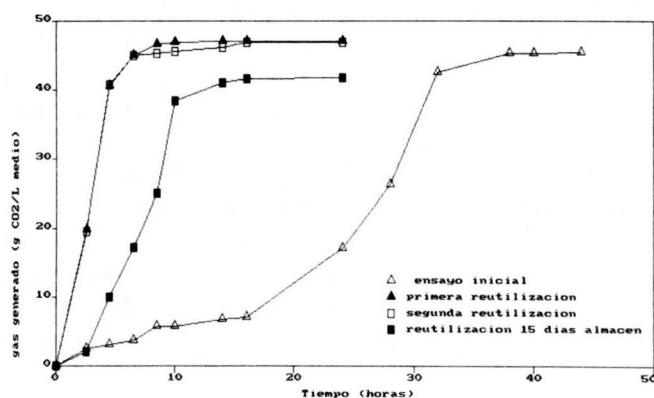


**Figura 2.** Generación de CO<sub>2</sub> durante la fermentación con células de *Zymomonas mobilis* libres e inmovilizadas en alginato de calcio.

de CO<sub>2</sub> en las células inmovilizadas es mayor y se logra una estabilización a las 40 horas, mientras que en las libres este tiempo puede llegar a 42-45 horas.

La concentración final de CO<sub>2</sub> fue de 45.38 g/l mosto para las inmovilizadas y de 47.31 g/l mosto para las libres. Esta diferencia puede deberse al fenómeno de oclusión de CO<sub>2</sub> dentro de la partícula de biocatalizador. El factor de formación de CO<sub>2</sub> por gramo de substrato consumido  $Y_{CO_2/s}$  fue de 0.458 g/g para células inmovilizadas y de 0.4635 g/g para las libres, ello confirma el efecto de oclusión de CO<sub>2</sub>.

**Efecto de la reutilización de las células inmovilizadas sobre la tasa de generación de CO<sub>2</sub>.** Al realizar la reutilización de células inmovilizadas se observa, de acuerdo con la figura 3, que el tiempo de adaptación o fase lag prácticamente desaparece y la cantidad de CO<sub>2</sub> formada es muy similar a la obtenida en el ensayo con células libres 46.9 y 47.1 g/l respectivamente. Lo anterior demuestra que la diferencia de gas desprendido en la primera fermentación se debe a la oclusión del CO<sub>2</sub>, debido a que la segunda se inicia con el gas ya ocluido. El hecho de almacenar el biocatalizador a 4°C durante 15 días produce un efecto de retraso en la generación de gas, el cual puede deberse al efecto de oclusión de CO<sub>2</sub> que se evidencia con la menor concentración final obtenida, o al efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la actividad celular.



**Figura 3.** Efecto de la reutilización de células inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* sobre la generación de CO<sub>2</sub>.

Esta última hipótesis complementa la primera ya que la oclusión se debe presentar como se indicó antes por la desorción del CO<sub>2</sub> durante el almacenamiento y, el valor observado en la concentración de CO<sub>2</sub>, por debajo del obtenido en el primer ensayo, evidencia un efecto del almacenamiento sobre la actividad de la célula.

## CONCLUSIONES

Para las condiciones de inmovilización dadas en este experimento, se puede concluir que la inmovilización no afecta el comportamiento del microorganismo, ya que los resultados obtenidos con células libres e inmovilizadas no presentan una variación significativa en lo referente a la tasa de generación de CO<sub>2</sub> y factor de producción de CO<sub>2</sub>. Largos períodos de almacenamiento afectan la célula disminuyendo su capacidad fermentativa.

La oclusión de CO<sub>2</sub> es un factor que debe tenerse en cuenta en los procesos con células inmovilizadas, ya que puede afectar el comportamiento del sistema al cambiar la densidad aparente de la partícula de biocatalizador.

## BIBLIOGRAFIA

1. VARGAS G.; TORRES J. A.; CAICEDO L.A. Principios para el diseño de Reactores Bioquímicos de Células Inmovilizadas, Universidad Nacional, 1987.
2. SWINGS J. y DE LEY J. "The Biology of *Zymomonas mobilis*", Bacteriological Reviews, 41, (1), 1977.
3. LEE K. y ROGERS P. "The fermentation Kinetics of Ethanol Production by *zymomonas mobilis*", The Chemical Engineering J., 27, B31, 1983.
4. GALANI I.; DRAINAS C. y TYPAS M. "Growth Requirements and establishment of a Chemically Defined Minimal Medium in *Zymomonas mobilis*; *Biotechnol. Letters*, 7, 673, 1985.
5. ALHADEFF E. Fermentação Alcoólica com Células de Levadura Imobilizadas em Alginato de Calcio, Tese M.s.c. U.F.R.J., Rio de Janeiro, 1984.
6. VIKARI L. y LINKO M. "Rate and Yield Limiting Factors in Continuous Fermentation of Sucrose by *Zymomonas mobilis*", *Biotechnol. Letters*, 8, 139, 1986.
7. SOMOGY I. M. "Notes in Sugar Determination", *Journal of Biological Chemistry*, 195, 19, 1952.