ASPECTES BIOQUÍMICS DE LA FERMENTACIÓ ACÈTICA

Comunicació presentada el dia 24 de maig de 1974
per

M. FERRER i GIMÉNEZ

del Departament de Microbiologia. Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona.

Introducció

Un treball fet per Clotet [1] expressava el fenomen de diàuxia que té lloc durant la transformació d'etanol en àcid acètic, i d'aquest en anhídrid carbònic i aigua per l'acció dels *Acetobacter*.

Segons es desprèn de la figura 1, el creixement és normal en presència d'etanol fins que aquest s'esgota, i llavors segueix una fase de latència i continua el creixement consumint-se l'acètic i, segons sembla deduir-se d'aquest graó diàuxic, no existeix inhibició de l'equip enzimàtic, sinó simplement repressió. Aquesta diàuxia té una característica diferent de les ja citades per Monod [2], per exemple en la utilització de glucosa i d'altres sucres per *E. coli* i *B. subtilis,* i és que els dos substrats no són independents, sinó que la diàuxia es presenta durant la via oxidativa entre el substrat inicial i un dels intermediaris que es formen.

Amb el present treball hem intentat d'anar més lluny en els diferents interrogants que plantejava aquest fenomen diàuxic. Per centrar la problemàtica, hem dividit en tres fases l'estudi; en la primera ens ocuparem de la influència de l'etanol en la fase metabòlica de transformació etanol-acètic; en la segona, de la influència de l'etanol en la fase acètic-anhídric carbònic, i en la tercera, de la influència de l'acètic en la fase acètic-anhídric carbònic.

Part experimental

Hem fet les experiències en flascons Roux a una temperatura de 26 °C. Els microorganismes emprats han estat un *Acetobacter aceti* soca B-999 U.S.D.A. Agriculture Reseach Service, i un *Acetobacter xilium* aïllat per

nosaltres en un vinagre i classificat segons S. G. CARR en *"Identification Methods for Microbiologist"*, part B. El medi de cultiu, uns 100 ml, eren solucions hidroalcohòliques, si bé en alguns casos les obteníem a partir de vi diluït; en aquest cas el vi era prèviament esterilitzat per filtració estèril amb «milipore» de 0,4 micres, i també hi afegíem extracte de llevat en una proporció del 0,1 %. L'inòcul s'aconseguia amb un medi glucosa, triptona, extracte de fetge i carbonat càlcic, després d'un creixement de 24 hores a 28 °C.

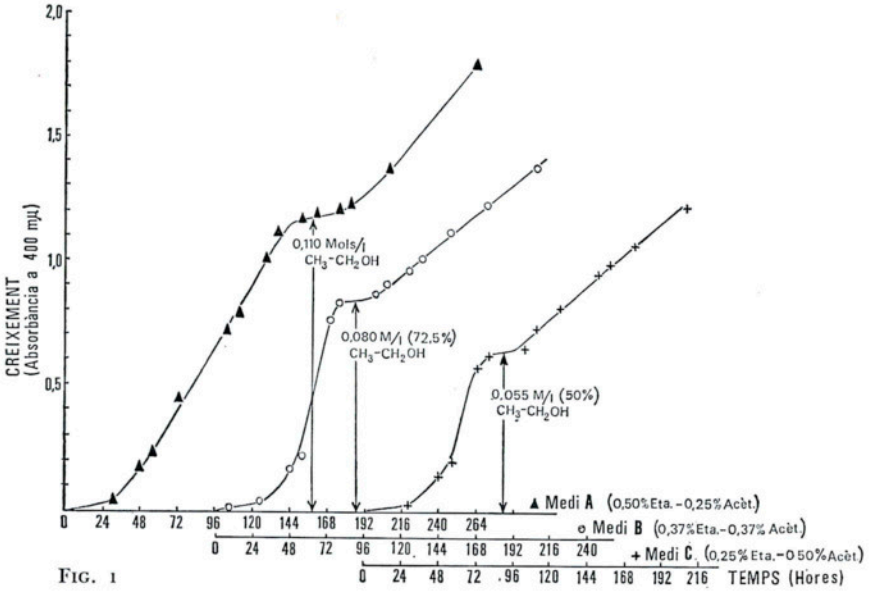

FIG. 1

A intervals trèiem mostres dels flascons i analitzàvem l'acètic mitjançant una simple valoració volumètrica amb hidròxid sòdic 0,1 N. L'etanol era analitzat per cromatografia gasosa emprant un cromatògraf F.M. amb detector de ionització de flama, amb una columna de carbowax 20 M i injectant 2 μl, de mostra prèviament neutralitzada. Comparàvem les corbes obtingudes amb les que s'obtenien de solucions hidroalcohòliques de concentració coneguda.

Les determinacions del creixement han estat fetes gravimètricament servint-nos de tot el flascó, ja que el creixement en aquestes condicions és totalment superficial, i per això no gens homogeni.

Resultats

Abans de res veiem com es comporta una soca d'*Acetobacter aceti* o *A. xilinium* en inocular-la en un medi que conté més etanol del que pot començar a metabolitzar. Segons es desprèn de la figura 2, la producció d'acètic és nulla fins que, per evaporació, la concentració d'etanol arriba a un determinat nivell en què l'Acetobàcter comença a convertir-lo en acètic. Com ja hem descrit, cada soca comença a metabolitzar l'etanol a una diferent concentració que podem determinar fàcilment amb el mè-

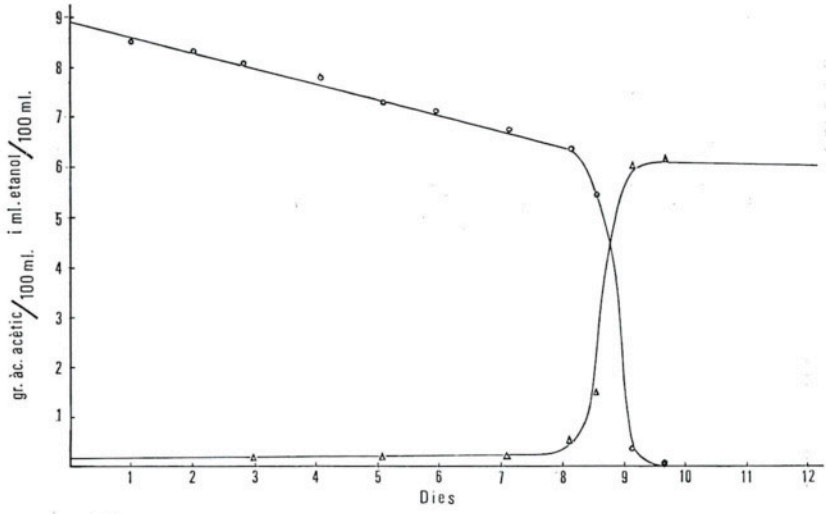

Fig. 2

tode apuntat més amunt. Podem, doncs, deduir, del comportament dels *Acetobacters,* que amb una determinada soca no es podria aconseguir una concentració final d'acètic superior a la derivada del nivell d'etanol en què comença a consumir-lo. Ara bé, podríem fer l'experiència d'una altra manera: fent créixer *Acetobacter* en una concentració d'etanol per sota de la crítica i anar afegint-hi substrat a mesura que l'anés consumint; així ha estat construïda la figura 3, on es veu que la concentració d'acètic final aconseguida és molt superior. Sembla amb això que puguem dir que la inhibició del creixement en aquesta fase és més forta per la concentració de l'etanol que no per la d'acètic.

Passem a l'altra fase de la fermentació, és a dir, la que transforma l'acètic en anhídric carbònic i aigua. Segons es desprèn de la figura 4,

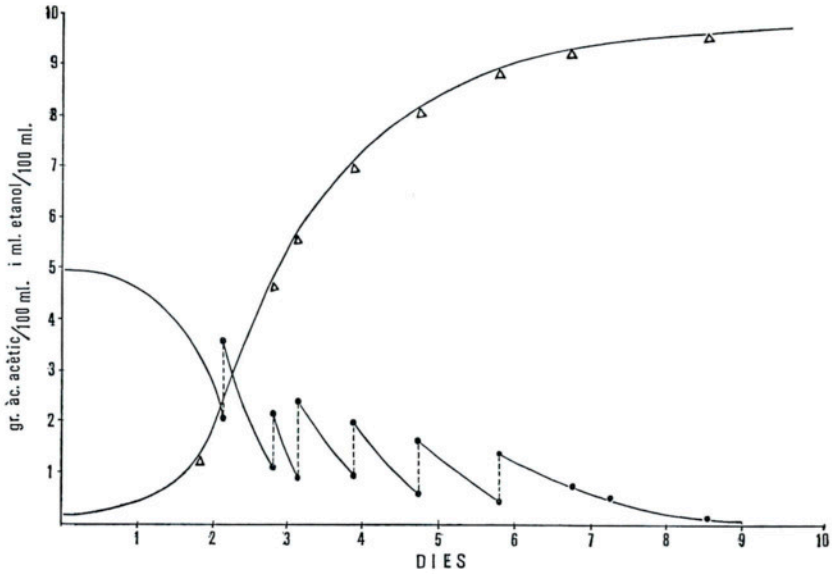

FIG. 3

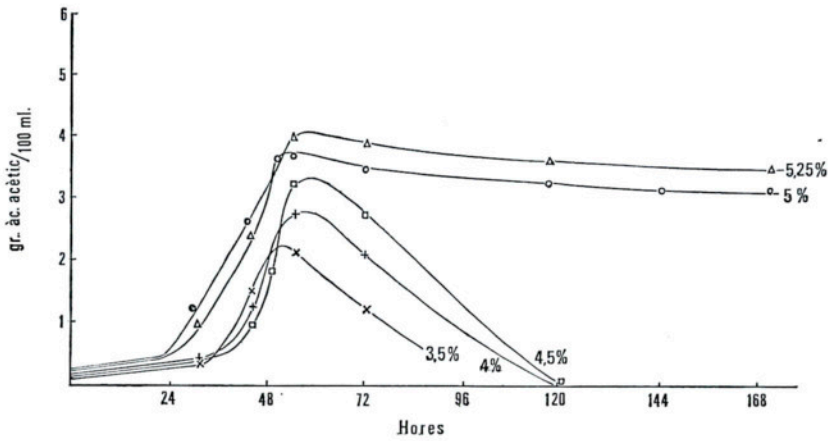

FIG. 4

en què ha començat la fermentació a diferents concentracions inicials d'etanol, la fase de metabolització de l'acètic no té lloc si no és per sota d'una concentració d'acètic molt inferior a la derivada de la màxima eta-

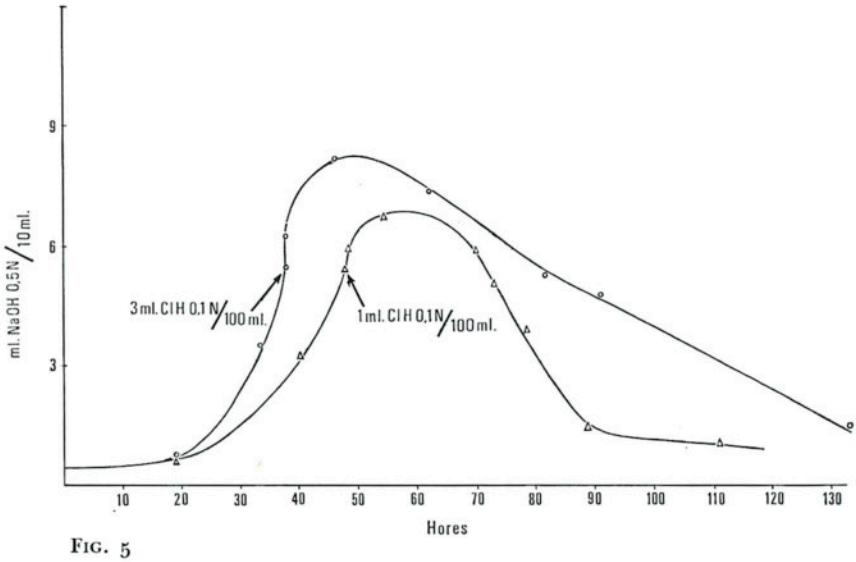

FIG. 5

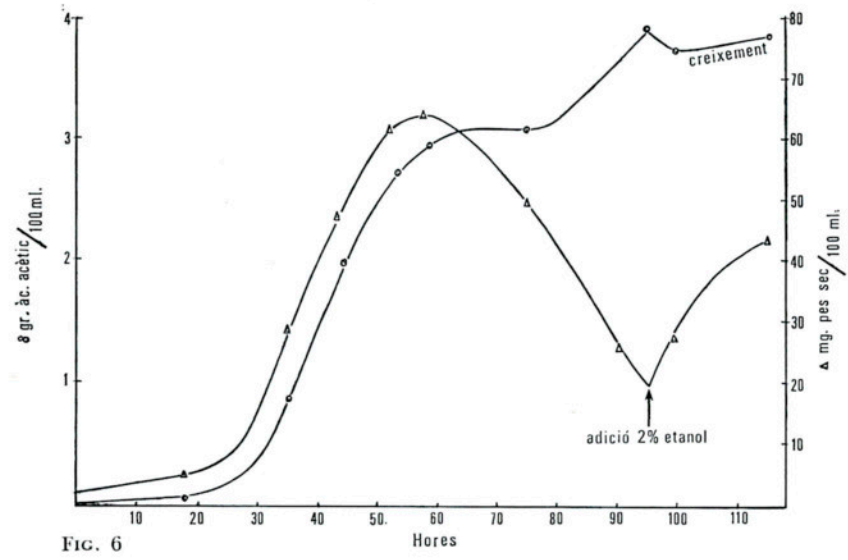

FIG. 6

nòlica que el microorganisme pot metabolitzar. Així, en el cas d'aquest *Acetobacter aceti,* per sobre del 3,5 % d'acètic es pot dir que roman inalterat. L'acció és simplement inhibidora, ja que els bacteris són encara

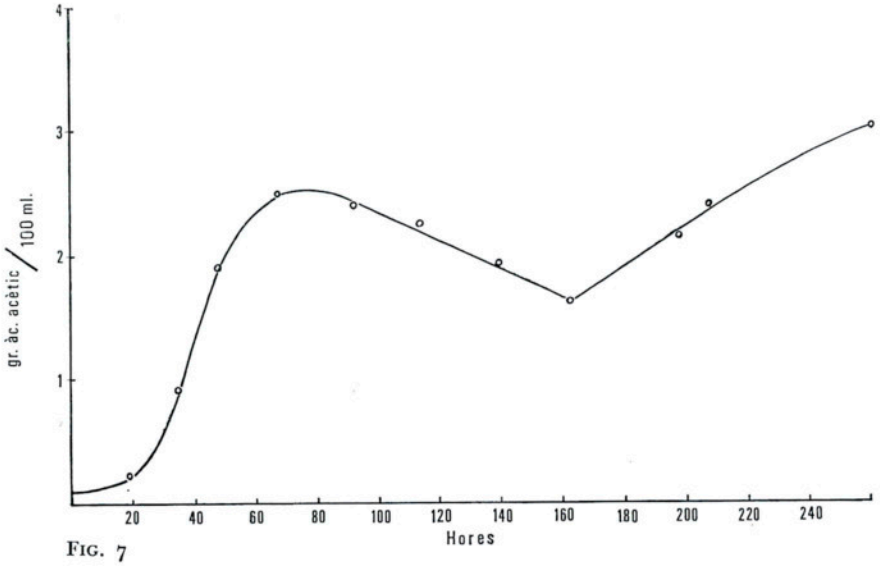

FIG. 7

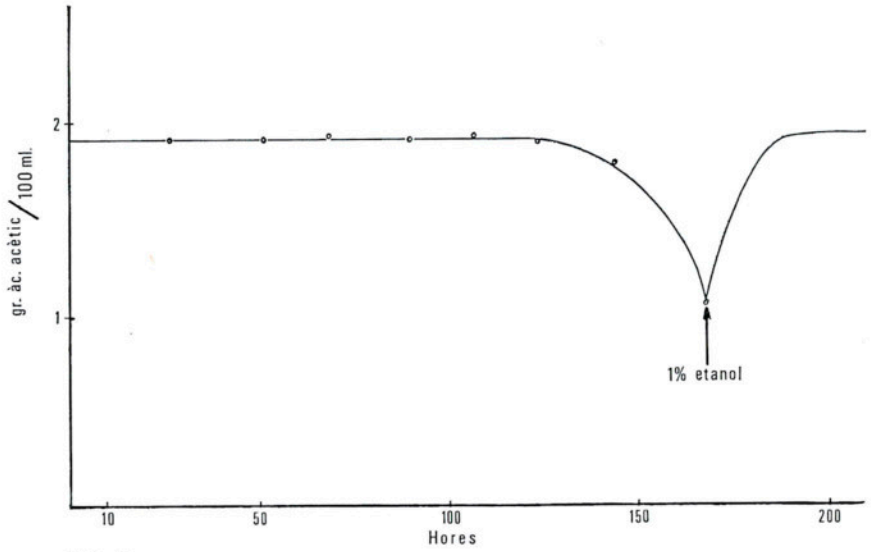

FIG. 8

viables després d'una setmana d'estar sotmesos a una concentració acètica del 6 %, i també perquè, si després d'aquesta setmana diluïm el medi fins a una concentració inferior a la crítica, comença a desaparèixer l'acètic.

Hom podria suposar que aquesta acció inhibidora, és deguda al descens del pH del medi que té lloc amb l'increment de la concentració acètica, però la figura 5 demostra clarament que això no és així. La transformació d'acètic en anhídric-carbònic i aigua té lloc, com sabem, a concentracions inferiors —en el cas de la nostra soca, al 3,5 %—; doncs bé, si en començar aquesta metabolització hi afegim quantitats d'àcid clorhídric diluït, de manera que iguali o, millor, superi els valors de pH que aconseguiríem amb concentracions d'acètic inhibidores, veiem que no té lloc la inhibició, ans es metabolitza normalment l'acètic format.

Estudiem ara el cas d'addició d'etanol a la fase acètic-anhídrid carbònic. Segons la figura 6, immediatament després d'aquesta addició comença el consum d'etanol i deixa de banda el d'acètic. El creixement, en aquest punt, és un xic alentit, segurament a causa de la lisi provocada en algunes cèl·lules per l'addició directa d'etanol i per tractar-se, al moment de l'addició, d'un cultiu ja vell. El fet del consum immediat i preferent d'etanol, el podem veure també a la figura 7, però, en aquest cas, per *Acetobacter xilinum*. La figura 8, l'hem obtinguda en afegir etanol en un medi que conté acètic i en el moment en què aquest era metabolitzat per una soca d'*Acetobacter aceti* provinent de l'inòcul que solament conté glucosa com a principi carbonat, és a dir, que la soca no havia estat mai abans en contacte amb etanol; doncs bé, idènticament als dos casos anteriors, el consum d'etanol ha estat immediat i preferent.

Conclusions

Les experiències realitzades ens han portat a unes consideracions que exposem a continuació.

El fet que les soques del gèner *Acetobacter* siguin més resistents a la concentració acètica que a l'etanòlica, ens permet la possibilitat d'obtenció de concentracions d'acètic molt superiors a les que són obtingudes a partir de les concentracions màximes d'etanol permeses per les soques, simplement anant afegint, a solucions hidroalcohòliques de concentració baixa, petites quantitats d'etanol.

Segons Nakayama [4], l'oxidació de l'etanol a acètic que, com hom sap, va pel pas intermedi de l'acetaldehid, seria catalitzada, en aquest primer pas, per un enzim aïllat per ell i que és un alcohol-citocrom 553 reductasa; i el pas d'acetaldehid a àcid acètic, mitjançant dues vies diferents: l'una governada per un altre citrocrom i l'altra per un enzim NADP dependent. Segons la figura 9, precisament aquest coenzim seria reduït, a causa del pas d'acetaldehid a acètic, la qual cosa trencaria l'equilibri en què es troba amb el coenzim reduït $NADH_2$, cosa que influeix en les

dehidrogenases lligades als coenzims del cicle de l'àcid cítric (TCA), via per la qual s'ha demostrat que l'acètic es metabolitza a anhídric carbònic. Aquest fet és el que explica que, mentre hi hagi etanol serà consumit per l'*Acetobacter* preferentment sobre l'acètic.

Àdhuc, hom pot assegurar que el sistema enzimàtic d'oxidació de l'etanol a acètic és constitutiu, ja que, com hem vist, *Acetobacter* es posa a metabolitzar-lo immediatament de manera preferent, encara que no l'hagi tingut mai abans com a substrat. D'altra banda, el sistema enzi-

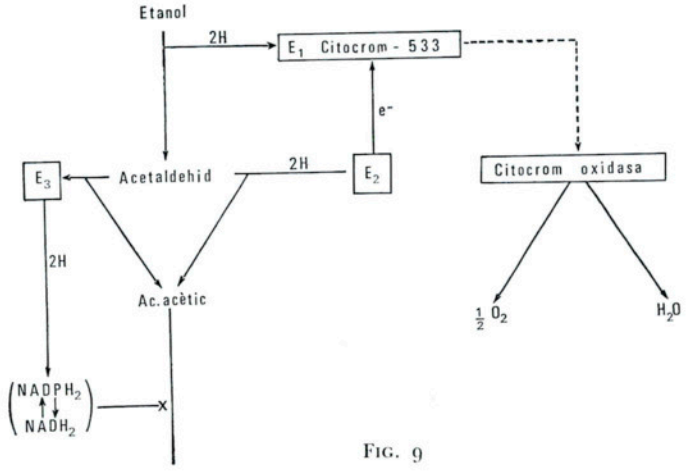

FIG. 9

màtic d'oxidació de l'acètic és adaptatiu, ja que sempre el metabolitza passant per una fase de latència.

La inhibició que per a una concentració superior al 3,5 % d'acètic es manifesta en l'*Acetobacter aceti* en la fase de metabolització d'aquest substrat no és deguda a l'acidesa, com hem demostrat, si bé aquesta inhibició és possiblement deguda al fet que l'àcid acètic és dels àcids amb una constant d'ionització més petita i sembla haver-hi una relació entre la inhibició pel creixement dels bacteris que provoquen els àcids a un determinat pH i el seu grau d'ionització, com han descrit NUNHEIMEN i FABIAN [4] i SCHWERIN [5].

El que sembla evident és que aquesta diferència entre la tolerància a concentracions altes d'acètic en la primera fase etanol-acètic i la no metabolització si no és a concentracions molt baixes en la fase acètic-anhídric carbònic, l'hem de buscar en el cicle de l'àcid cítric que es posa en moviment passada la primera fase; és per això que les nostres futures recerques seran dirigides cap a aquest objectiu.

BIBLIOGRAFIA

1. CLOTET, R. — *Etanol com a repressor de l'oxidació de l'àcid acètic*. «Colloquis Soc. Catal. Biol.», *9:* 83-85 (1976).
2. HUGO, W. B. (editor). — *Inhibition and destruction of the Microbial Cell*. Academic Press. New York (1972).
3. MONOD, J. — *Recherches sur croissance des cultures bacteriennes*. Tesi doctoral. «Ed. Hermann». Paris (1972).
4. NAKAYAMA, T. — *Acetic acid bacteria for Toshinobu Assay*. University of Tokio. París (1968).
5. NUNHEIMEN, J. i FABIAN, G. — «Am. J. Publ. Hlth.», *31*, 1505-8 (1940). Citat a 2.
6. SCHWERIN, S. — «Archiv. Lebensmittelhyg.», *13*, 156-61 (1962). Citat a 2.