



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO SOBRE LA UTILIZACION DEL COGOLLO
DE LA CAÑA DE AZUCAR.



T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P r e s e n t a :
HILDA LETICIA URIBE MASCORRO

México, D. F.

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CLAS tesis 1979
ABR M.T. 2
FECHA 345
* RES _____
* _____



ESTUDIO SOBRE LA UTILIZACION DEL BOLSILLO
DE LA CAÑA DE AZÚCAR



2 1 2 3 T
QUIMICA FARMACÉUTICA
BIBLIOTECA

Presidente, Profr. HECTOR M. LOPEZ HERRERA

Vocal, Prof. RUBEN BERRA GARCIA-COSS

Secretario, Prof. EDUARDO BARZANA GARCIA

1er. Suplente, Prof. WENCWSLAO FUENTES SOLIS

2do. Suplente, Prof. SALVADOR BADUI DERGAL

Sitio donde se desarrolló el tema: División de Estudios
Superiores, Departamento de Alimentos. Facultad de Química.

Sustentante: HILDA LETICIA URIBE MASCORRO.

Asesor del tema: EDUARDO BARZANA GARCIA.

Mi más sincero agradecimiento por haberme ayudado
a lograr lo deseado a:

Mis padres y hermanos.

El personal del Departamento de Alimentos de la --
División de Estudios Superiores, muy especialmente
a Lalo.

El jurado.

Con dedicatoria a :

Mi familia

A Javier

A Lina y todos mis amigos

Y a todos aquellos que les pueda ser útil el estudio
realizado en el presente trabajo.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	
2.1. Producción de caña de azúcar.	4
2.1.1. Antecedentes de la utilización del bagazo de caña.	12
2.1.2. El cogollo de la caña de azúcar.	13
2.1.3. Antecedentes sobre la utilización del cogollo.	17
2.1.4. Panorama de la utilización industrial del cogollo y del folle de la caña de azúcar.	20
2.2. Producción de ácido láctico por fermentación.	
2.2.1. Antecedentes	28
2.2.2. Mecanismo de fermentaciones lácticas.	29
a) Bacterias homofermentativas.	29
b) Bacterias heterofermentativas.	30
2.2.3. Condiciones de fermentación homoláctica.	
a) Organismos empleados	33
b) Temperatura de fermentación	34
c) Concentración de azúcar	34

d) Relación de oxígeno	34
e) pH	34
f) Factores de crecimiento	34
g) Duración de la fermentación	34
2.2.4. Producción industrial de ácido láctico.	
a) Rendimiento	35
b) Calidades comerciales	35
c) Usos del ácido láctico	35
2.2.4.1. Acido láctico de melazas de caña	36
2.3. Fermentación ruminal.	
2.3.1. Anatomía y fisionomía del rumen	37
2.3.2. Metabolismo de los carbohidratos en la fermentación ruminal.	38
a) Producción de ácido acético en el rumen.	39
b) Producción de ácido propiónico en el rumen.	40
c) Producción de AGV superiores en el rumen.	40
2.3.3 Importancia del ácido propiónico.	41
2.3.4. Acido láctico como precursor del ácido propiónico.	44
2.3.5. Transtornos relacionados con la producción de ácido láctico en el rumen.	45

3. MATERIALES Y METODOS	50
4. SECUENCIA DE EXPERIMENTOS	53
5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES	64
6. BIBLIOGRAFIA	94

1. INTRODUCCION

El problema actual que resulta de la escasez de alimentos, y en forma muy particular de cereales, obliga al hombre a utilizar en forma más adecuada los productos naturales. Para lograr este objetivo, juegan un papel muy importante los productos agropecuarios y sus desperdicios así como el conocimiento de las interrelaciones que estas presentan.

Una de las especies que participan de manera importante en este proceso son los rumiantes, debido a que presentan características no competitivas con el ser humano por los recursos i.e. aprovechamiento de la celulosa y el nitrógeno no protéico.

Los residuos agrícolas ponen a nuestra disposición una gran cantidad de material, del cual puede obtenerse un considerable número de diferentes productos. Entre los materiales disponibles predominan los carbohidratos, que pueden ser utilizado como materia prima industrial.

Los residuos agrícolas más importantes son los provenientes de las plantas gramíneas, cultivados preferencialmente por el hombre. Los más aprovechables son los que se obtienen de las cosechas anuales de la caña de azúcar, maíz, trigo y arroz, siendo la caña la de mayor producción por unidad de superficie de área sembrada.

Esto es notable, no solamente en la cantidad total de materia seca producida por cosecha, sino también en la producción entre la materia utilizable directamente en la alimentación y la que se considera indirectamente útil para satisfacer las necesidades humanas.

Al cortar la caña para la fabricación de azúcar se despunta el tallo. Esta operación se realiza simultáneamente con la limpieza de dicho tallo, despojándolo de las hojas que aún quedan adheridas. Si la punta de la caña o cogollo no fuera eliminada, la fabricación de azúcar sería más difícil y el rendimiento de sacarosa se reduciría considerablemente.

La cantidad de cogollo y hojas de retoños tiernos - producidos anualmente representan una cantidad sustancialmente igual, en término de materia seca, a la de los tallos cosechados y dirigidos al ingenio. La recuperación de esta materia, hoy casi desperdiciada en su totalidad, para utilizarla en la fabricación de productos de interés podría tener un efecto benéfico en la economía de zonas productoras de caña. El cogollo por su composición es un producto con verdadero valor potencial, quedando hoy con muy poco provecho abandonado en el campo.

Todos los residuos de la industria agrícola son valiosos si: 1) Se conoce la manera de aprovecharlos; 2) existe un mercado establecido para los productos manufacturados y 3) su ocurrencia se da en ciertos lugares y en forma cuantiosa. Tal es el caso del bagazo y la melaza - en la industria azucarera.

El objetivo del presente trabajo es determinar las condiciones de fermentación del cogollo de la caña de azúcar mediante una tecnología simple. Para ello se considera que de dicha fermentación se obtendrá un forraje para ganado bovino que contenga ácido láctico, y tomando en cuenta que esta prefermentación de cogollo realizada en zonas donde se cultiva la caña de azúcar puede ayudar en la economía de la región.

El ácido láctico es importante por ser el precursor del ácido propiónico en la fermentación ruminal. Dicho ácido es el responsable de la eficiencia en la conversión energética, constituyendo junto con otros ácidos grasos volátiles el 80% de la energía de los rumiantes.

2. GENERALIDADES

2.1 Producción de caña de azúcar.

La caña de azúcar pertenece a la especie Saccharum officinarum, de la familia de las gramíneas, planta cuyo origen no está perfectamente determinado, ubicándose -- posiblemente en China o India.

Existe un gran número de variedades de caña, distinguiéndose por su color (blancas, moradas, veteadas, etc.) esto representa unicamente una distinción de los caracteres exteriores, dentro de las cuales se encuentran numerosas variedades obtenidas ya sea por selección, polinización cruzada o por aclimatación cuidadosa, habiendo conseguido variedades mejoradas.

La siembra se hace comunmente por estacas o trozos de caña, que se colocan a poca profundidad en el suelo -- favoreciendo el desarrollo de las yemas que existen en -- las axilas de las hojas. Se colocan las estacas de diversas maneras: paralelas, inclinadas, etc. dándose a la -- siembra los nombres de: trenzado, cordoncillo y petatillo.

Su cultivo puede ser de temporal o de riego, dependiendo de la región. pues hay regiones que requieren un solo riego por mes, habiendo otros en que los riegos no son necesarios debido a la frecuencia de las lluvias.

La producción de caña varía según el clima, siendo las regiones tropicales y subtropicales las más apropia-

das para su crecimiento.

Una vez llegada a su completo desarrollo, antes de la floración, es cuando la caña posee el mayor porcentaje de azúcar y se procede a cortarla, deshojándola y despuntándola para llevarla después a los molinos en que ha de molerse.

En la actualidad la caña y la industria azucarera se encuentran establecidas en 19 estados del territorio nacional, cuyas áreas de cultivo se han dividido en XIV regiones principales, de acuerdo a las condiciones geográficas, agrícolas y climatológicas.

La Región I. Sinaloa. Se divide en dos grandes zonas cañeras correspondientes a las áreas del norte y centro del estado. Los recursos naturales existentes en la entidad, en el aspecto clima-suelo-agua, son extraordinarios y su aprovechamiento se ha convertido en una de las mejores zonas agrícolas de México. Su producción azucarera incluye los resultados de la operación agrícola industrial de los ingenios Los Mochis, La Primavera, El Dorado y Rosales.

La Región II. Nayarit. Tiene dos zonas cañeras, la primera agrupa áreas agrícolas cercanas a la capital del estado y la segunda se encuentra situada en la zona costera de Nayarit. Su producción actual incluye los resultados de la operación agrícola industrial de los ingenios Puga y El Molino.

La Región III. Jalisco. Se encuentra ubicada al oeste de Guadalajara. Presenta condiciones climatológicas marginales que frecuentemente causan deterioro en el cultivo por heladas. Su producción incluye el resultado agrícola-industrial de los ingenios San Francisco Ameca, --- Bella Vista y Estipac.

La Región IV. Colima. Comprende la parte noroeste del estado y suroeste de Jalisco e incluye valles y planos con tierras agrícolas establecidas dentro de las --- estribaciones de la Sierra Madre Occidental. La zona costera del Valle de la Resolana presenta magníficas condiciones para la planta. Su producción incluye los resultados agrícola-industriales de los ingenios Quesería, José María Morelos, Santiago, Purísima, Guadalupe, San José - del Tule y Tamazula.

La Región V. Michoacán. Ocupa la parte suroeste del estado y extiende sus límites desde Jalisco hacia el este del Estado de México. La producción azucarera incluye --- los resultados de los ingenios Santa Clara, San Sebastián, Pedernales, Puruarán y Lázaro Cárdenas, antes Taretan.

La Región VI. Balsas. Comprende áreas ubicadas al - oeste del estado de Guerrero, la mayor parte de Morelos, y la porción occidental del estado de Puebla, que presentan condiciones naturales muy favorables para la producción de caña y azúcar. La producción azucarera de esta - región incluye los resultados de la operación agronómico-industrial de los ingenios de San Martín, Emiliano Zapa-

ta, Oacalco, Casasano y Atencingo.

La Región VII. Tehuacán. Situada al suroeste de la población del mismo nombre, ocupa superficies que se extienden entre los límites de los estados de Puebla y Oaxaca. Debido a condiciones especiales de clima e insuficiencia de humedad el área bajo cultivo es relativamente pequeña. La producción azucarera de esta región incluye el resultado de la operación agrícola-industrial del ingenio Calipan.

La Región VIII. Papaloapan-Istmo. Su producción azucarera incluye los resultados agrícolas industriales de los ingenios Adolfo López Mateos, El Refugio, San Gabriel, San Cristobal, La Margarita, Snto Domingo, San Pedro. San Fransisco, El Naranja y Cuautotolapan.

La Región IX. Soconusco. Es relativamente nueva y se encuentra establecida al sureste del estado de Chiapas. Su producción azucarera está constituida únicamente por el resultado de la operación agronómico-industrial del ingenio Pujiltic.

La Región X. Campeche-Yucatán. Incluye superficies ubicadas al noroeste y suroeste de los estados de Campeche y Yucatán sobre la zona costera del Golfo de México. La naturaleza y propiedades físicas de los suelos, así como su topografía y pedregosidad, son limitantes en su productividad, aun cuando los elementos del clima son adecuados para la caña. Su producción azucarera se circunscribe al resultado del ingenio La Joya.

La Región XI. Tabasco. Establecida al oeste de --- Villahermosa. Su producción azucarera incluye los resultados de los ingenios de Santa Rosalía, Dos Patrias, --- Nueva Zelandia, El Progreso y Hermenegildo Galeana.

La Región XII. Veracruz-centro. Cubre las áreas cercanas a la ciudad de Córdoba. Su desarrollo se encuentra limitado por la superficie, aun cuando las condiciones climáticas existentes son favorables al cultivo. Su producción azucarera incluye los resultados de los ingenios Constanca, Motzorongo, Central Progreso, El Carmen, La Concepción, Mahuixtlán, El Potrero, San José de Abajo, - San Miguelito, San Nicolás y Providencia.

La Región XIII. Costera de Veracruz. Comprende superficies cultivadas sobre la zona costera de esta entidad. Su producción azucarera incluye los resultados de los ingenios El Higo, La Gloria, El Modelo, Independencia y Zapopita-Pánuco.

La Región XIV. Huasteca. Incluye dos zonas: una que tiene como centro a la ciudad de Valles; y la otra, que cubre el extremo norte de Veracruz y la parte suroeste del estado de Tamaulipas. La Producción azucarera de esta región incluye los resultados de operación de los ingenios Agua Buena, Plan de Ayala, El Mante y Xicotencatl.

Los datos de la producción de caña de azúcar obtenidos en el ciclo otoño-invierno 1977-1978, se presentan en la tabla 1; (19).

Tabla 1. Producción de caña de azúcar por cosecha obtenida en el ciclo otoño-invierno 1977-1978; (19).

Entidad	Superficie ¹	Producción ²	Rendimiento ³
Sonora	76	4, 560	60, 000
Sinaloa	47, 120	2, 987, 750	63, 407
Nayarit	17, 100	916, 836	53, 616
N. León	48	1, 995	41, 563
Tamaulipas	33, 350	2, 344, 215	70, 500
Zacatecas	114	5, 320	46, 667
San Luis Potosí	29, 640	1, 669, 150	56, 314
Jalisco	39, 425	3, 884, 788	98, 536
Colima	7, 629	431, 495	56, 560
Michoacán	16, 150	565, 250	35, 000
E. de México	523	31, 350	59, 953
Hidalgo	7, 600	266, 000	35, 000
Puebla	11, 742	1, 116, 108	95, 053
Morelos	16, 245	1, 673, 235	103, 000
Veracruz	203, 639	11, 875, 000	58, 314
Guerrero	2, 432	139, 555	65, 846
Oaxaca	6, 033	406, 600	57, 383
Chiapas	6, 175	322, 763	63, 500
Tabasco	20, 970	1, 203, 119	57, 373
Yucatán	356	12, 469	35, 025
Campache	6, 954	294, 274	42, 317
Total Nacional	473, 221	30, 151, 740	63, 716

1= Hectáreas 2= Toneladas 3= Promedio Kg/Ha

2.1.1 Antecedentes de la utilización del bagazo de caña.

El bagazo de la caña de azúcar se utiliza principalmente como combustible para las calderas de los ingenios azucareros. Ahora que se cuenta con mayores conocimientos tanto de técnicas de proceso como de aprovechamiento de residuos agrícolas, se están estudiando nuevas aplicaciones. El bagazo se puede emplear en la producción de cartón; material aislante y pulpa de papel; furfural y otros productos químicos; proteína unicelular por fermentación, etc. (4).

En la producción de papel debe utilizarse únicamente la fracción fibrosa (bagazo desmedulado) ya que la médula tiene un contenido de carbohidratos más variado, incluyendo hemicelulosas tales como xilanos; glucanos; mananos y fracciones poliuronidas de xilosa, arabinosa y glucosa. También están presentes varias pentosanas enlazadas en polímeros cortos y amorfos, lo que hace que las fibras sean más cortas. Esto hace que la pulpa tenga mayor aplicación en la producción de proteína unicelular por fermentación; (4).

Para la producción de proteína unicelular (4) es necesario tomar en cuenta que la celulosa es la principal fuente de carbohidratos y que esta difiere radicalmente de los carbohidratos fermentables por su insolubilidad en agua; se encuentra polimerizada por una unión B(1-4) glucosídica y generalmente tiene una fracción cristalina altamente ordenada. La celulosa se encuentra relacionada

estrechamente con hemicelulosas y lignina.

Para que la celulosa pueda ser utilizada como sustrato microbiano es necesario un pretratamiento químico, que consiste en poner el bagazo molido con una solución cáustica al 2%, durante 30 minutos, se exprime y se mete al horno para su oxidación, ayudando con esto a la solubilización de la celulosa y la delignificación parcial. Esta prehidrólisis se puede hacer además en forma ácida o enzimática; (6).

2.1.1 El cogollo de la caña de azúcar.

La norma establecida por la industria desde tiempo inmemorial es de que al cortar la caña se despunte el tallo, dejando para otros usos la parte removida. Se justifica en cuanto a que así se obtiene un rendimiento industrial mayor de sacarosa. Este cogollo o punta separada tiene un bajo contenido de sacarosa y en consecuencia su inclusión en el jugo de extracción aumentaría la cantidad de miel final y subproductos sólidos producidos por unidad de peso de azúcar fabricado. Esto se comprenderá mejor al señalar que el cogollo contiene solamente 3-6% de sacarosa y que la pureza de su jugo es de 35 a 60% según demuestran los análisis de distintas variedades de caña (22). La cantidad obtenida en % de caña verde se presenta en la siguiente tabla (8):

Tabla 2. Cantidad obtenida en % de caña verde.

	Natural %	Base seca %
Cogollo y hojas verdes	9-13	2-3
Bagazo	23-27	11-13
Miel final	2.6-3.0	2.3-2.7
Cachaza	3.0-3.8	0.8-1.0

El cogollo puede emplearse directamente para producir forraje. Algunas veces se utilizan como semilla los canutos tiernos, pero por lo general se deja el cogollo entero abandonado en el campo para que devuelva a la tierra, al descomponerse, parte de las sustancias minerales tomadas.

La capa de las hojas formada sobre el terreno contribuye además a conservar la humedad de la tierra y a retardar el desarrollo de hierbas. Estos efectos benéficos tienen, sin embargo una contraparte. El medio creado en la superficie del campo es muy favorable al desarrollo de roedores e insectos, por lo que muchas veces se prefiere quemar el cogollo antes.

Definición del cogollo.- Tal como se corta el cogollo del tallo de la caña, se compone de hojas verdes, de el cilindro constituido por hojas en formación enrolladas alrededor de la yema apical, y de los canutos tiernos, es decir sin madurar. En la misma definición deben comprenderse los retoños retardados, que al no crecer lo suficiente para constituir tallos, se cortan y dejan en-

el campo en forma similar al cogollo.

Composición y propiedad del cogollo.— Desde el punto de vista químico, el cogollo es sumamente complejo, — contiene todos los elementos y compuestos que requiere la planta para desarrollarse y alimentar a los canutos, que van apareciendo en el tallo de la caña durante su periodo vegetativo. Como se mencionó, todas las funciones de los órganos de la planta parecen ser reguladas desde el ápice. En la yema apical tienen su origen los órganos de el sistema completo de raíces y hojas, con las cuales — obtienen del suelo y de la atmósfera los materiales esenciales para su crecimiento.

Los investigadores que han fijado su atención en la naturaleza del cogollo (22), encontraron una proporción de sales mayor en esa parte superior que en el resto de la planta. En los segmentos blancos, sin madurar, se encuentra además un contenido más elevado de glucosa que — en los canutos madurados sin hojas.

La composición del cogollo fresco reportado (8) es:

Tabla 3. Composición del cogollo en %.

Materia seca	20-25
Proteína base materia seca	5.4
Fibra base materia seca	34.5
Ceras base materia seca	1.0
Cenizas base materia seca	5.9
Carbohidratos base materia seca	53.2

En cuanto al rendimiento, una hectárea de caña debe rendir entre 2.0 y 2.2 toneladas métricas de materia seca de cogollo por año que aportan de 0.8 a 1.0 toneladas métricas de carbohidratos fácilmente asimilables.

En Cuba se suele utilizar fresco, pero también con el fin de prolongar su conservación puede molerse y secarse en forma de harina para alimento de ganado; (22).

En la Tabla 4 se presenta el análisis de la harina del cogollo; (8).

Tabla 4. Análisis de la harina (8).

Humedad	6.17 %
Proteína cruda	4.11
Proteína digestible	3.09
Grasa	0.94
Fibra	29.7
Cenizas	4.57
Extracto no nitrogenado	54.5

La proteína del cogollo presenta a su vez el siguiente aminograma (8):

Tabla 5. Aminoácidos constituyentes de la proteína del cogollo.

Lis	4.31 %	Val	6.5 %
Arg	2.23	Isolis	3.61
His	0.96	Tirosina	1.48
Asp	8.12	Ser	4.18
Tre	3.63	Pro	1.42
Ac. gl.	8.51	O-Ala	3.3
Gli	3.92	Met	1.02
Leu	6.59	Alan	4.82

2.1.3 Antecedentes sobre la utilización del cogollo.

Los productos de valor comercial que potencialmente pueden obtenerse del cogollo y del follaje, relacionados en orden de importancia son: Celulosa, azúcares, hemicelulosas, lignina y sales (22).

En Cuba se han realizado varios estudios con el fin de obtener ciertos datos preliminares del cogollo relacionados con sus propiedades en vista de la posibilidad de su utilización (22). En estos reportes se llegó a la conclusión de que no parece necesario desarrollar nuevos procedimientos sino aprovechar los existentes para otros residuos. Por medio de estos puede lograrse del cogollo y de las hojas, ciertas sustancias valiosas y apropiadas para la fabricación de alcohol, furfural, tabla de construcción, cartón, papel y celulosa. Asimismo, el residuo de fabricación puede ser devuelto a los campos de cultivo.

El primer objeto perseguido con los experimentos señalados fué obtener del cogollo y de la paja de caña un producto celulósico para la fabricación de tabla, cartón o papel (22). También se ha estudiado la posibilidad de obtener un líquido fermentable con todas las sales y azúcares naturales. Asimismo una hidrólisis puede producir pentosas, convirtiendo las hemicelulosas de la fibra en materia prima para la fabricación de furfural, levadura, etc. (22).

El cogollo y las hojas de caña se someten separada-

mente a la operación preliminar de desmenuzado, para facilitar así las operaciones siguientes. Esta desintegración puede realizarse de diversas maneras, usando máquinas para tallo. Cualquiera que sea el tipo utilizado lo esencial de la operación es dividir, moler, triturar o reducir el material mecánicamente a una pulpa o masa uniforme, de fácil manejo. El material así preparado, es entonces sometido a las diversas operaciones y procesos- (22) r

La pulpa resultante de la desintegración del cogollo que comprende todas sus partes componentes, puede someterse a la compresión para expulsar con el auxilio del agua, un licor fermentable (también puede ser extraído por lixiviación). El licor separado que contiene todas las sustancias solubles en agua, puede concentrarse para reducir el costo de transporte a las destilerías o para la preparación de alimentos de consumo directo. También puede conducirse por tuberías a la sala de fermentación, sin concentrado previo.

La parte fibrosa de los materiales, substancialmente libre de azúcares, puede convertirse a través de los métodos usuales en un producto apropiado para la fabricación de tableros aglomerados u otros productos celulósicos.

Se puede también convertir la holocelulosa de la fibra en levadura y alcohol. Para ello, la pulpa libre de azúcares naturales es sometida a una digestión ácida, --

con lo cual se obtiene, por hidrólisis, un líquido fermentable y un residuo lignocelulósico que puede ser utilizado en la fabricación de objetos plásticos, tablas, etc. (22).

Si la masa celular fibrosa obtenida mecánicamente y libre de sustancias solubles en agua, es sometida a la prehidrólisis ácida para convertir las hemicelulosas únicamente en azúcares, el producto fibroso resultante puede destinarse a la fabricación de cartón y papel para envases. El licor de tratamiento, después de neutralizado, puede ser empleado en la fabricación de levadura o furfural (22).

En el cogollo se realiza con mayor intensidad la actividad fotosintética de la planta por ser donde se encuentra concentrada la clorofila. Es factible llevar a cabo la separación de los pigmentos vegetales como son caroteno, xantofila, clorofila y demás sustancias concomitantes de los cloroplastos. Las citadas sustancias pueden obtenerse sin causar alguna merma en el rendimiento de los demás productos industriales que han sido mencionados anteriormente, como ejemplo se puede citar la fabricación de una pulpa excelente de papel de envolver obtenida del residuo celulósico, después de haber separado los pigmentos (22).

Otra alternativa en la utilización del cogollo es la que se propone en el presente trabajo, que consiste en llevar a cabo una fermentación láctica, utilizando los azúcares disponibles presentes en el cogollo.

2.1.4. Panorama de la utilización industrial del cogollo y del follaje de la caña de azúcar.

El estudio que a continuación se presenta sobre el valor potencial estimado de la materia seca de los órganos de caña dejados en el campo, se realizó en la Habana, Cuba en 1951 (22), y nos da una idea de la importancia de los residuos agrícolas y su economía. Se cita esta referencia por no haberse encontrado datos de mayor actualidad.

Los residuos agrícolas más importantes son los de las plantas gramíneas cultivadas en forma masiva por el hombre siendo estas la caña de azúcar, maíz, trigo y arroz.

El peso total de la materia seca de estas plantas obtenidas de cada cosecha, por hectárea de superficie terrestre, puede verse distribuida por sus principales componentes en el cuadro siguiente:

Tabla 6. Producción por cosecha y por hectárea de materia seca en toneladas métricas (22).

Plantas	Grano o azúcar en el jugo	Tallos y hojas	Total
Maíz (máximo)	3.9	4.8	8.1
Trigo (máximo)	3.4	3.4	6.8
Arroz (máximo)	1.8	2.2	4.0
Caña de azúcar (mínimo)	5.6	19.7	25.3
Caña de azúcar (máximo)	22.4	78.8	101.2

No existe otra planta utilizada industrialmente, como la caña de azúcar, que produzca una cantidad tan grande de estos residuos por unidad de área de terreno cultivado y por unidad de material cosechado. Esto se puede apreciar en los siguientes datos :

La cantidad de materia seca de los tallos es aproximadamente un 30% del total de los tallos obtenidos. Las demás partes de la caña dejadas en el campo representan en peso una cantidad similar.

La materia seca total de la planta entera sin raíces se halla distribuida en las proporciones que se muestran en el siguiente cuadro (22) :

Tabla 7. Distribución probable de la materia seca de caña entera, sin raíces.

	%	% del total de materia seca obtenida.
Tallos despuntados	30.00	50.00
Retornos y hojas verdes	3.20	5.35
Hojas y cañas secas	14.72	24.60
Cogollo	12.00	20.05
Total	59.92	100.00

De la cantidad de materia seca que entra al ingenio se obtiene 43.85% de azúcar y el resto aparece en los residuos relacionados a continuación (22):

Tabla 8. Distribución en % de materia seca, en tallos y caña entera sin raíces.

	% de materia seca.	
	Tallos	Caña entera sin raíces
Bagazo	43.85	21.93
Cachaza	22.68	1.33
Melaza	9.62	4.81
Azúcar	43.85	21.93
Total	100.00	50.00

Como puede observarse, el producto principal de la caña i.e. azúcar, es aproximadamente el 22% del total de la materia seca fabricada por la planta durante su periodo vegetativo, sin incluir las raíces. Esto permitirá - apreciar la magnitud y significado de la industria que - podría desarrollarse de artículos derivados del 78% restante de la materia seca de la planta.

La materia seca se compone principalmente de las - siguientes sustancias que resultan ser potencialmente industrializables.

1.- CELULOSA. La palabra celulosa se emplea aquí como término genérico para todos los productos celulósicos - - que comprenden las distintas pastas de papel ordinarias.

2.- HEMICELULOSAS. Como se sabe estas sustancias se utilizan principalmente en la fabricación de levadura y - furfural.

3.- LIGNINA. La lignina tiene su aplicación más valiosa como fertilizante, utilizándose también como pegamento, aglomerante para minerales, en plásticos, detergentes, insecticidas, como combustible en forma seca, etc.

4.- MINERALES. Los minerales están determinados por la ceniza y representa junto con la de los tallos todos los elementos inorgánicos que la planta extrae de la tierra.

5.- SUSTANCIAS NITROGENADAS. Estas sustancias pueden utilizarse como abono junto con la lignina o emplearlas en la fabricación de levadura. La lignina potásica mezclada con la cachaza y con las sustancias nitrogenadas, — constituyen un abono completo para el cultivo de la caña.

6.- CAROTENO. El consumo de estas sustancias, que es la provitamina A, puede extenderse en mayor escala a los animales domésticos que no dispongan de pastos apropiados abundantes. El principal inconveniente de este — producto consiste en su difícil conservación.

7.- CLOROFILA. El consumo está limitado por el elevado costo actual de extracción.

8.- CERAS Y GRASAS. Se pueden obtener de las hojas completamente blanqueadas.

Se debe tomar en cuenta que para la obtención de los productos antes señalados sería necesario un esfuerzo — considerable en términos de capital y preparación tecnológica.

Como se puede apreciar, la variedad de productos importantes en residuos agrícolas de caña, es muy amplia. La selección del producto final por obtener será dictada por factores económicos.

Los precios de venta, sin embargo, deben ser incluidos en un análisis económico integral para tener una base de comparación adecuada. Los datos de las tablas siguientes (Tablas 9 y 10); (22), ofrecen valores comparativos-aproximados de eficiencia económica para dos alternativas de procesamiento. Es evidente que dicho análisis carece de profundidad suficiente para constituirse en parámetro de selección. Así mismo corresponden valores para el año 1951, por lo que su validez en las condiciones actuales es muy dudosa. Por tales razones, se citan los datos de estas tablas con fines meramente comparativos y bajo las restricciones señaladas.

Tabla 9. Tabla de costos I. De 100 toneladas de celulosa, 200 de forraje y 40 de abono de lignina potásica obtenibles de 1200 toneladas cortas de cogollos y retoños verdes, por día de 24 horas.

MATERIALES	COSTO POR DIA (Pesos M.N.)	
Cogollos y retoños	42,250.00	
Sales de potasio	10,000.00	
Acido sulfúrico	3,500.00	
Miscelánea y nutrimentos de la levadura	13,750.00	\$69,500.00

ELABORACION	COSTO POR DIA (\$)	
Combustible	15,000.00	
Mano de obra	8,125.00	
Suministros	1,250.00	
Reparaciones	2,500.00	
Miscelánea	625.00	\$27,500.00

GASTOS GENERALES

Embalaje	4,375.00	
Dirección y administración	1,875.00	
Impuestos y seguros	625.00	
Miscelánea	625.00	\$ 7,500.00

Interés y amortización
a razón de 10% anual \$25,000.00

Costo total de los productos \$129,500.00

Valor de los productos calculado al precio más bajo:

100 ton de celulosa alfa	a \$1000.00	\$100,000.00
200 ton de forraje	a 375.00	75,000.00
40 ton de abono	a 500.00	<u>20,000.00</u>

Total \$195,000.00

Tabla 10. Tabla de costos 2. Para la obtención de -
caroteno, clorofila, pentosanas, celulosa y lignina notá
sica.

Capacidad diaria de 1,200 ton de material vegetal -

verde para producir 100 ton de celulosa alfa, 100 ton de hemicelulosa, 60 Kg de caroteno, 2,250 Kg de clorofila y 150 ton de residuos de lignina potásica para abono por día.

MATERIALES	COSTO POR DIA (Pesos M.N.)	
Cogollo y retoños	42,250.00	
Sales de potasio	10,000.00	
Acido sulfúrico	3,500.00	
Disolventes	31,250.00	
Miscelánea	2,000.00	\$89,000.00
ELABORACION		
Combustible	25,000.00	
Mano de obra	10,000.00	
Suministros	1,250.00	
Reparaciones	5,000.00	
Miscelánea	2,500.00	\$43,750.00
GASTOS GENERALES		
Administración y dirección técnica, etc.	1,875.00	
Embalaje	12,500.00	
Impuestos y seguros	1,250.00	
Miscelánea	625.00	\$16,250.00
Interés y amortización a razón de 10% anual		<u>\$50,000.00</u>
Costo total de productos		\$199,000.00

Valor de los productos:

100 ton de pasta de celulosa alfa a	\$1,000.00	100,000.00
100 ton de hemicelulosa	a 250.00	25,000.00
60 Kg de caroteno, el gramo	a 2.50	150,000.00
2000 Kg de clorofila	a 27.50	55,000.00
160 ton de abono compuesto de lignina y demás residuos	a 375.00	<u>60,000.00</u>
Total		\$390,000.00

Diferencia entre el costo de producción y precio de venta:

\$390,000.00- \$199,000.00 = \$191,000.00 por día de trabajo

En términos exclusivos de costos de producción, es definitivo que la elaboración de forraje concentrado, empleando cogollo y puntas, combinado con la producción simultánea de lignina potásica resulta ser la transforma--ción más económica.

En la utilización del cogollo para la obtención de -ácido láctico por fermentación, se debe emplear un microorganismo homofermentativo para favorecer la producción -de dicho ácido. Las consideraciones propias para determinar las condiciones favorables de este proceso fermentativo se describe en el capítulo siguiente.

2.2. Producción de ácido láctico por fermentación.

2.2.1. Antecedentes.

El ácido láctico o α -hidroxipropiónico, se obtiene a nivel industrial por la fermentación de dextrosa, lactosa y sacarosa. En Estados Unidos las principales materias primas son azúcar de maíz, melaza de caña y suero de leche, mientras que en Alemania el almidón de papa es el más usado.

Lactobacilos, morfología y características. Las bacterias lácticas de los alimentos pertenecen al género -- Lactobacillus, que son bacilos generalmente delgados y -- largos, formando cadenas en la mayoría de las especies. Son microaerófilos catalasa negativos y Gram-positivos. Se puede dividir a los lactobacilos en homofermentativos y heterofermentativos o bien en especies que crecen mejor entre 37 y 45°C o más y aquellas cuya temperatura óptima está entre 28 y 32°C. Los organismos homofermentativos -- son aquellos que fermentan los azúcares dando como producto principal ácido láctico. Los organismos heterofermentativos además de producir ácido láctico en la fermentación generan otros productos tales como alcohol etílico, ácido acético, dióxido de carbono, glicerina y ácido sucínico.

Los organismos homofermentativos cuya temperatura -- óptima es de 37°C o mayor com renden Lactobacillus caucasicus, L. bulgaricus, L. lactis, L. acidophilus, L. ther-

mophilus, L. helveticus, L. delbrueckii. El L. fermenti - es el mejor ejemplo de un lactobacilo heterofermentativo que crece bien a temperaturas altas. Los lactobacilos -- homofermentativos, que poseen las temperaturas óptimas de crecimiento menores (30°C) comprenden L. casei, L. -- plantarum y L. leichmannii, las especies heterofermentativas con temperaturas óptimas menores pertenecen al sub género Saccharobacillus y son Lactobacillus brevis, L. -- buchneri, L. pastirianus, L. hilgardii y L. thrichodes. Todas las especies citadas salvo L. delbrueckii, L. leichmannii, L. hilgardii, L. thrichodes y algunas cepas de L. brevis fermentan la lactosa con producción de ácido láctico.

2.2.2. Mecanismo de la fermentación láctica.

a) Bacteria homofermentativas.- Los pasos iniciales en la fermentación láctica son análogos a los que siguen la glicólisis en el músculo y a los de la fermentación -- alcohólica por levaduras hasta el punto de la formación del ácido pirúvico (23).

El ácido pirúvico es un producto intermediario importante en la formación de ácido láctico por bacterias -- homofermentativas.

El mecanismo de la fermentación según Embden-Meyerhof (23), puede dividirse en seis pasos:

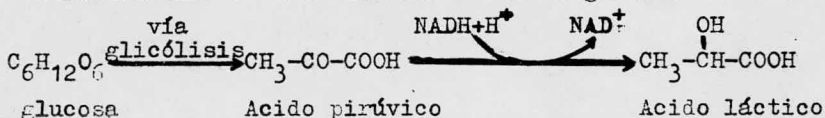
- 1) Formación de fructosa-1,6-difosfato.
- 2) Formación de fosfotriosa.

- 3) Formación de 3-fosfoglicerato.
- 4) Formación de 2-fosfoglicerato.
- 5) Formación de fosfoenolpiruvato.
- 6) Formación de piruvato.

Intervienen gran número de reacciones estrechamente relacionadas que pueden dividirse en pasos de oxidación - reducción y fosforilación y ciertas reacciones especiales. Todas estas reacciones son catalizadas por enzimas muy específicas.

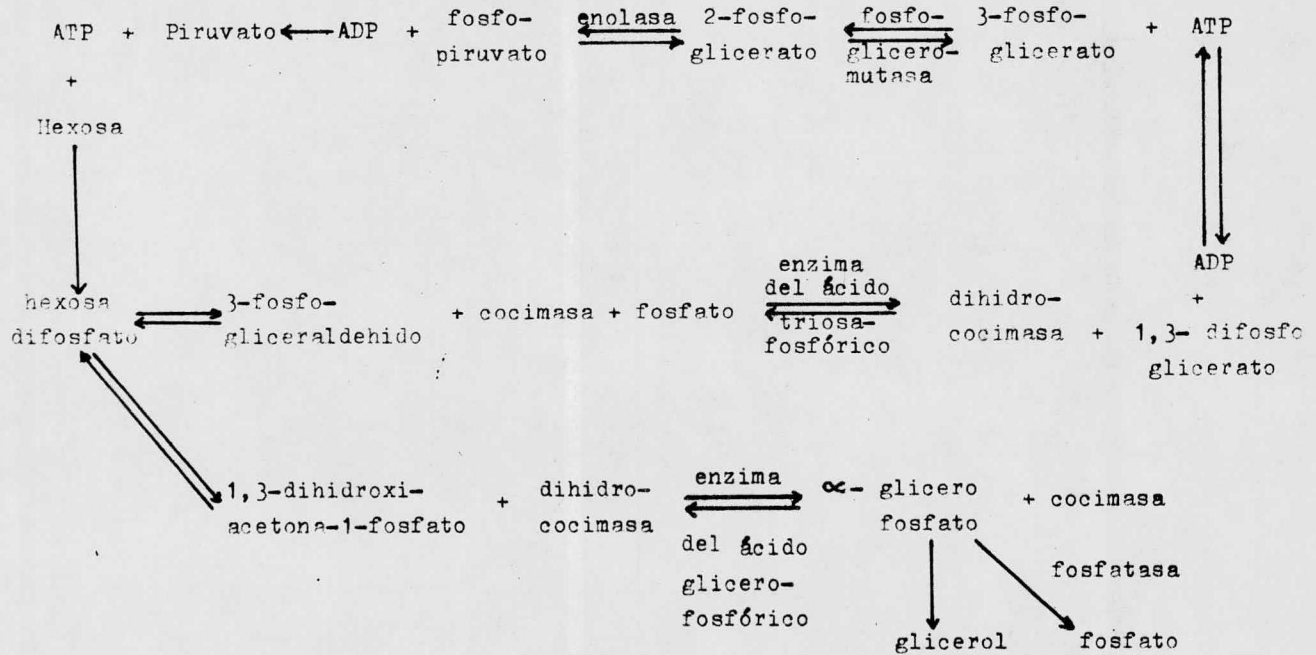
En el esquema 1 se presenta el proceso metabólico - completo.

El ácido pirúvico formado por la bacteria láctica - es reducido por una deshidrogenasa (de las que al parecer existen al menos tres tipos sintetizados por bacterias) convirtiéndose en ácido láctico de la siguiente manera:

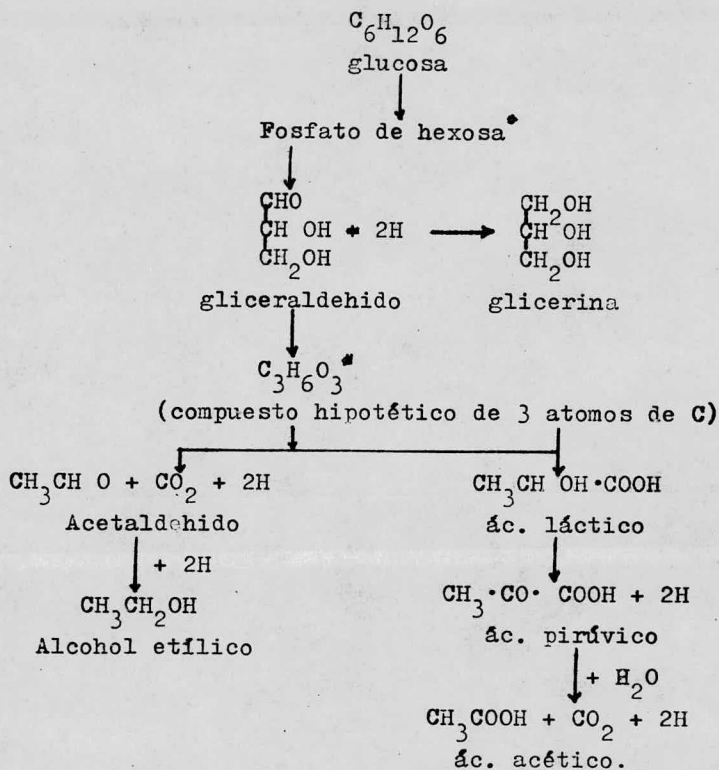


b) Bacterias heterofermentativas. Como se mencionó - anteriormente estos microorganismos además de producir - ácido láctico en la fermentación generan otros productos. El esquema 2 muestra el mecanismo sugerido por Nelson y - Werkman (12) para el catabolismo de la glucosa para las - bacterias heterofermentativas.

Esquema 1. Mecanismo de la homofermentación según Embden-Meyerhof.



Esquema 2. Catabolismo de la glucosa por las bacterias heterofermentativas según Nelson y Werkman, (12.).



* Estos productos no se han identificado en la fermentación.

2.2.3. Condiciones de la fermentación homoláctica.

a) Organismos empleados. Los organismos que pueden emplearse para la producción comercial de ácido láctico por fermentación son: Lactobacillus delbrueckii, L. pentosus, L. casei, L. Teichmannii, L. bulgaricus y Streptococcus lactis.

El tipo de organismo a seleccionar para una fermentación depende en primer lugar del carbohidrato que ha de ser fermentado y de la temperatura que se vaya a emplear. Para fermentar leche o suero de esta, pueden emplearse Lactobacillus bulgaricus, L. casei o Streptococcus lactis, siendo preferible el primero. En la fermentación de glucosa o maltosa pueden emplearse Lactobacillus delbrueckii, L. pentosus, L. leichmannii o L. bulgaricus. - Para fermentar féculas hidrolizadas se emplea frecuentemente Lactobacillus delbrueckii junto con otros de estos organismos como L. bulgaricus o Streptococcus lactis.

Para la elección del carbohidrato se debe considerar su disponibilidad, su fermentabilidad con o sin tratamiento preliminar y su costo.

b) Temperatura de fermentación. La fermentación láctica se lleva a cabo a temperaturas relativamente altas. Si se emplea L. delbrueckii puede mantenerse a una temperatura de 45°C o aún mayor; Lactobacillus bulgaricus puede ser incubado de 45 a 50°C, L. pentosus, L. casei o Streptococcus lactis alrededor de 30°C.

La temperatura óptima puede determinarse experimentalmente para cada tipo de fermentación.

c) Concentración de azúcar. La concentración de azúcar de los mostos se ajusta normalmente de 5 a 20%, según la naturaleza de la materia prima y las condiciones de proceso.

d) Relación de oxígeno. Las bacterias empleadas en la producción de ácido láctico industrial suelen ser de naturaleza microaerófila o anaerobia.

e) pH. La fermentación transcurre de manera favorable cuando el pH está dentro de la zona ácida pero cercano a la neutralidad lo que se logra mediante la adición de carbonato cálcico, hidróxido cálcico o algún otro agente neutralizante al medio de cultivo.

Si no se neutraliza el ácido láctico, las bacterias no pueden tolerar la gran acidéz desarrollada y se interrumpe la fermentación.

f) Factores de crecimiento. Algunas bacterias lácticas necesitan determinados factores de crecimiento, como la riboflavina. El ácido nicotínico estimula el crecimiento y la producción de ácido en ciertos casos.

g) Duración de la fermentación. La fermentación suele terminar en un intervalo de 1 a 6 días.

2.2.4. Producción industrial.

a) Rendimientos. Generalmente los rendimientos son entre 85 y 90%, referidos al azúcar fermentado, aunque se han obtenido rendimientos mayores, (17).

b) Calidades comerciales. Las más importantes son: ácido láctico bruto (concentración de 22, 44 y 80%); ácido láctico comestible (concentración de 50 y 80%); ácido láctico de grado U.S.P. y concentración del 75 y 80%, -- (13).

c) Usos del ácido láctico. Los usos del ácido láctico son numerosos, tanto en la alimentación como en las fermentaciones, fabricación de productos farmacéuticos y dentro de la industria química. Como acidificante, se emplea la calidad comestible de ácido láctico en confitería y fabricación de extractos, esencias y zumos de frutas, limonadas, jarabes y otros productos. También puede emplearse en el curado de la carne y en las conservas de pescado y vegetales, (17).

En las coles ácidas y variantes actúa como preservativo de la putrefacción. Se emplea también para acidular los extractos de malta en la manufactura de la cerveza, para ajustar la acidéz de la salmuera en la preparación de aceitunas, para impedir el desarrollo de las bacterias de ácido butírico en la fabricación de levadura y en la fabricación de bebidas efervescentes, (17).

Dentro de la industria química se emplea en el teñi- do de seda y otros textiles, como mordiente en el estam- pado de la lana, en la preparación de cueros y como fun- dente en las pastas de soldar. La calidad transparente - se emplea en la industria de plásticos, (17).

2.2.4.1. Acido láctico de melazas de caña.

El organismo más conocido para la fermentación de - melazas y por lo tanto de sacarosa es el Lactobacillus - delbrueckii. Las condiciones favorables para este micro- organismo son las siguientes (15):

Concentración de azúcar: 10-12%.

pH mezcla: 6.0 (6.3 da la máxima rapidéz de fermen- tación, 5.7 da la máxima producción de - ácido).

Temperatura: 45-50°C.

Nitrógeno: 2% del azúcar disponible.

P₂O₅: 1% del azúcar disponible.

Es necesario agregar carbonato de calcio al medio - de fermentación para neutralizarlo.

Se esteriliza el medio a ebullición durante 30 minu- tos, se enfria hasta 50°C, se ajusta el pH a 6.0 con -- carbonato de calcio. La mezcla se inocula con 5% del cul- tivo bacteriano y se mantiene la temperatura en 50°C. La fermentación generalmente termina de 4 a 6 días. Se adi- ciona entonces un exceso de cal hasta un pH de 10-11 para

detener la actividad microbiana.

El rendimiento varía entre 92 y 94% de la glucosa inicial. Rendimientos más bajos son debidos a un rompimiento incompleto del azúcar o a reacciones degradadoras del ácido láctico producido.

2.3. Fermentación ruminal.

2.3.1. Anatomía y fisionomía del rumen.

El rumiante es un tipo de animal que puede consumir alimentos que para el hombre son indigeribles, tales como celulosa y nitrógeno no protéico, y convertirlos en alimentos para el hombre (carne y leche) gracias a los microorganismos que simbióticamente viven en el rumen.

El estómago de los rumiantes consta de cuatro compartimientos: el rumen, el retículo, el omaso y el abomaso. Pasado el primer año, el rumen representa el 80% del estómago y en los bovinos alcanza una capacidad de 100 a 300 lt., encontrándose revestido por un epitelio en el que se desarrollan papilas, las cuales aumentan la superficie de contacto para la absorción de metabolitos. El rumen puede considerarse como una cámara de fermentación en la que se producen los ácidos grasos volátiles que satisfacen las necesidades energéticas del animal, obtenéndose además ciertas ventajas en la conversión de materia los nitrogenados no protéicos en proteína microbiana.

De acuerdo con Annison y Lewis (1), las condiciones

del rumen son :

a) La toma frecuente de alimentos proporciona un suplemento regular de sustrato para los microorganismos.

b) Los productos solubles de la actividad microbiana son absorbidos rápidamente por la pared ruminal. Su concentración es regulada por el paso del material líquido a intervalos hacia el omaso a través del orificio retículo-omasal. Las pequeñas partículas alimenticias y una proporción de población microbiana se eliminan del rumen en esta forma.

c) Los rumiantes secretan grandes cantidades de saliva que es rica en bicarbonato y otros iones. La saliva es el factor más importante en el mantenimiento del volúmen de líquido y fija el estado del pH y la composición iónica en el rumen.

El rumen es, en esencia, un sistema anaerobio muy reductor en un medio ligeramente ácido, pero con pH fijo, a una temperatura de 30°C y con una fase gaseosa compuesta principalmente de bióxido de carbono, metano y nitrógeno.

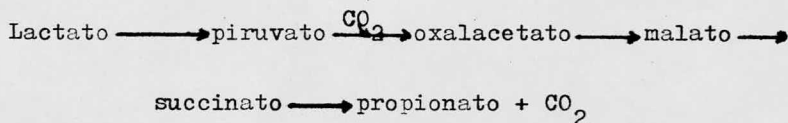
2.3.2 Metabolismo de los carbohidratos en la fermentación ruminal.

Los principales metabolitos de la fermentación ruminal de los carbohidratos son los ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente los ácidos acético, propiónico y -

b) Producción de ácido propiónico en el rumen.

Elsden en 1945 (1) fué el primero que demostró de manera definitiva la presencia de ácido propiónico en el contenido del rumen y demostró que era producido durante la fermentación de la celulosa, glucosa y ácido láctico.

Estudios posteriores de Johns en 1951 (1) demostraron que se formaban propionatos a partir de lactatos por un mecanismo de fijación de CO_2 .

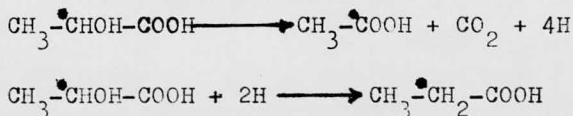


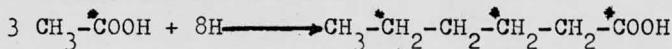
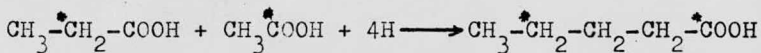
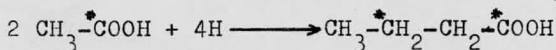
El succinato es descarboxilado cuantitativamente -- por los microorganismos del rumen.

c) Producción de AGV superiores en el rumen.

La fermentación de DL-lactato marcado con ^{14}C se estudió por Ladd en 1957, quien separó cromatográficamente los ácidos acético, propiónico, butírico, valérico y caprónico formados y determinó su radioactividad.

Las ecuaciones siguientes indican la formación de ácidos grasos a partir del lactato.





2.3.3 Importancia del ácido propiónico.

Según Orskov (1975) (13), en la producción de ácido acético existe una liberación de 4H y en el butírico de 2H₂ ya que su formación se logra por la reacción de dos moléculas de ácido acético; en cambio en el ácido propiónico son utilizadas dos moléculas de H₂. Esto da como resultado que el ácido acético conserve el 65% de la energía que contenía el carbohidrato que lo formó, el ácido butírico conserva el 72% y el propiónico el 109%.

Desde el punto de vista energético el ácido propiónico es recuperador de la energía perdida por la síntesis de ácido acético y butírico, pues en caso que los hidrógenos no sean utilizados para la síntesis de propiónico se utilizarán para la formación de metano, el cual junto con el CO₂ serán lanzados a la atmósfera con la considerable pérdida de poder reductor.

Por otro lado el ácido propiónico es glucogénico, - siendo precursor del ácido succínico en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos en la gluconeogénesis y de esta manera es convertido en glucosa vía fumarato, malato y - piruvato, (ver esquema 3).

- (1) Producido por fermentación en el rumen.
- (2) Vía demostrada en el epitelio del rumen (Pennington y Sutherland, 1956) (22).
- (3) Arginina, prolina, hidroxiprolina e histidina probablemente ingresan al ciclo después de convertirse en glutamatos. El aspartato origina oxalacetato por --- transaminación.
- (4) El glicerol originado por desintegración de la grasa neutra es metabolizado por vía glucolítica.

2.3.4. Acido láctico como precursor del ácido propiónico y su relación con la de radación de los carbohidratos.

Para observar la influencia del ácido láctico en la fermentación ruminal se realizó el siguiente experimento (14): A líquido ruminal procedente de un animal fistulado se le adicionaron diferentes niveles de concentración de ácido láctico, incubándose a una temperatura de 40°C, - manteniendo el pH constante con saliva artificial y observándose los patrones de fermentación de los AGV. Los resultados se presentan en la tabla 11 .

Estos resultados se graficaron obteniéndose la figura 1, donde se puede apreciar que la concentración de ácido acético disminuye con el aumento de la concentración de ácido láctico. El ácido butírico disminuye y el ácido propiónico aumenta. También es notorio que la eficiencia definida según Orskov (13) se incrementa del 74.9 al - 83.32%, esto es, la adición de ácido láctico mejora los patrones de fermentación ruminal al elevarse la concentración de ácido propiónico.

El ácido láctico, aunque su presencia no es normal en el rumen en cantidades determinables, se acumula cuando se incluyen en la ración grandes cantidades de carbohidratos de fermentación rápida. Si en la dieta se evita el cambio repentino de raciones pobres en almidón a otras muy ricas, y en su lugar hay un aumento gradual de almi -

dón durante un periodo de varias semanas los animales no muestran efectos nocivos y aumentan de peso satisfactoriamente. Cuando toman de pronto grandes cantidades de alimentos ricos en almidón los carbohidratos son fermentados rápidamente, el ácido láctico se acumula en el rumen y hay síntomas claros de enfermedad, (1).

El destino del lactato agregado al rumen de vacas -- fué investigado por Hueter y colaboradores en 1956 (1). Sus experimentos fueron realizados con lactato de sodio, que es soluble en agua y con la sal de calcio que es -- poco soluble. La absorción directa del ácido láctico en la sangre se demostró cuando se administraba sal sódica, pero no cuando se daba sal cálcica. En ambos casos la -- desintegración del lactato por los gérmenes ruminales -- causa aumento de AGV en el rumen, principalmente ácido -- propiónico y butírico. Se observó elevación inmediata de azúcar en la sangre cuando se daba lactato sódico, sugiriendo que el aumento era un efecto directo del lactato -- y no un efecto secundario en el rumen debido a la cantidad aumentada de propionato que sucedía cuando se daba -- cualquiera de las dos sales del ácido propiónico.

2.3.5. Transtornos relacionados con la producción -- de ácido láctico.

Los transtornos en los rumiantes que se han relacionado con la fermentación rápida de los carbohidratos en el rumen son varios, pero la causa primaria es la acumulación de ácido láctico. Hay descenso notable en el pH del

rumen, disminución en los ácidos grasos volátiles del rumen y aumento de la concentración del ácido láctico en la sangre.

Hay ciertos cambios en la población microbiana; Hungate y colaboradores, en 1952 (1) demostraron que la producción excesiva de ácido láctico aminora el número de bacterias y protozoos celulolíticos y eleva el número de bacterias gram-positivas, particularmente las afines al Streptococcus bovis. Una rápida disminución en el pH del rumen es característica de este transtorno. Scareskick (1954) (1) observó que al reducirse el pH a menos de 4.5 por la adición de ácidos minerales, se inhibe la motilidad del rumen. En circunstancias adecuadas, el pH está en el intervalo de 5.5 a 7.0 y cuando disminuye a menos de 4.5 se alteran las funciones normales del rumen. Este se mantiene en condiciones de neutralidad principalmente por tres factores: la eliminación de ácidos del rumen -- (absorción de ácidos grasos volátiles o el paso a lo largo del tubo digestivo), la adición de álcalis en el rumen (entrada de saliva o difusión de álcali de la sangre) y neutralización de los ácidos en el rumen (por bicarbonato y fosfato). Durante la intoxicación por ácido láctico, estos microorganismos están restringidos pero solo cuando el rumen contiene grandes cantidades de este ácido se ha señalado un pH inferior a 5. Por otra parte se ha encontrado que el ayuno en los animales normales eleva el pH a 7 u 8 en 48 horas y rápidamente baja otra vez durante la alimentación.

Las dietas ricas en azúcar basadas en glucosa y sacarosa, remolachas (forrajera y azucarera), coles y granos de cereales, como el trigo y maíz molido producen -- concentraciones particularmente grandes de ácido láctico en el rumen. En tales condiciones la actividad digestiva del animal puede estar disminuida durante varios días, - estado que puede continuar hasta que sobreviene la muerte. Turner y Hodgets en 1952 (1) observaron que el trigo en grandes cantidades (75 a 80 g/Kg de peso) fué mortal para ovejas. El trastorno está claramente relacionado - con el consumo repentino de carbohidratos de fermentación rápida en la dieta y puede evitarse si esta se cambia -- gradualmente. En estas circunstancias, los microorganismos que utilizan el ácido láctico tienen tiempo suficiente para aumentar en número.

Es posible que el ácido láctico sea absorbido y que así se modifique el equilibrio ácido-base del animal. - Con el término "lactadecemia" se han designado los trastornos metabólicos debido a la alteración del equilibrio ácido-base.

Tabla 11. Patrones de fermentación ruminal con diferentes concentraciones de ácido láctico, (14).

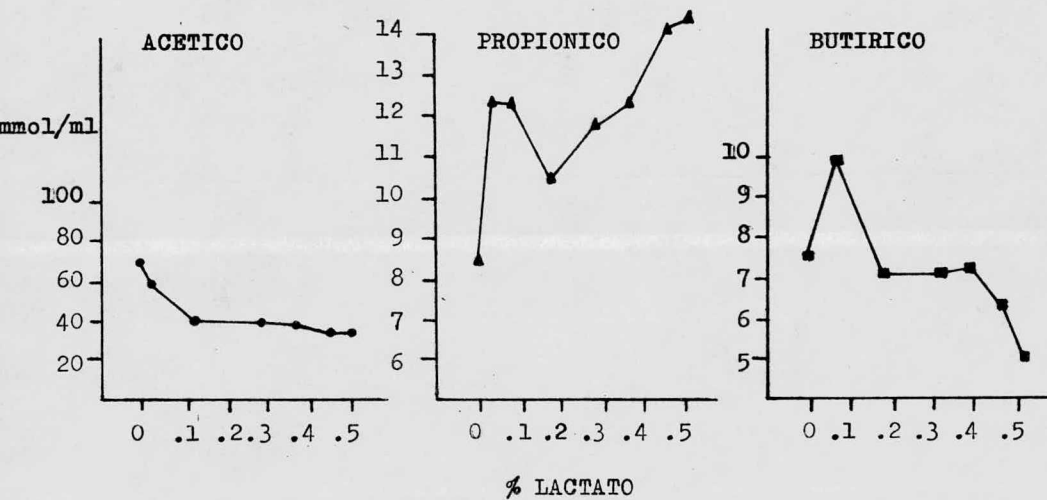
	ACETICO ¹	PROPIONICO ¹	BUTIRICO ¹	E ² %
Liq. ruminal	69.42	8.43	7.314	74.9
L.R. + 0.019%	59.45	12.36	8.42	79.28
L.R. + 0.038%	53.40	12.22	9.86	82.06
L.R. + 0.16 %	42.00	10.21	6.90	81.26
L.R. + 0.28 %	42.72	11.94	6.90	81.82
L.R. + 0.375%	40.58	12.36	7.038	82.89
L.R. + 0.44 %	37.74	14.19	6.21	83.68
L.R. + 0.50 %	37.03	14.33	5.66	83.32

(1) Los datos de concentración están en m mol/lt

(2) $E = \frac{0.622 Pa + 1.092 Pp + 1.56 Pb}{Pa + Pp + Pb}$; (12).

$Pa + Pp + Pb$

Figura 1. Patrones de fermentación de AGV con diferentes adiciones de Acido Láctico, (14).



3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Equipo y material empleados.

- 1.- Licuadora con vaso de 1000 ml. de capacidad para moler el cogollo.
- 2.- Tamiz del número 60.
- 3.- Digestor Kjeldhal de seis parrillas marca Labcon para determinación de proteínas.
- 4.- Estufa con control automático de temperatura marca THELCO Precisión Scientific Co. modelo 19, para determinación de humedad.
- 5.- Mufla con control automático de temperatura marca SYBRON Thermolyne 1500 Furnace, para determinación de cenizas.
- 6.- Equipo Soxhlet que consta de resistencia, matríz de bola, recirculante y refrigerante para determinación de grasa cruda.
- 7.- Estufa incubadora con control automático de temperatura para aislamiento de la cepa a utilizar.
- 8.- Liofilizadora marca Labconco Freeze Dryer-3.
- 9.- Incubadora con temperatura y velocidad de agitación controlada marca New Brunswick Scientific Co. modelo G 24, para fermentación.

10.- Fermentador de 800 ml de capacidad nominal marca New Brunswick Bio Flo modelo C 30 con sistema de control automático para oxígeno disuelto, velocidad de agitación, temperatura y pH. Se acopló al equipo de fermentación una bureta de 50 ml conteniendo NaOH 0.1N, que -- por medio de una bomba peristáltica adiciona el álcali -- al medio al activarse el sistema de control de pH.

11.- Potenciómetro marca Sargent Welch Scientific - Co. modelo IS para determinación de pH.

12.- Espectrofotómetro marca Pye Unicam SP 30 UV para determinación de azúcares y proteínas durante la fermentación.

13.- Rotavapor marca Büchi.

14.- Cromatofolios Merck PL de sílica-gel 60 F₂₅₄ - para cromatografía en capa fina.

3.2. Métodos de análisis.

Los métodos utilizados a lo largo de la secuencia experimental se mencionan a continuación:

Determinación de humedad (100-110°C) (2).

Determinación de proteína por el método de Kjeldahl (2)

Determinación de cenizas (2).

Determinación de grasa cruda por el método Soxhlet-

durante 16 horas (2).

Determinación de fibra cruda (2).

Determinación de azúcares por el método de Fehling-modificación Soxhlet (2).

Determinación de acidez como ácido láctico por titulación ácido-base con NaOH 0.1N (2).

Determinación de azúcares totales por el método microcolorimétrico de Dubois (3) (Ver anexo 5).

Determinación de proteínas por el método de Lowry - (10) (Ver anexo 6).

Determinación de ácidos orgánicos por cromatografía en capa fina (7) (Ver anexo 7).

4. SECUENCIA DE EXPERIMENTOS

Las etapas desarrolladas para determinar las condiciones de fermentación del cogollo fueron las siguientes:

- 1) Obtención del cogollo.
- 2) Análisis del cogollo.
- 3) Aislamiento de la cepa.
- 4) Inducción del microorganismo.
- 5) Fermentación.
- 6) Identificación del producto obtenido.

El diagrama de bloques presentada en la figura 2 - muestra la secuencia de experimentos y a continuación se describe cada etapa en detalle.

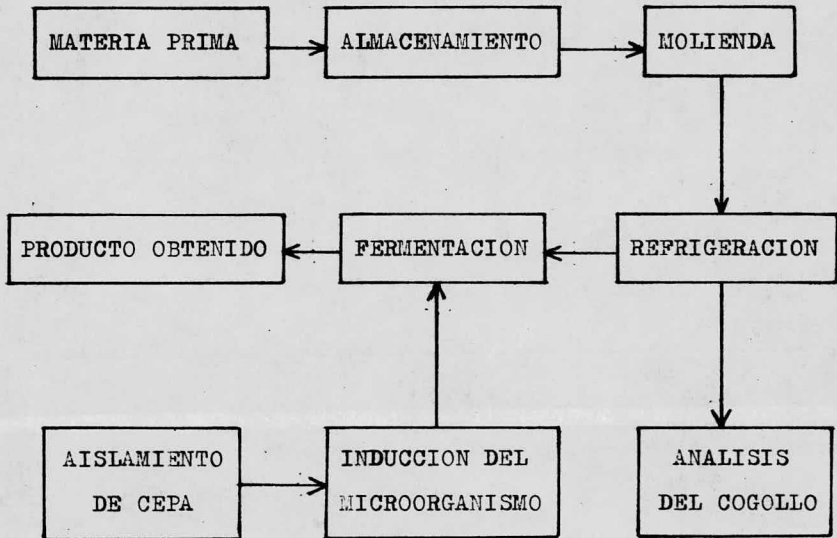
1) Obtención del cogollo .

El cogollo de la caña de azúcar que se utilizó para cumplir con los objetivos del presente trabajo se obtuvo en el mercado de la Merced durante la temporada de zafra, encontrándose aun en estado fresco.

Se almacenó en refrigerador a 10° C para su conservación .

El cogollo, previamente cortado en trozos pequeños

Figura 2. Diagrama de bloques.



se molió en licuadora y se tamizó en malla del número 60. Desde un principio se procesó un total de 7.0 Kg. de cogollo con el objeto de contar con muestras representativas de composición y tamaño de partículas constantes a todo lo largo de la experimentación. Se procedió entonces a refrigerar el lote de cogollo molido para evitar reacciones indeseables.

2) Análisis del cogollo .

Con el objeto de conocer la composición del cogollo en México y compararla con la reportada en la literatura (7) se llevó a cabo un análisis que consistió en :

a) Análisis general.- Las determinaciones realizadas fueron de :

Humedad (100-110°C) .

Proteína (Por el método de Kjeldahl).

Cenizas (500-550°C).

Grasa cruda (Extracción con éter durante 16 hrs.).

Fibra cruda.

Carbohidratos.

b) Determinación de azúcares reductores directos - y totales por el método de Fehling modificación Soxhlet (2).

Los resultados se pueden observar en la sección de éstos, tabla 7 .

3) Aislamiento de la cepa.

El microorganismo adecuado para fermentar sacarosa, según se mencionó anteriormente en el caso de las melazas, es el Lactobacillus delbrueckii. Dado que no se contaba con este microorganismo en el momento requerido se procedió a aislar una cepa de Lactobacillus del yogur comercial empleando la temperatura como parámetro de selección.

La temperatura escogida debía de cumplir las condiciones siguientes:

a) Promover el crecimiento de una cepa con altos rendimientos de ácido láctico.

b) Representar un valor suficiente alto que, junto con el pH bajo propio de la fermentación láctica, asegurara en gran medida la inhibición de microorganismos indeseables. Esto haría innecesaria la esterilización del medio y el control permanente de condiciones asépticas durante la fermentación, condiciones importantes en el desarrollo de una tecnología simple en zonas rurales productoras de caña.

c) Representar un valor no demasiado alto que hiciera necesario un sistema accesorio de calentamiento y control de temperatura.

Se seleccionó una temperatura de 37°C por cumplir en mayor medida con las condiciones señaladas. Idealmen-

te las condiciones isotérmicas deben ser logradas únicamente por la exotermicidad propia del metabolismo celular, evitando así la presencia de fuentes térmicas externas. - Esto puede lograrse diseñando un medio aislante que regule la disipación de calor al medio ambiente .

Hecho el aislamiento de los microorganismos por selección térmica (ver anexo 1) la cepa obtenida a 37°C se sembró en caja de petri , haciendo una dilución de 1:10 en agua estéril; el medio usado fué agar-tomate especial (11) (ver anexo 2) a un pH de 5 para fomentar el crecimiento de lactobacilos y al mismo tiempo inhibir el crecimiento de muchas bacterias comensales . Se incubó durante 48 horas, siendo éste el tiempo que necesitó el microorganismo para adaptarse al medio.

Se seleccionaron las colonias de lactobacilos por medio del microscopio con tinción de Gram y conociendo la morfología de éste . Estas colonias se resembraron en el mismo medio cuidando una posible contaminación y se incubaron durante 24 hrs. a 37°C .

4) Etapa de Inducción.

Las colonias de lactobacilos seleccionadas se resembraron en un medio reconstituido, sustituyendo progresivamente la leche en polvo del medio original por lactosa y caseína en diferentes proporciones (100,75,50 y 25 %), eliminando además el tomate del medio original . Se incubó y resembró en este medio varias veces hasta lograr un

crecimiento en el medio 100% reconstituido.

Esta inducción secuencial se hizo con el objeto de definir si los factores de crecimiento presentes en la leche en polvo son indispensables para el lactobacilo. Los resultados fueron negativos.

Las colonias obtenidas se resembraron en un medio reconstituido en que se sustituyó la lactosa y caseína por sacarosa y fosfato de amonio en proporciones crecientes, obteniéndose crecimiento en el medio 100% reconstituido. De la cepa obtenida se hicieron varias resiembras hasta producir suficiente cantidad de biomasa para liofilizar y así contar con un inóculo constante durante todo el experimento; además, periódicamente la cepa se resembró y refrigeró continuamente cada 15 días para conservar la activa.

Una vez que el lactobacilo se hubo acostumbrado a utilizar la sacarosa como fuente de carbono y el sulfato de amonio dibásico como fuente parcial de nitrógeno, se cambiaron éstas por cogollo de caña de azúcar.

Para determinar la fermentabilidad del cogollo se prepararon 250 ml de medio de cultivo conteniendo únicamente cogollo y agua (ver anexo 3). Como referencia se preparó un medio con peptona, sulfato de amonio y sacarosa, y para determinar si la peptona del medio contiene algún factor de crecimiento para el microorganismo y si este lo provee el cogollo, se preparó un medio con sulfato de amonio y sacarosa de acuerdo con la composición

del medio sólido en que se había desarrollado previamente el microorganismo (ver anexo 3). Se ajustó el pH a 5 con ácido fosfórico, se esterilizaron los medios y se inocularon cada uno con una asada de la cepa obtenida. - Se procedió a incubarlos a 37°C, determinando periódicamente pH y acidez como ácido láctico.

En los resultados obtenidos (ver tabla 8 y figura 4 en sección de resultados) se observa que el cogollo puede ser utilizado como única fuente de carbono y nitrógeno, cumpliendo con las necesidades del microorganismo. Se -- procede entonces a realizar las pruebas de fermentación.

5) Pruebas de fermentación.

La fermentación se llevó a cabo en las escalas y con condiciones siguientes:

VOLUMEN	CONCENTRACION DE AZUCARES
I) 250 ml	8.6 mg/ml
II) 500 ml	9.5 mg/ml
III) 500 ml	6.1 mg/ml a pH constante
IV) 800 ml	18.5 mg/ml
V) 800 ml	42.0 mg/ml

Las fermentaciones se realizaron a una temperatura constante de 37°C y agitación intermitente que permite -

la homogeneidad en el medio, facilitando así el muestreo de partes representativas durante la fermentación.

La concentración de azúcares en los medios se calculó tomando como límite inferior la concentración de azúcares en el medio sólido y como límite superior la concentración proporcionada en la fermentación de las melazas (15).

En el medio agar tomate (11) hay 3.8 mg de sacarosa/ml y si el cogollo tiene 13% de azúcares, entonces 3.8 mg. de azúcar están en 29.0 mg de cogollo/ml.

La cantidad de azúcar en la fermentación de la melaza es de 66 mg de azúcares/ml que corresponden a 500 mg de cogollo/ml.

Dato que la concentración de azúcares en el medio sólido es muy baja, se seleccionó de manera tentativa que la concentración de azúcares en los tres primeros pasos correspondiera aproximadamente al doble de la cantidad de azúcar presente en este medio, tomando en cuenta también, que la cantidad de sólidos que resulta de esa concentración no produce efectos adversos de mezclado. Se escogió una concentración de 8.0 mg de azúcares/ml.

En el IV) paso se duplicó la concentración de azúcares al duplicarse la cantidad de cogollo con el fin de determinar si esta cantidad de sólidos afecta la homogenización del medio y la expansión del microorganismo.

La concentración de azúcares en el V) paso se aumentó tratando de llegar a la concentración proporcionada en la fermentación de la melaza. Al emplear cogollo para tal propósito resultó un lodo difícil de agitar para su homogenización. Se procedió a complementar con melaza un medio preparado con 100g de cogollo en 800 ml de agua -- (1.62 % de azúcares) hasta alcanzar una concentración de azúcares al 6.6 % (42 mg/ml).

El incremento en la concentración de azúcares en el medio se hizo con el fin de observar si en las anteriores fermentaciones la cantidad de azúcares resultó ser factor limitante en el crecimiento de microorganismos -- y por lo tanto en la producción de ácido láctico.

El pH se mantuvo constante en el III) paso para observar si el descenso de este limita la producción de -- ácido láctico. Esto se logró acondicionando al fermentador una bureta conteniendo NaOH 0.1 N, que, por medio de una bomba peristáltica adaptada al sistema de control -- automático de pH, suministraba el álcali al medio de fermentación.

Cada medio se preparó, se ajustó a un pH de 5, se esterilizó y se dejó enfriar.

Una vez hecho esto, se tomó la primer muestra y se inoculó cada uno con 5 ml de pie de cuba. La incubación se realizó a 37°C hasta que la concentración de ácido láctico se mantuviera constante.

El pie de cuba estaba compuesto por peptona, sacarosa y fosfato de amonio (ver anexo 4). El inóculo siempre se agregó cuando el microorganismo se encontraba en la - fase exponencial de crecimiento.

El muestreo fué periódico. Asépticamente se tomaron 20 ml del medio y se filtraron. Las determinaciones realizadas para seguir la fermentación fueron:

1) Acidez. Como % de ácido láctico, por titulación con NaOH 0.1 N.

2) pH. Utilizando el potenciómetro.

3) Azúcares. Por espectrofotometría a 750 nm empleándo el método de Dubois (ver anexo 5).

La proteína durante la fermentación no se termino - cuantitativamente, sino como densidad óptica para observar únicamente los cambios de ésta, aunque el método utilizado es muy específico para aminoácidos aromáticos y a pesar de no ser representativo de la cantidad real de proteína presente, permite determinar rápidamente el incremento o disminución de ésta.

Al producto final se le determinó proteína cruda total por el método de Kjeldahl y se comparó con la proteína cruda inicial para observar el cambio de ésta debido al consumo por parte del microorganismo, así como a la cantidad de proteína unicelular sintetizada.

6) Identificación del producto obtenido.

Para la identificación del producto obtenido se utilizó la técnica de determinación de ácidos orgánicos por cromatografía en capa fina (7).

La muestra del producto obtenido se concentró al doble por evaporación al vacío, utilizando un rotavapor - marca Büchi.

Como muestra patrón se preparó ácido láctico al 1% en agua deionizada.

Se utilizaron cromatofolios Merck PL de sílica-gel-60 F₂₅₄ para cromatografía en capa fina. Se aplicaron las muestras en las siguientes concentraciones: ácido láctico 15 Mlt, muestra obtenida 15, 22.5 y 30 Mlt.

El sistema de solventes empleado fué butanol:ácido fórmico:agua, (4:1:5; v:v) (7).

Se reveló con amarillo de dimetilo y azul de bromo-cresol en etanol (ver anexo 7). Las manchas aparecen cafés sobre fondo café claro.

5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

1) Análisis del cogollo.

Los resultados del análisis del cogollo molido y tamizado en malla del número 60, en comparación con los reportados en la literatura (8) son:

Tabla 7. Composición del cogollo (Base seca).

DETERMINACION	OBTENIDA	REPORTADA
Humedad %	54.05	75-80
Proteína %	5.6	5.4
Fibra %	35.8	34.5
Cenizas %	6.0	5.9
Grasa %	51.47	53.2
Carbohidratos %	1.13	1.0
Azúcares %	13.0	-

Los resultados obtenidos son similares a los reportados excepto en la humedad debido al lapso de tiempo -- que transcurrió desde su cosecha hasta llegar al laboratorio, así como de su manejo.

2) Aislamiento de la cepa.

Para la identificación del microorganismo aislado se con-

sideraron los siguientes factores:

a) Se sabe que la población microbiana del yogurt - está compuesta principalmente por el Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus.

b) Las características morfológicas manifiestas de las colonias obtenidas en el medio sólido.

c) Las características morfológicas del microorganismo vistas a través del microscopio con tinción de gram,- en el cual se obtuvo la fotografía de la figura 3.

Considerando lo anterior y comparando las características del microorganismo con las encontradas en la literatura (5) y (20), se deduce que el microorganismo aislado es Lactobacillus bulgaricus.

3) Inducción del microorganismo.

Los datos obtenidos de pH y acidez durante las fermentaciones para determinar la fermentabilidad del cogollo, teniendo como patrón un medio con sacarosa, peptona y fosfato de amonio y otro medio con sacarosa y fosfato de amonio (ver anexo 3); se presentan en la tabla 8 y figura 4. Con el último medio se determinó que la peptona representa una fuente de factores de crecimiento para el microorganismo y que tales factores están presentes en el cogollo.

La concentración inicial de azúcares en cada medio-fué de 8 mg/ml.

Figura 3. Microorganismo aislado del yogurt.
(*Lactobacillus bulgaricus*).



Tabla 8. Fermentabilidad del cogollo

TIEMPO (hrs)	pH			ACIDEZ PRODUCIDA (% de ácido láctico)		
	c	p	s	c	p	s
0	5.0	5.0	5.0	0.00	0.00	0.00
8	4.6	4.8	5.0	0.023	0.00	0.00
12	4.0	4.1	5.0	0.151	0.080	0.00
24	3.7	4.8	5.0	0.203	0.135	0.00

c: medio con cogollo; p: medio con peptona; s: medio sin peptona

Con estos resultados se puede afirmar que el cogollo es fermentable por el microorganismo, mejorando las condiciones proporcionadas por la peptona.

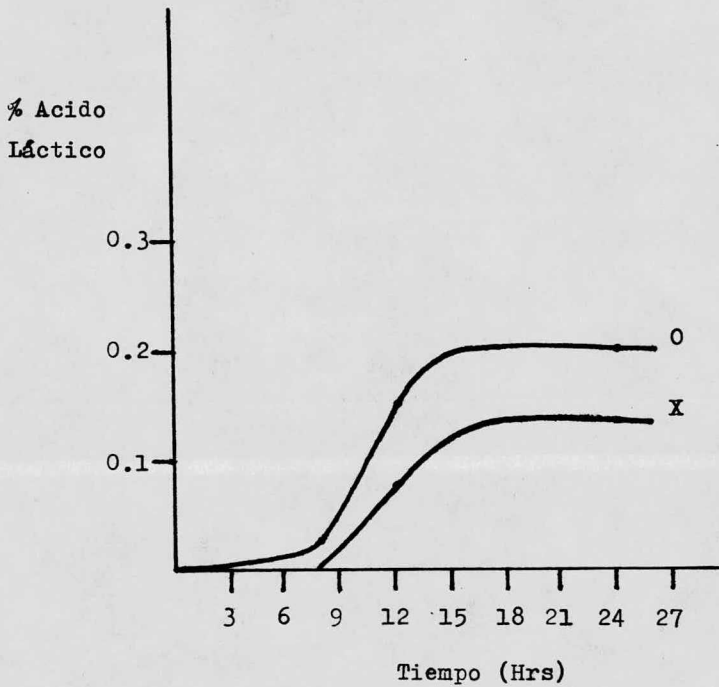
4) Pruebas de fermentación.

I) Las fermentaciones realizadas se pueden dividir en tres grupos, dependiendo de la escala manejada, i.e. - 250, 500 y 800 ml. En cada fermentación se determinó pH, acidez, concentración de azúcares y proteína.

II) Para determinar el efecto del pH, se realizaron pruebas simultáneas con y sin control automático de éste, en la escala de 500 ml.

III) Para determinar si la fuente de carbono presente en el cogollo constituye el sustrato limitante, se comparó el rendimiento de ácido láctico por un medio adicionado con melaza contra el medio de cogollo puro. Esta

Figura 4. Fermentación de 250 ml de medio con cogollo para determinar su fermentabilidad comparada con un medio patrón.



O medio con cogollo

X medio patrón

prueba se realizó en la escala de 800 ml.

1) Fermentación de 250 ml.

Esta fermentación se llevó a cabo en matr az de 500 ml, incubándola en estufa y con agitación manual intermitente. Los datos y resultados se presentan en la tabla 9 y figura 5 .

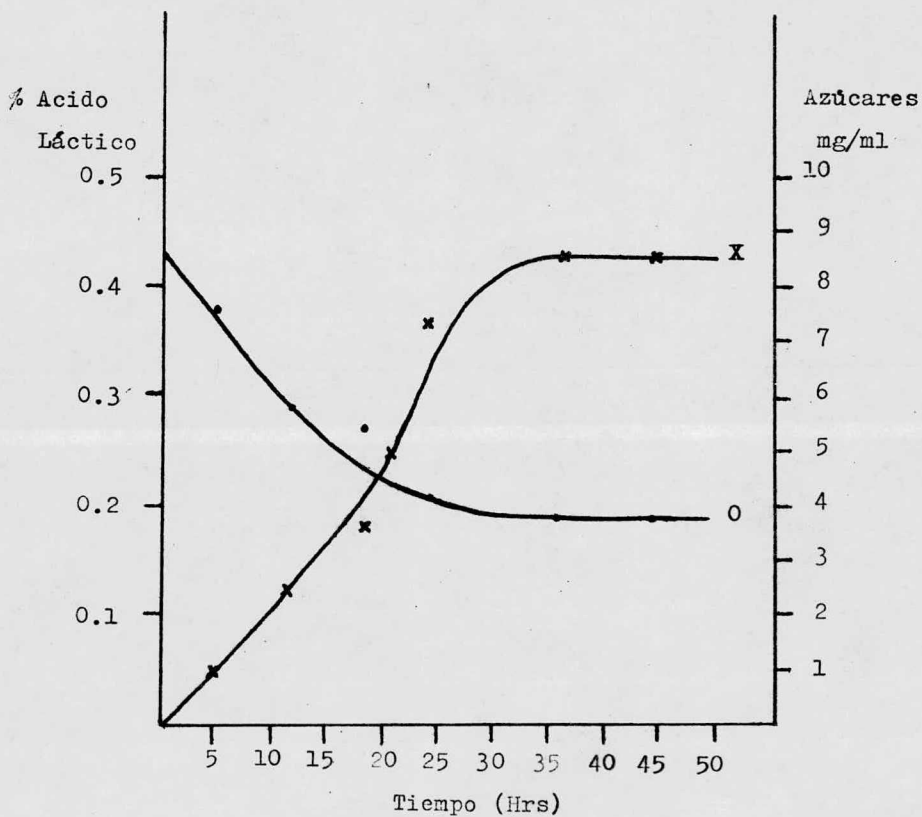
Tabla 9. Fermentación de 250 ml de medio con cogollo como sustrato microbiano.

Tiempo	pH	Acidez producida (% ácido láctico)	Azúcares (mg/ml)
0	5.0	0.00	8.6
5	5.0	0.051	7.6
12	4.7	0.136	5.8
18	4.5	0.179	5.5
21	4.2	0.252	4.5
24	3.9	0.369	4.2
36	4.0	0.432	3.8
40	4.0	0.432	3.8

$$\text{Rendimiento: } Y_{\% \text{ c. láctico}} = \frac{\text{mg de ácido láctico}/100 \text{ ml}}{\text{mg. de azúcares}/100 \text{ ml. consumidos.}}$$

$$Y = \frac{432 \text{ mg  c. láctico} / 100 \text{ ml}}{(860-380) \text{ mg azúcares} / 100 \text{ ml}} = 0.9 \frac{\text{mg.  c. láctico}}{\text{mg azúcares}}$$

Figura 5. Fermentación de 250 ml de medio con cogollo como sustrato microbiano.



X Acidéz (%ácido láctico)

O Azúcares (mg/ml)

En comparación con la fermentación de 250 ml de medio realizada en la etapa de inducción del microorganismo para determinar fermentabilidad, a esta fermentación se le adicionaron 5 ml de pie de cuba incubado durante 12 horas, (ver anexo 4). Esto justifica los resultados diferentes, apreciados en la figura 6, tanto en la fase de adaptación como en la cantidad de ácido láctico producido.

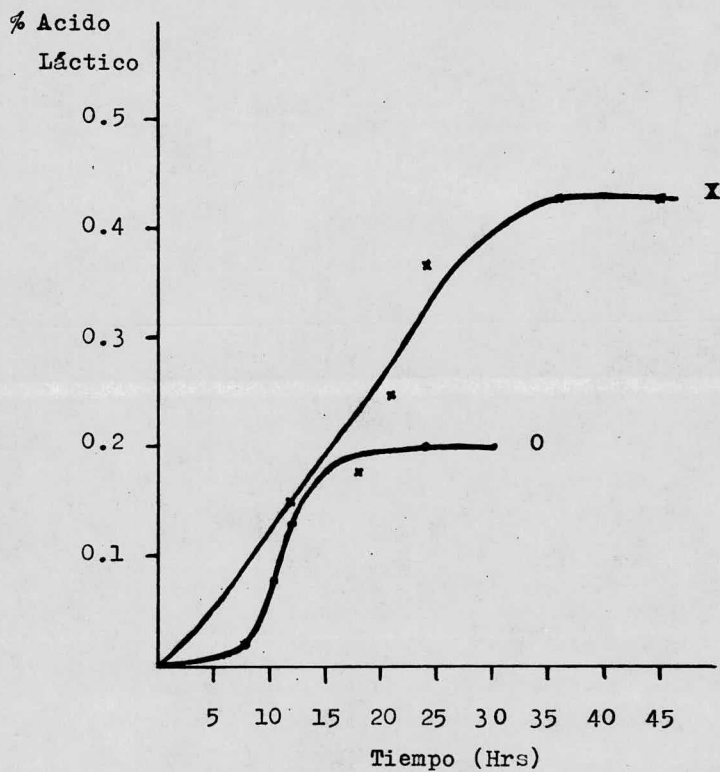
Esta escala de trabajo demuestra la necesidad de -- realizar una inoculación adecuada en términos de volumen y edad del microorganismo, ya que en la fermentación el microorganismo utiliza el sustrato principalmente para la producción de ácido láctico y no para la producción de biomasa.

2) Fermentación de 500 ml.

Se llevaron a cabo dos fermentaciones de 500 ml de medio, realizándose esto en el fermentador Bio Flo de -- New Brunswick, que cuenta con control automático de pH, temperatura, oxígeno disuelto y agitación.

Una de las fermentaciones se mantuvo a pH constante en 5 para determinar su efecto en la producción de ácido láctico. Los datos y resultados se presentan en las tablas 10 y 11, obteniendo las respectivas figuras 7 y 8, en las cuales se grafica % de acidez y concentración de azúcares contra tiempo. La diferencia entre ambas fermentaciones se puede apreciar mejor en las figuras 9 y 10,

Figura 6. Fermentaciones de 250 ml de medio con co-
gollo como sustrato microbiano con y sin
inóculo bacteriano.



X medio con inóculo bacteriano

O medio sin inóculo bacteriano

en donde se grafica la cantidad de acidez producida en la fermentación con control de pH y en la fermentación sin este, contra tiempo; y la concentración de azúcares en las mismas fermentaciones contra tiempo.

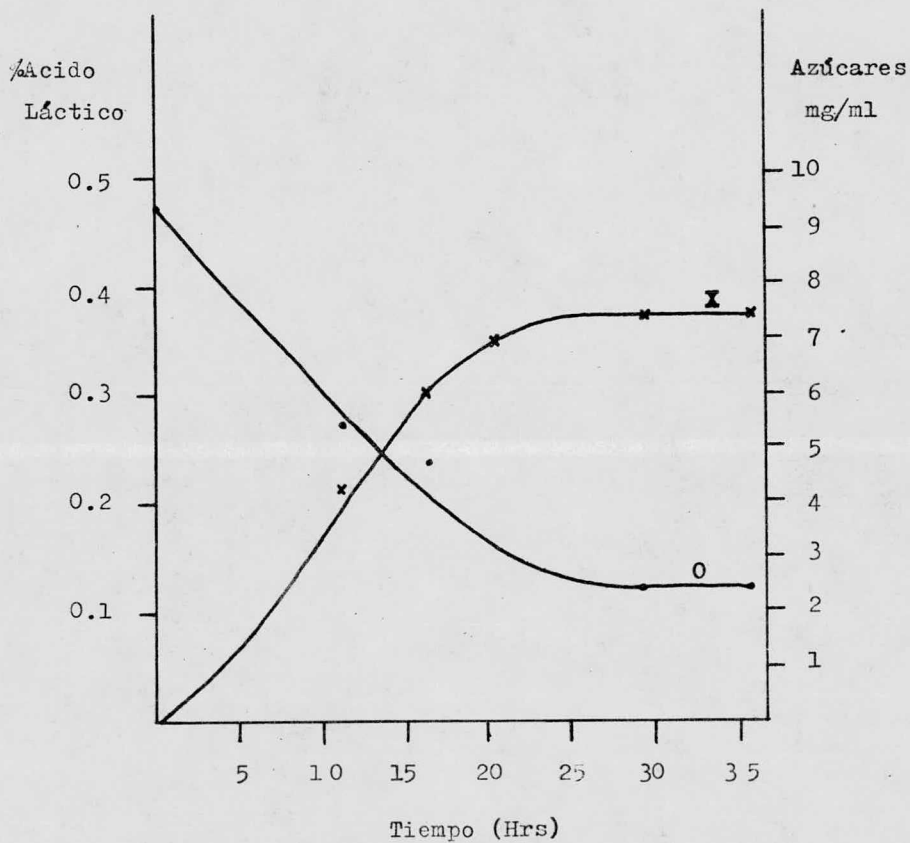
Con estos resultados podemos observar que el medio-controlado en su pH no favorece la producción de ácido láctico, ni en rapidéz de síntesis, ni en rendimiento, siendo de 0.5 mg de ácido láctico/ mg de azúcar en ambos casos; contrario a lo esperado por lo reportado en la literatura, (5).

Tabla 10. Fermentación de 500 ml de medio de cultivo con cogollo como sustrato microbiano.

Tiempo (hrs)	pH	Acidez producida (%ácido láctico)	Azúcares (mg/ml)
0	5.0	0.00	9.5
12	4.6	0.215	5.4
17	4.3	0.302	4.8
21	3.6	0.351	3.1
28	3.8	0.369	2.4
36	4.0	0.369	2.4

Y = 0.5 mg de ácido láctico/ mg de azúcares.

Figura 7. Fermentación de 500ml de medio con cogollo como sustrato microbiano.



X Acidéz (% Acido Láctico)

O Azúcares (mg/ml)

Tabla 11. Fermentación de 500 ml de medio con cogollo como sustrato microbiano, manteniendo el pH constante en 5.

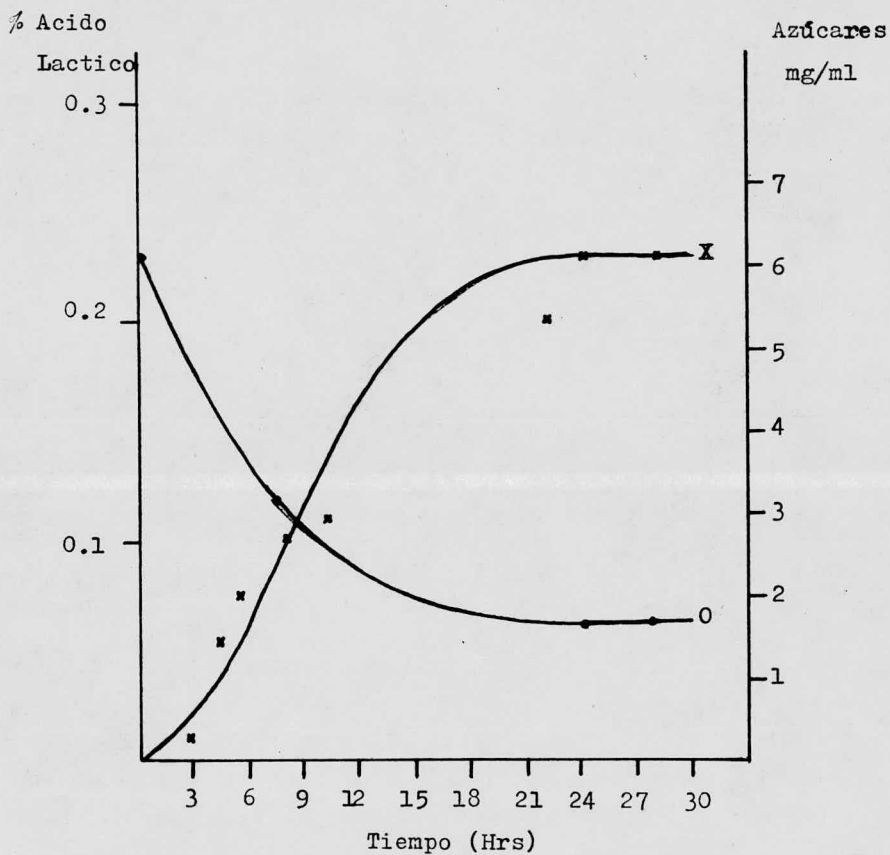
Tiempo (hrs)	NaOH (ml)	Ac.láct. (mmoles)	Conc. (mmol/ml)	% Ac. láctico	Azúcares (mg/ml)	Vol.ferm. (ml)
0:0	1.48	0.148	0.00029	0.0026	6.1	500
3:0	10.36	1.036	0.00207	0.0186	-	500
3:45	20.36	2.036	0.00407	0.0366	-	500
4:30	31.76	3.176	0.00635	0.0562	-	500
5:30	41.36	4.136	0.0083	0.0744	-	500
7:30	66.48	6.648	0.0132	0.1188	2.8	500
10:00	73.48	7.348	0.0133	0.1197	-	550
22:00	158.08	15.808	0.0225	0.2031	-	700
24:00	179.96	17.996	0.0256	0.230	1.6	700
28:00	179.96	17.996	0.0256	0.230	1.6	700

$$Y = 0.5 \text{ mg de ácido láctico/mg de azúcares.}$$

3) Fermentación de 800 ml.

En estas fermentaciones se varió la cantidad de sólidos en el medio aumentando la cantidad de cogollo hasta - 12.5g de cogollo/100ml de agua. De esta manera se alcanzó una concentración de azúcares de 18.5 mg/ml. Una fermentación se realizó con esta concentración y en otra se elevó la concentración de azúcares hasta 42 mg/ml, empleando - melazas como parámetro de ajuste. Se obtuvieron los siguientes resultados, tabla 12 y 13 y figuras 11 y 12; en

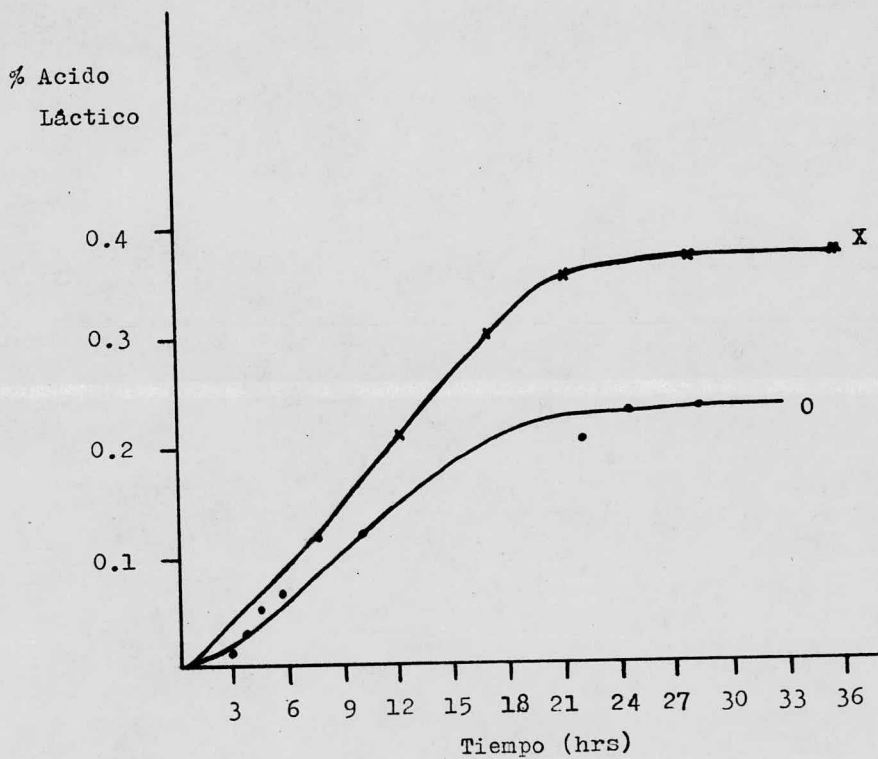
Figura 8. Fermentación de 500 ml de medio con cogollo como sustrato microbiano, manteniendo el pH constante en 5.



X Acidez (% Acido Láctico)

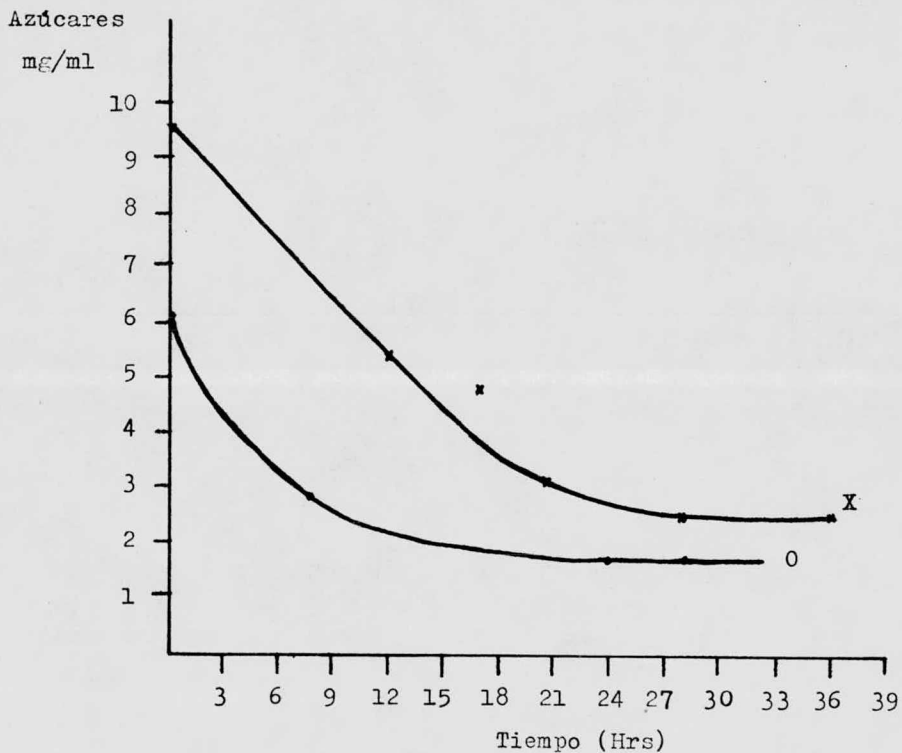
O Azúcares (mg/ml)

Figura 9. Fermentación de 500 ml de medio con cogollo como sustrato microbiano con pH controlado, comparado con medio sin control.



X Fermentación sin control de pH
O Fermentación con pH constante en 5

Figura 10. Fermentación de 500 ml de medio con cogollo como sustrato microbiano con pH controlado, comparado con medio sin control.



X Fermentación sin control de pH

O Fermentación con pH controlado en 5

las cuales se grafica \int de acidez producida y concentración de azúcares contra tiempo.

Se observa que en la fermentación con cogollo y melaza, la producción de ácido láctico no se ve incrementada, bajando considerablemente el rendimiento de este. Esto puede significar que la máxima concentración de azúcares aprovechables es de aproximadamente 20 mg/ml, siendo quizá inhididores de la fermentación la concentración de ácido láctico producido o bien la presencia en las melazas de algún compuesto que inhiba al microorganismo empleado.

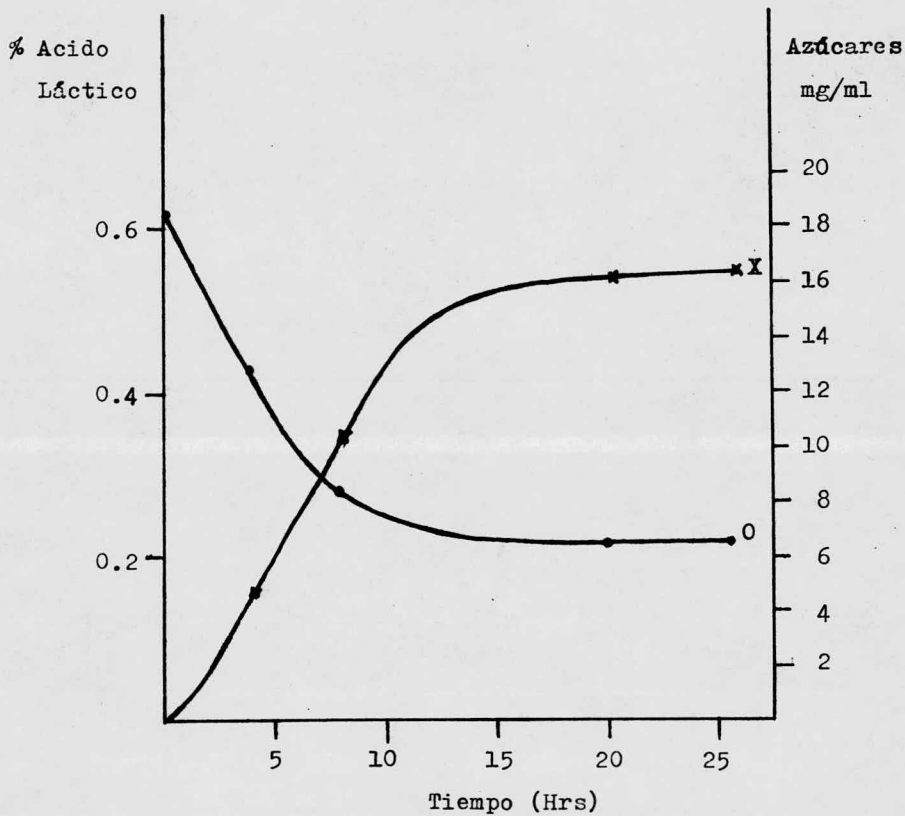
Tabla 12. Fermentación de 800 ml de medio de cultivo con cogollo como sustrato microbiano.

Tiempo (hrs)	pH	Acidez producida (% ácido láctico)	azúcares (mg/ml)
0	5.0	0.0	18.5
4	4.6	0.18	13.0
8	4.0	0.36	8.5
20	3.9	0.54	6.5
26	3.9	0.54	6.5

$Y = 0.45 \text{ mg de ácido láctico/mg de azúcares.}$



Figura 11. I) Fermentación de 800 ml de medio con cogollo como sustrato microbiano.



X Acidez (% Acido Láctico)

O Azúcares (mg/ml)

Tabla 13. Fermentación de 800 ml de medio de cultivo con cogollo y melaza con sustrato microbiano.

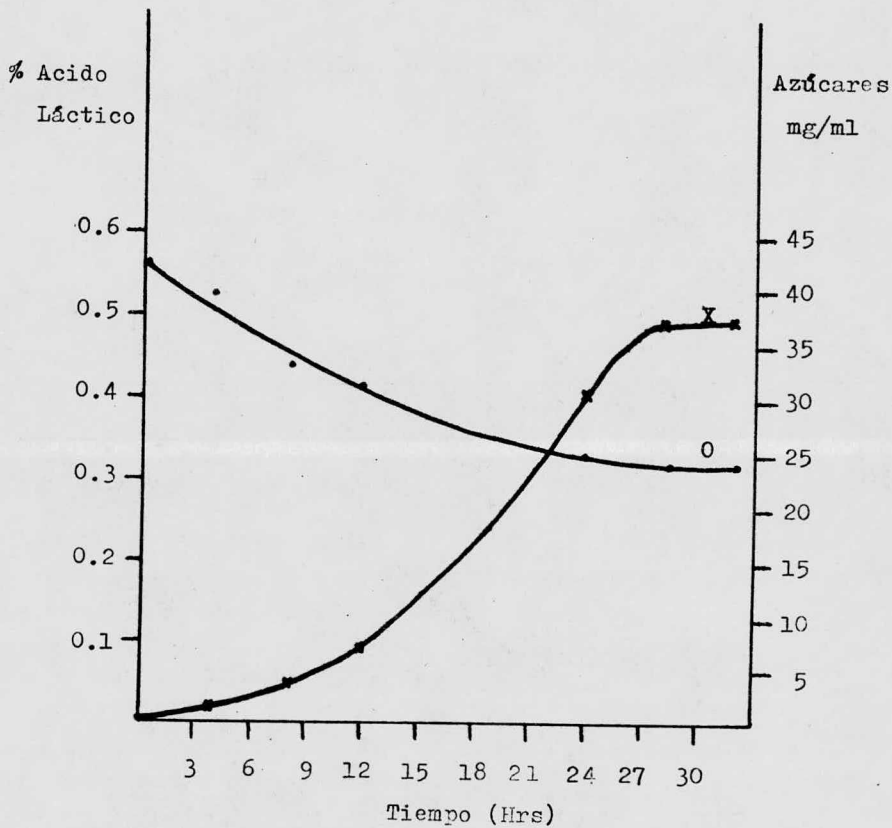
Tiempo (hrs)	pH	Acides producida (% ácido láctico)	Azúcares (mg/ml)
0	5.0	0.00	42.0
4	4.9	0.030	39.5
8	4.8	0.045	33.0
12	4.7	0.090	31.5
24	4.1	0.41	25.0
28	4.0	0.50	24.0
32	4.0	0.50	24.0

$$Y = 0.27 \text{ mg de ácido láctico/mg de azúcares}$$

Con los datos obtenidos de rendimiento ($Y = \frac{\text{mg ác. láct.}}{\text{mg azúcares}}$) en cada una de las escalas señaladas, se puede comparar la producción de ácido láctico en los resultados que se presentan en la tabla 14.

Se puede observar que el rendimiento se ve disminuido conforme aumenta el volumen de fermentación, probablemente a causa de la disminución en la transferencia de nutrientes a la célula por la deficiente homogeneidad; se observa también que el control de pH no incrementa el rendimiento y las melazas lo disminuyen debido posiblemente a la presencia de inhibidores del microorganismo empleado.

Figura 12. II) Fermentación de 800 ml de medio con cogollo como sustrato microbiano, adicionando melazas.



X Acidez (% Acido Láctico)

C Azúcares (mg/ml)

Tabla 14. Rendimientos obtenidos en las diferentes-
escalas de fermentación.

Volumen (ml)	Azúcares (mg/ml)		Acidez prod. (% ác.láct.)	Condiciones	Rendim. (<u>mg a.láct.</u>) mg azúc.
	I	R			
250	8.6	3.8	0.432	-	0.9
500	9.5	2.4	0.369	-	0.5
500	6.1	1.6	0.230	pH cte.	0.5
800	18.5	6.5	0.540	-	0.45
800	42.0	24.0	0.500	melazas	0.27

Azúcares I : Azúcares iniciales.

Azúcares R : Azúcares residuales

Los resultados de proteína del medio de fermentación con cogollo antes y después de fermentado, determinados - por Kjeldhal se presentan en la tabla 15.

Tabla 15. Proteína determinada antes y después de la
fermentación del cogollo.

	Medio sin fermentar			Medio fermentado		
	Líquido	Sólido	Mezcla	Líquido	Sólido	Mezcla
% Proteína	1.31	4.19	1.67	2.56	2.45	2.54

Mezcla = 12.5 % Sólidos + 87.5 % Líquido (% en peso).

% Proteína = % N x 6.25

Como se puede apreciar la cantidad de proteínas se incrementa después de la fermentación por la proteína unicelular sintetizada..

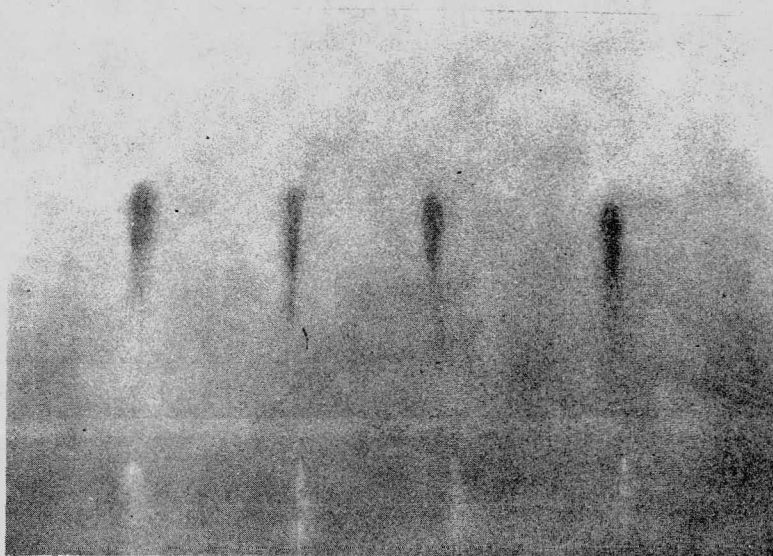
5) Identificación del producto obtenido.

Una vez revelado el cromatograma se pudo observar - que cada muestra aplicada presentaba una sola mancha, - - coincidiendo la altura recorrida por las muestras de fermentación y la muestra patrón de ácido láctico.

Se les determinó el Rf, siendo éste de 0.62. Los resultados se pueden observar en la figura 13.

Se deduce que el producto de la fermentación obtenido es ácido láctico, posiblemente se encuentran trazas - de otros productos obtenidos, pero estos no se alcanzan - a detectar en el cromatograma a las condiciones operadas.

Figura 13. Cromatografía en capa fina.



1

2

3

4

1: Muestra patrón de Acido Láctico al 1%: 15 Mlt

2: Muestra problema: 15 Mlt

3: Muestra problema: 22.5 Mlt

4: Muestra problema: 30 Mlt.

Rf = 6.2

RECOMENDACIONES

Las recomendaciones que se pueden hacer para mejorar la producción de ácido láctico, tomando en cuenta los resultados obtenidos a lo largo de la experimentación son:

- 1) Dado que el microorganismo que más se conoce en la fermentación de sacarosa (en especial de las melazas) es el Lactobacillus delbrueckii, se puede realizar una fermentación del cogollo con dicho microorganismo obteniéndose probablemente un mayor rendimiento de ácido láctico.
- 2) Debido a que las melazas no contienen sustancias tóxicas para el Lactobacillus delbrueckii se puede agregar melaza a la fermentación del cogollo, aumentando con estas la cantidad de azúcares fermentables.
- 3) Acoplar un sistema de aislamiento térmico que mantenga las condiciones de isotermedad necesaria para dicha fermentación.
- 4) Mantener el pH lo suficientemente bajo para evitar contaminación, pero cuidando que el rendimiento del ácido láctico no se vea afectado.

- 5) Llevar a cabo un estudio amplio del efecto de - las variables más importantes para la fermentación i.e. concentración inicial de azúcares, % de sólidas, frecuencia de agitación y tamaño de partícula del cogollo.
- 6) Una vez obtenidos los resultados que optimicen la producción de ácido láctico, sería interesante realizar pruebas con una población microbiana múltiple. De esta manera se podría mejorar la cantidad de proteína en el producto final evitando un detrimento apreciable del contenido de ácido láctico.
- 7) Llevar los resultados de los dos puntos anteriores a pruebas en escalas mayores (60 lts).

El éxito del proceso y su posible aplicación en lugares productores de caña, estarán condicionadas a una operación simple y económica, de acuerdo con los puntos señalados en los objetivos de este estudio.

ANEXO 1

Aislamiento de microorganismos por selección térmica en medio líquido.

Técnica de microorganismos en yogurt.

a) Medio. Repartir leche descremada 20 ml por tubo. Esterilizar 15 minutos a 115°C . La leche no debe presentar color.

b) Un yogurt marca Delsa natural.

c) Preparar 4 series de 5 tubos con leche descremada estéril numeradas del 1 al 5.

d) Sembrar el primer tubo de cada una de las dos primeras series con 5 ml de yogurt comercial, arrojar el contenido de la pipeta al tubo, aspirar el contenido del tubo y arrojarlo varias veces para homogenizar.

e) De este tubo tomar 5 ml y pasarlos al otro tubo (#2), repetir la operación hasta transferir el inóculo a el tubo número 5.

f) Llevar una serie de tubos a incubar a 35°C y la otra serie a 45°C .

g) Incubar a las dos temperaturas por 24 horas.

h) Después de las 24 horas de incubación repetir la operación indicada desde el paso d).

i) Incubar cada una de las series a las mismas temperaturas por 24 horas.

j) Después de este tiempo proceder a comprobar la identidad del microorganismo aislado.

ANEXO 2

Medio agar-tomate especial para lactobacilos (9):

Jugo de tomate (400 ml)	20 g
Bacto peptona	10 g
Bacto leche peptonizada	10 g
Bacto agar	20 g

La reacción de éste medio se ajusta a pH de 5. Para rehidratar el medio suspender 60 g del medio en 1000 ml con agua fría destilada.

Calentar a ebullición para disolver el medio completamente. Se distribuye en tubos o matraces y se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión -- (121°C).

No se adicionó leche peptonizada, en su lugar se agregó leche en polvo descremada en la misma proporción.

ANEXO 3

Composición del medio de cultivo como referencia para determinar la fermentabilidad del cogollo:

Para 250 ml de medio:

Con peptona:

Peptona	2.50 g
Sacarosa	0.95 g
Fosfato de amonio	0.245 g

Sin peptona:

Sacarosa	0.950 g
Fosfato de amonio	0.245 g

Con cogollo (% en peso):

Cogollo	7.7 g
% Sólidos	1.7%

Para 250 ml de medio con cogollo, en la primer esca
la de fermentación:

Cogollo	15.4 g
% Sólidos	3.35%

En 500 ml de medio con cogollo, en la segunda esca
la de fermentación:

Cogollo	30.8 g
% Sólidos	6.7%

En 800 ml de medio con cogollo, en la tercer esca
la de fermentación:

Cogollo	100.00 g
% Sólidos	12.5%

ANEXO 4

Composición del pie de cuba empleado en la fermentación:

Para 25 ml de pie de cuba:

Sacarosa	0.095 g
Peptona	0.250 g
Fosfato de amonio	0.0245g

Se esteriliza, se inocula con una asada de la cepa del microorganismo aislado y se incuba durante 12 horas a 37°C.

ANEXO 5

Prueba de fenol-ácido sulfúrico para azúcares totales. Método microcolorimétrico por Dubois, (1956) (3).

Se ponen 2 ml de la muestra en 6 ml de ácido sulfúrico concentrado y se adicionan 0.1 ml de fenol al 80%. Se mezcla rápidamente. Se deja desarrollar color durante 10 minutos y se lee la absorbancia a 490 nm.

El blanco se prepara con agua destilada. Para la curva estándar se prepara una solución de sacarosa en agua destilada.

ANEXO 6

Método de Lowry para determinación de proteínas por espectrofotometría. (10).

Reactivos:

Reactivo A: 40a + 1 b

a) Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N.

b) 1.- Tartrato de sodio y potasio al 2%

2.- CuSO_4 al 1 %

Estas dos soluciones (1 y 2) se mezclan 1:1 antes de usarse, debido a que si se mezclan antes se precipitan.

Reactivo B:

Reactivo Folin-Ciocalteus 1:1 en agua deionizada.

Procedimiento:

Se ponen 0.5 ml de solución problema (proteína- H_2O ; 1:1), se añaden 5 ml del reactivo A y se deja reposar - 10 minutos exactamente. Agregar entonces 0.5 ml del reactivo B y dejar reposar 30 minutos.

Leer en visible a 750 nm. El blanco se prepara con agua deionizada. Se prepara una curva patrón.

ANEXO 7

Identificación de ácidos orgánicos por cromatografía en capa fina.

Para esta identificación se utiliza sílica gel GF - 254 (tipo 60) para cromatografía en capa fina.

El sistema de solventes usado es butanol: ácido fórmico: agua (4:1:5; v:v), este sistema debe prepararse 24 - horas antes de su uso para la esterificación del ácido fórmico por el butanol hasta el equilibrio.

Los reveladores usados son:

a) Dimetilo amarillo (25 mg), Bromofenol azul (75mg) en 200 ml de etanol de 96 %, ajustado a pH de 7.0 con - - NaOH 0.1 N (=1.75 ml); se rocía el papel homogéneamente con la solución y los ácidos aparecen como manchas amarillas sobre un fondo azul morado.

b) A un gramo de xilosa disuelta en 3 ml de agua se le adiciono 1 g de anilina y se afora a 100 ml con etanol. El papel se sumerge en este líquido, se suspende para secarlo de 10 a 15 minutos. Se calienta de 105-110°C por 5-10 minutos. Se observan manchas cafés sobre fondo amarillo.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Annison, E.F. y Lewis, D. El metabolismo en el rumen. Manual UTEHA, 1966.
- 2.- Association of Official Agricultura Chemist (A.O.A. C.) Official Methods of Análisis. Washinton, D.C.
- 3.- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Robers and I. Smith, 1956, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. chem., 28; 350.
- 4.- Dunlap, C.D. y Callihan C.D.; Microbial Protein Production from Sugar Cane Bagasse. Sugar Journal; Vol 32 (2); 1960. pp 13-16.
- 5.- Frazier, W.C. Microbiología de los alimentos. Ed. - Acribia, España. pp 45-69. 1972.
- 6.- Han, Y.N., Dunlap, C.E. y Callihan, C.D. Single Cell Protein from celulosic Wastes. Food Technology ; Vol 25; 1971. pp 32-35.
- 7.- Hulme, A.C. Methods for the Determination of Organic Acids. Adv. in Apl. Microbiol. 3; 343, 1961.
- 8.- Grupo de países latinoamericanos y del Caribe exportadores de azúcar. Tecnología; Boletí No. 2 -- La Habana Cuba. 1977 abril-junio.
- 9.- Iadd, J.N. Biochemistry Journal. 67; 4, 1957.

- 10.- Lower, O.H. Rosebrough, N.J. Fall, A.L. Randall, R.J.
Protein measurement with the folin phenol reagent. J.
Biol. Chem. 193:265 (1951).
- 11.- Manual Difco of Dehidrated Culture Media and Reagents
for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures
Difco Laboratories. Michigan, 1958.
- 12.- Nelson, M.E. y Werkman, C.H.; Journal Bacteriology;
30, 547-557; 1935.
- 13.- Orskov, E.R. Manipulation of rumen fermentation for
maximum food utilization. World Review of Nutri-
tion and dietetics. Vol 22 pp 152-182. 1975.
- 14.- Pacheco Salazar V.F. Fermentación Láctica del Proceso
Biofermel. U.N.A.M. 1976.
- 15.- Patutan, J. By products of the Cane Sugar Industry.
An Introduction to their Industrial Utilization.
Elsevier, N.York. pp 203-205. 1969.
- 16.- Pérez A. R. y Verde C.R. Curso Práctico de laborato-
rio de Fermentaciones Industriales U.N.A.M. 1978.
- 17.- Prescott, S.C. y Dunn, C.G. Microbiología Industrial.
Ed. Aguilar, Madrid, pp 318-350. 1962.
- 18.- Rhodes, R.A. y Orton, W.L. Solid Substrate of Feed-
lot Waste Combined With Feed Grains. Presented
at an American Society of Agricultural Engineers
Meeting Stillwater, Oklahoma.

- 19.- E.A.R.H. Programa Nacional Agrícola, Subdirección de Planeación. Ciclo Otoño-Invierno 1977-1978.
- 20.- Sánchez Navarrete F. Materia Prima: Caña de Azúcar. Ed. Porrúa 1972 .
- 21.- Stanier, R., Doudoroff, M. y Aldelberg E. El Mundo de los Microbios. Ed. Aguilar España, 1970.
- 22.- Vázquez, E.A. Utilización de los residuos de la Industria Azucarera. Ed. Técnico Azucarero. La Habana - Cuba. pp 117-127, 157-208. 1951.
- 23.- Webb, B.H. y Johnson A.H. Fundamentals of Dairy Chemistry; The AVI Publishing Co. inc. Westport - - Conneticut. 1965.



Impresiones Lupita

MEDICINA No. 25
FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD
CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.
TEL. 548-49-79