



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO FISICOQUIMICO DE LA PRODUCCION
DE ACIDO LACTICO POR INOCULOS MIXTOS.



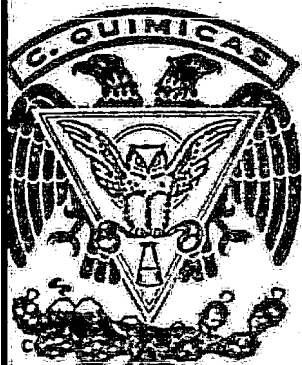
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a:

Blanca Edith Coronado Vega



México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	Páginas
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.....	1
OBJETIVO.....	13
GENERALIDADES.....	14
1. ácido láctico	14
2. Producción industrial de ácido láctico	14
3. Bacterias lácticas	17
4. Usos del ácido láctico	22
5. Estiércol	24
MATERIAL Y METODOS.....	26
1. Cromatografía de gases	29
RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	40

I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.

Los metabolitos primarios como el etanol, ácido acético y ácido láctico son productos de fermentación que tradicionalmente se producen a escala industrial empleando microorganismos bien caracterizados. Por ejemplo, para producir alcohol se emplea usualmente una levadura, a saber, Saccharomyces cerevisiae; la producción de ácido acético se hace aeróbicamente empleando una bacteria perteneciente al género Acetobacter. El ácido láctico se obtiene via fermentativa, empleando bacterias homolácticas pertenecientes al género Lactobacillus, aunque en ocasiones se emplea a un hongo filamentosos perteneciente al género Rhizopus.

Para procesos fermentativos de tipo lote, es necesario que las cepas microbianas tanto de bacterias como de hongos filamentosos, reúnan en forma mínima las siguientes características:

a).- Ser tolerantes a concentraciones elevadas de azúcares. Así tenemos que la fermentación alcohólica se lleva a cabo a una concentración de azúcar de 15%, lo cual representa una presión osmótica considerablemente alta para una célula común. Las condiciones de fermentación para la producción de ácido acético y ácido láctico son similares a las de fermentación alcohólica.

b).- Presentar una considerable tolerancia a concentraciones elevadas de producto final. Se sabe que el producto principal de la fermentación actúa sobre el microorganismo inhibiendo la utilización de azúcar adicional (Roger y Wittier, 1928; Wang et al., 1989). Así mismo, se ha reportado que la inhibición por ácidos se acentúa cuando el producto de ionización de éstos se encuentra por debajo del pKa del ácido.

Así mismo, los procesos de fermentación tanto de tipo lote como de tipo continuo, pueden verse limitados por:

1).- Costos de materias primas. Es necesario que el medio de cultivo para la fermentación sea muy sencillo de manera que los costos de producción no sean elevados. Por ejemplo, las fermentaciones generalmente se llevan a cabo empleando subproductos de la industria azucarera (como las melazas) y ocasionalmente se emplean polímeros de glucosa. Sin embargo, existen fermentaciones, como la del ácido láctico ó la del ácido propiónico que necesitan de un medio de cultivo más complejo. Así tenemos, que el medio de cultivo para la fermentación láctica requiere de la suplementación de nitrógeno proteico y de factores de crecimiento localizados en extractos de levadura o jugos frescos de plantas, como el de tomate (Rogosa et al., 1951)

2).- Costos energéticos. Los procesos de fermentación usualmente se llevan a cabo con agitación y en condiciones estériles. Esto implica el uso de sistemas sofisticados y un fuerte

consumo de energía tanto para agitación como para esterilización. Esto complica la simplicidad del proceso, por lo tanto, debe considerarse que la esterilización y agitación de grandes volúmenes de caldo de fermentación es compleja y costosa.

3).- Costos de mantenimientos de cepas. Es necesario establecer programas de selección de cepas microbianas. El desarrollo de éstos programas requiere de la participación de personal técnico especializado no solo en aislar e identificar al microorganismo deseado, sino también para el mantenimiento del microorganismo seleccionado. El desarrollo de éstas actividades se suman, naturalmente, a los costos de proceso, repercutiendo en el precio del producto.

En los últimos años se ha expandido el interés por la utilización de cultivos mixtos en los procesos fermentativos debido a que, generalmente con los cultivos mixtos se logra una productividad similar a la de los cultivos puros so- lo que las condiciones del proceso son más simples y menos costosas.

Aunque el empleo de los inóculos mixtos no se ha llevado a escala industrial, se puede comenzar a pensar en este tipo de inóculos como una alternativa para la producción de diferentes metabolitos primarios como el etanol, ácido acético, ácido butírico y ácido láctico (de la Torre y Gomá, 1981).

En realidad la literatura vertida sobre la producción de metabolitos primarios utilizando inóculos heterogéneos, se ha encaminado básicamente a la utilización posterior de estos metabolitos para la producción de gas metano (Varel et al.,1977; Robbins et al.,1979; Pipyn y Verstraete,1981). Varel et al., 1977, estudiaron la eficiencia biológica de la producción termofílica de gas metano de estiércol de bovino. Trabajaron con diferentes concentraciones de estiércol, tiempos de residencia y a altas temperaturas. Reportan que la producción máxima de metano (4.5 lt/dia/lt de reactor) se alcanza cuando la concentración de estiércol es de 8.2% de sólidos volátiles, a 60°C y 3 días de tiempo de residencia. Señalan la importancia de trabajar a altas temperaturas ya que de esta manera la digestión del estiércol es más rápida y la contaminación por microorganismos patógenos es mínima. Robbins et al.,1979, estudiaron la producción de gas metano utilizando paja de trigo como sustrato y estiércol de bovino como inóculo. Emplearon paja de trigo lignificada y delignificada. Señalan que la producción de gas metano es dos veces mayor con paja delignificada. De la misma manera, Pipyn y Verstraete,(1981) estudiaron la producción de gas metano utilizando melaza como sustrato y aguas municipales como inóculo. Llevaron a cabo la fermentación en dos fases. La primera fase bajo condiciones óptimas para la producción de ácido y la segunda fase bajo condiciones óptimas para la

producción de gas metano. Reportan que orientando la hidrólisis de la glucosa hacia la formación de ácido láctico ó alcohol se aumenta ligeramente la producción de biogas.

Sin embargo, un número reducido de laboratorios (entre ellos los de de la Torre y Gomá,1981; Gómez y Viniegra González,1981) han propuesto que mediante el empleo de inóculos heterogéneos es posible producir industrialmente metabolitos primarios. Por ejemplo, de la Torre y Gomá,(1981) estudiaron la producción de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico como metabolitos principales. Encuentran que la producción máxima de ácido acético se lleva a cabo cuando el pH de la fermentación se mantiene constante. Usaron un medio de cultivo simple y trabajaron a 28°C. Por otro lado, Datta,(1981) estudió la producción de ácidos orgánicos volátiles (C₂-C₆) a partir de granos de maíz y estiércol de bovino como inóculo. Usó bajas temperaturas (menores de 25°C) y altas concentraciones de sólidos volátiles (mayores de 2.5%) para inhibir la metanogénesis y obtener ácidos orgánicos como metabolitos principales.

Se ha estado estudiando el comportamiento del estiércol para emplearlo como inóculo y ser utilizado en diversos procesos, a saber, producción de alimentos forrajeros y producción de compuestos orgánicos. Por ejemplo, Pérez-Gavilan y Viniegra-González,(1976) propusieron y desarrollaron un tipo de fermentación láctica para la producción de alimentos forra

jeros. Usaron urea y melaza de caña como sustratos fermentables y estiércol de bovino como inóculo bacteriano. Señalan que la relación melaza/urea es determinante para la producción de ácido láctico. Reportan que la producción de ácido láctico es mayor a concentraciones bajas de melaza. Por otro lado, Gómez y Viniegra-González, (1981) indican que mediante el empleo de estiércol de bovino es posible producir ácido láctico como producto principal. Reportan el efecto de pH y tipo de fuente nitrogenada. Señalan que el control de pH más que la fuente nitrogenada son decisivos en la producción de ácido láctico.

~~Todos estos resultados obtenidos hasta ahora hacen pensar~~ que el estiércol puede tener utilidad en la industria de las fermentaciones si controlamos los procesos bioquímicos de la microflora que constituye al estiércol.

Por lo general, se piensa que los factores que orientan las fermentaciones pueden ser la fuente nitrogenada o la fuente carbonada (Nurmikko, 1956; Bryant et al., 1961; Virtanen, 1966; Pérez-Gavilan y Viniegra-González, 1976; Gómez y Viniegra-González, 1981). Por ejemplo, Nurmikko (1956) demostró que las bacterias lácticas, en simbiosis, pueden proporcionarse diversos requerimientos nutricionales básicos y que, por lo tanto, si se hacen cultivos mixtos de bacterias lácticas, la composición del medio de cultivo puede ser muy simple. De la misma manera, Bryant et al., 1961, aislaron 89 cepas del tracto digestivo de

rumiantes y encontraron que el 80% de éstas cepas crecían en medios de cultivo con fuente de nitrógeno simple como las sales de amonio. Por otro lado, Virtanen, (1966) encuentra que la microflora localizada en el rumen (y por lo tanto la localizada en las heces que provienen del rumen) pueden ser reproducidas en medios de cultivo simples conteniendo sales de amonio, pero que existe el problema de que, a partir de sales de amonio, la biosíntesis de aminoácidos es poco significativa.

En efecto, estos factores nutricionales (carbono y nitrógeno) pueden determinar los patrones de fermentación y crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, conviene señalar que la actividad metabólica microbiana no depende solamente del tipo de fuente carbonada o nitrogenada sino también de otros factores tales como:

- 1).- Concentración de sustrato. Monod(1950), demostró que la concentración de uno de los sustratos del medio de cultivo influye notablemente en la velocidad de crecimiento de los microorganismos.
- 2).- Temperatura. Existen valiosos aportes de Innis(1975), Ingraham(1954), Lynch(1975), entre otros, que señalan la marcada importancia de este factor en el crecimiento y metabolismo bacteriano. Por ejemplo, Innis(1975) señala que la temperatura de crecimiento influye notoriamente en la síntesis de proteína, actividad enzimática y en los componentes estructu-

Tales de la pared celular de los microorganismos psicrófilos. Así mismo, Ingraham (1954) demuestran que la composición de ácidos grasos cambia al cambiar la temperatura. Observó que a temperaturas elevadas aumenta la cantidad de ácidos grasos saturados. Por otro lado, Lynch (1975) trabajando con Pseudomonas demuestra que a diferentes temperaturas de crecimiento los niveles de diferentes enzimas del metabolismo de carbohidratos cambian, lo cual sugiere que a diferentes temperaturas se induce la biosíntesis de diferentes enzimas. Wittenberg y Angelo (1970) encuentran que en microorganismos tales como S. bovis y S. faecalis la actividad de la deshidrogenasa láctica disminuye a temperaturas altas.

3).- pH. Se ha reportado que el pH tiene un efecto acentuado sobre los patrones de fermentación. Los trabajos de Neish y Blackwood (1951), Neuberg y Hirsch (1919), Roger y Wittier (1928) y recientemente el trabajo de Wang et al., (1980) sobre el efecto del pH explican en parte los patrones de fermentación tanto homoláctica como heteroláctica. Neish y Blackwood (1951), Neuberg y Hirsch (1919) encontraron que la fermentación alcohólica se modificaba a diferentes valores de pH. Observaron que la concentración de etanol disminuía a medida que el valor de pH se elevaba. Roger y Wittier (1928) señalaron que conforme la concentración de hidrogeniones se elevaba, la fermentación se hacía más lenta. Así mismo señalan que

este efecto se debía fundamentalmente a los ácidos no disociados. Por otro lado, Wang et al., (1980) demuestran, mediante el efecto del pKa del ácido acético, que por debajo del valor del pKa de éste ácido (4.7), se hace más inhibitorio la fermentación acética, es decir, que en la forma protonada del ácido (la forma de sal del ácido), el efecto inhibitorio se reduce.

4).- Composición del medio de cultivo. En párrafos anteriores se señala la importancia de la composición del medio de cultivo.

La fermentación láctica es un proceso muy común en las bebidas fermentadas tradicionales de distintos países como es el caso del pulque y el pozol en México (Ulloa y Herrera, 1981), el yoghurt de Europa ó el Kempe de Africa (Muller, 1981).

El pulque es una bebida de moderación producida por un cultivo mixto constituido principalmente por Saccharomyces sp., Lactobacillus sp. y Leuconostoc sp., los cuales fermentan el jugo de Agave americana (Sánchez-Marroquin y Hope, 1953). Los productos metabólicos principales son el etanol y el ácido láctico, sin embargo la consideración más importante que se debe hacer de este producto es que los microorganismos crecen sobre un sustrato de bajo valor biológico.

El pozol es el producto de maíz macerado y enseguida fermentado por una microflora compleja. Se han descrito con detalle solo dos especies de bacterias, a saber, Bacillus cereus

y Paracolobactrun aerógenes que son los que le confieren el olor y sabor característico al pozol. Además se han mencionado algunos géneros de mohos que lo contaminan, en particular, Penicillium, Aspergillus, Rhizophus y Fusarium (Ulloa y Herrera, 1981). Suponen que la fermentación es de tipo láctica y que éste es el metabolito que predomina. Es interesante el hecho de que en el pozol hay mayor cantidad de nitrógeno total, que en los granos de maíz, por lo que puede suponerse que la masa fermentada tiene mayores propiedades nutritivas que el maíz no tratado. (Cravioto et al., 1955).

El yoghurt es un derivado lacteo de invaluable valor biológico. La elaboración de éste producto se ha venido haciendo mediante procedimientos empíricos consistentes en dejar que la leche se contamine a temperaturas entre 40 y 50°C. Los estudios básicos para hacer de este procedimiento empírico un proceso industrial se iniciaron en la primera parte de nuestro siglo por el trabajo de Metchnikoff (1907), quien identificó a Lactobacillus bulgaricus con métodos algo rudimentarios. Al poco tiempo se vio que el proceso mediante el cual se formaba el yoghurt era una fermentación láctica pero en la que estaban involucradas dos cepas microbianas, Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus. Los trabajos de Pette y Lolkema (1951) demuestran que el proceso se puede llevar a cabo a 45°C como temperatura óptima. Así mismo, señalan que la función de S. thermophilus es la de proveer una acidéz suave que permita

el ulterior desarrollo de L. bulgaricus quien hidroliza la lactosa y la caseína a pH de 5.5. En la actualidad se han establecido procesos de fermentación continua para la producción de yoghurt.

El Kempe es el producto de maíz macerado y fermentado por una microflora compleja y es uno de los principales alimentos de una gran parte de Ghana, Africa.

Por otro lado, la fermentación láctica es un proceso de marcada importancia en la preparación de alimentos forrajeros, pues aumenta la palatabilidad y mejora el olor de este tipo de productos. Pérez-Gavilan et al., 1976; Alvarez et al., 1979, entre otros, encuentran que mediante la sustitución de nitrógeno proveniente de la urea, por nitrógeno proteico, cambian los patrones de fermentación. La fermentación se hace típicamente láctica.

En general, se procura que, en los alimentos forrajeros para la alimentación de rumiantes, la fermentación sea láctica, pues este metabolito puede ser utilizado por los animales como fuente de carbono y es aquí donde reside la importancia de que la fermentación durante el ensilado de forrajes sea láctica, además de que actúa como conservador del forraje mismo.

Las fermentaciones lácticas se han llevado a escala industrial desde hace varias décadas (Prescott y Dunn, 1962), el método comúnmente usado en la industria es el de inoculación de cultivos puros usando medios esterilizados o pasteurizados y suplementados con diversas fuentes de proteína.

En México, el ácido láctico y sus sales se importan desde hace ya mucho tiempo. En 1978 su costo se elevó aproximadamente a los 7 millones de pesos. La proyección de la demanda indica que para este año se consumirán 525 toneladas, con un valor a precio actual de 40 millones de pesos.

En este sentido, este trabajo tiene como objetivo general encontrar las condiciones ambientales, bajo las cuales se puedan producir ácido láctico mediante el estudio de la composición del medio de cultivo, pH y temperatura que puedan incidir en el desarrollo de una tecnología de bajo costo y rentable empleando una fuente de microorganismos que existe en cantidades significativamente apreciables como lo es el estiércol de bovino.

II. OBJETIVO PARTICULAR

Este trabajo tiene como objetivo particular estudiar las condiciones fisicoquímicas tales como pH y temperatura, así como la composición del medio de cultivo, bajo las cuales un inóculo heterogéneo, como el estiércol de bovino, pueda ser caracterizado y orientado para producir ácido láctico.

III. GENERALIDADES.

ACIDO LACTICO

El ácido láctico se presenta en dos formas ópticamente activas, los isómeros D(-) y L(+). y en una forma ópticamente inactiva, DL. El ácido láctico formado durante la fermentación es usualmente la forma DL (una mezcla racémica) (Prescott y Duunn, 1962).

El ácido láctico tradicionalmente se produce por cultivo en lote, sin embargo, la producción de este metabolito se ha hecho también mediante un proceso continuo, pero solo en pequeños fermentadores (Hanson y Tsao, 1972), y su uso no está muy extendido debido principalmente, a los problemas de contaminación.

PRODUCCION INDUSTRIAL DE ACIDO LACTICO POR CULTIVO EN LOTE.

MICROORGANISMOS EMPLEADOS. Los microorganismos que pueden emplearse para la producción de ácido láctico por fermentación son: L. delbrueckii, L. pentosus, L. leichmannii, L. bulgaricus y S. lactis. Todos ellos son homofermentativos.

El tipo de microorganismo 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 pueden emplearse L. bulgaricus, L. casei o S. lactis siendo preferible el primero. En la fermentación de dextrosa o maltosa pueden emplearse L. delbrueckii, L. pentosus, L. bulgaricus o L. leichmannii. Para fermentar féculas hidrolizadas se emplea frecuentemente L. delbrueckii.

HIDRATOS DE CARBONO.- Para producir ácido láctico pueden emplearse gran variedad de carbohidratos. Por lo general, se emplea glucosa, sacarosa o lactosa. Las féculas de maíz y papa son hidrolizadas a maltosa y glucosa antes de la fermentación, mediante procesos enzimáticos o procesos químicos, en donde emplean valores de pH ácido y altas temperaturas (Prescott y Dunn, 1962).

En general, además del hidrato de carbono, el medio de cultivo debe contener una fuente nitrogenada compleja de tipo proteica y factores de crecimiento. En los procesos industriales son adicionados normalmente en forma de extractos, extracto de malta, suero de leche o agua de cocimiento de maíz.

TEMPERATURA DE CRECIMIENTO.- La fermentación láctica se lleva a cabo a temperaturas relativamente altas. Si se emplea L. delbrueckii, puede mantenerse una temperatura de 45°C o más; L. bulgaricus puede ser incubado de 45 a 50°C; L. pentosus, L. casei o S. lactis, alrededor de los 30°C. La temperatura óptima debe determinarse experimentalmente para cada tipo de fermentación.

CONCENTRACION DE AZUCAR.- La concentración de azúcar de los mostos se ajusta normalmente del 5 al 20%, según la naturaleza de las materias primas y las condiciones del proceso.

RELACION DE OXIGENO.- Las bacterias empleadas en la producción de ácido láctico industrial, suelen ser de naturaleza microaerófila o anaerobia.

pH.- El pH de la fermentación está dentro de la zona ácida pero cercano a la neutralidad (entre 5 y 6).

DURACION DE LA FERMENTACION.- Suele completarse la fermentación de 1 a 6 días si se parte de concentraciones que se encuentran entre el 6 y 10% de azúcar.

RENDIMIENTO.- En casi todas las variantes existentes para la producción de ácido láctico se logra un rendimiento del 80-90%.

COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO
PARA LA PRODUCCION INDUSTRIAL DE
ACIDO LACTICO A PARTIR DE AZUCAR
DE MAIZ.

Azúcar de maíz	15 %
malta germinada	0.375%
fosfato de amonio	0.25 %
carbonato de calcio	10 %

Inskeep, 1952

BACTERIAS LACTICAS.

CLASIFICACION.

La familia Lactobacillaceae, en términos generales, puede ser clasificada en bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas. Esta clasificación subjetiva se da en función de la aparición de otros productos diferentes al ácido láctico, principalmente por la aparición de etanol y ácido acético. Se dice que es homofermentativa cuando el ácido láctico en relación a los otros, en un 80%. (Doelle, 1975).

CARACTERISTICAS GENERALES DE CRECIMIENTO.

MORFOLOGIA. Las bacterias lácticas se presentan en dos formas: Coccide y de baston. Por lo general se presentan en cadenas. Tanto las formas esféricas como las de baston, son bacterias Gram +, no forman endoesporas. Raramente producen pigmentos, pero cuando este se presenta va del amarillo o naranja hasta rojo pálido o rojo ladrillo.

pH.- El pH para el cultivo de estas bacterias se encuentra entre 5 y 9. Por ejemplo, las bacterias del género Streptococcus crecen a valores de pH francamente alcalinos. Por otra parte, las formas esféricas del género Leuconostoc pueden desarrollarse en el intervalo que va de 4 a 6.5, y las formas bacilares de este género se encuentran en el intervalo ácido (de 5 a 6).

TEMPERATURA.- La temperatura de crecimiento va desde 6 a 53°C con una temperatura óptima de 30-40°C de manera que se pueden

encontrar bacterias lácticas psicrófilas, mesófilas y termófilas. El género Leuconostoc generalmente crece entre 20 y 30°C, sin embargo, las otras formas esféricas lácticas, Streptococcus se desarrollan desde 30-55°C.

RELACION DE OXIGENO.- Las bacterias del ácido láctico son de naturaleza anaerobia o microaerofílica.

FACTORES DE CRECIMIENTO.- El cultivo de las bacterias lácticas en forma pura requiere de la preparación de un medio de cultivo complejo que debe ser adicionado de nitrógeno protéico. Además de necesitar la presencia de aminoácidos en el medio de cultivo, es necesario adicionar factores de crecimiento, dentro de los cuales se pueden citar las bases púricas, pirimídicas y ácidos grasos de cadena larga. Se ha demostrado la fundamental influencia del ácido nicotínico (Kitahara y Obayashi, 1958). Por ejemplo, se demostró que Lactobacillus pentosus necesita en su medio de cultivo para crecer la presencia de biotina, ácido pantoténico y ácido nicotínico (Krueger y Paterson, 1948). Estos requerimientos usualmente se logran satisfacer usando extracto de levadura o jugos frescos de plantas, como el de tomate (Rogosa et al., 1951).

La fermentación láctica frecuentemente ocurre en sustratos ricos en proteínas como la leche y los cereales. Esta observación puede relacionarse con los requerimientos nutricionales de los cultivos puros de las bacterias lácticas arriba mencionados

En la Tabla 3-1 se muestra que prácticamente todas las bacterias lácticas requieren al menos unos cuantos aminoácidos para reproducirse, con la notable excepción de algunas cepas de Streptococcus bovis que pueden crecer en sales de amonio como fuente nitrogenada (Niven et al., 1948). En cambio las bacterias del género Lactobacillus son muy exigentes en cuanto a la cantidad de aminoácidos requeridos y esto pudiera relacionarse con su notable incidencia en la leche y otros medios naturales ricos en proteínas, tales como los vegetales en descomposición.

A su vez, las bacterias de los géneros de Streptococcus y Leuconostoc, parecen requerir pocos aminoácidos como factores de crecimiento y esto pudiera relacionarse con su gran ubiquidad en la naturaleza.

En la Tabla 3-2 se da una relación entre el tipo de microorganismo, sus fuentes de carbono y sus productos metabólicos, donde se observa que el ácido láctico es el producto metabólico principal.

METABOLISMO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS.

El metabolismo de las bacterias lácticas está orientado por la influencia de diferentes factores fisicoquímicos como la temperatura pH y concentración de sustrato. Por otra parte existen evidencias recientes de que la concentración de oxígeno presente puede dar lugar a la formación de otros productos (Brown et al., 1977). Así mismo, la reducción en la formación de ácido láctico puede deberse a compuestos como el citrato que desvía

la fermentación láctica, en cepas homolácticas, y da lugar a la formación de diacetilo o acetoina.

La formación de ácido láctico por microorganismos homofermentativos sigue la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), aunque existen excepciones (Gibbs et al., 1950).

La vía de fermentación homoláctica se muestra en la Fig.

3-1. Cabe señalar que se forman 1.8 moles de ácido láctico por mol de glucosa convertida, lo cual sugiere que son formados productos diferentes al ácido láctico.

Algunos autores encuentran que un factor determinante que puede influir en el mantenimiento de la relación de productos, en la que el ácido láctico sea el metabolito predominante, es la concentración de FDP pues se ha visto que es un efector positivo en la activación de la deshidrogenasa láctica (Wittenberg y Angelo, 1970). Niveles bajos de esta enzima favorecen la formación de ácido acético y negativamente sobre la oxidación de ácido láctico (London, 1968). En la Fig. 3-1 se describe una enzima que juega un papel muy importante en la vía láctica homofermentativa, a saber, la fructosa difosfato aldolasa.

Las bacterias heterofermentativas (Leuconostoc, algunas especies de Lactobacillus y Bifidobacterium) entre otros, metabolizan el azúcar a través de dos vías parecidas a la trayectoria de las pentosas conocida como Warburg-Dickens o hexosa monofosfato (HMF), e incluso se consideran como ramificaciones

de esta vía. A la vía heterofermentativa se le conoce como vía de la pentosa fosfocetolasa y hexosa fosfocetolasa. La vía de la pentosa fosfocetolasa puede utilizar tanto hexosas como pentosa como azúcares según se ve en la Fig. 3-2. En ella se observa que la utilización de las pentosas se lleva a expensas de ATP por medio de una fosfotransferasa pues este grupo bacteriano no carece de la transcetolasa de la vía HMF. La fosfocetolasa interviene en esta vía hidrolizando a la D-Xilulosa 5P a gliceraldehído 3P y acetyl fosfato. Esta reacción requiere tiamina pirofosfato y fósforo inorgánico. La acción de la enzima fosfocetolasa es dependiente de TPP y Mg^{2+} , es estimulada por compuestos SH, y es irreversible. El género Leuconostoc, es el grupo bacteriano que posee esta vía donde los productos finales de fermentación son etanol, CO_2 y ácido láctico (Deley, 1962).

La vía hexosa fosfocetolasa típica de Lactobacillus bifidus se muestra en la Fig. 3-3. Estos microorganismos carecen de las enzimas fructosa difosfato aldolasa y glucosa 6P deshidrogenasa, por lo tanto no pueden seguir la vía EMP ni la vía HMF. Al igual que en la trayectoria de la pentosa fosfocetolasa, en esta vía la enzima clave es la fosfocetolasa, la cual es dependiente de TPP y Mg^{2+} y tiene como sustrato específico a la D- Xilulosa 5P.

En este esquema la enzima rompe la fructosa 6P a eritro

sa 4P y acetil fosfato. Posteriormente, la eritrosa 4P es finalmente hidrolizada a gliceraldehido 3P y acetil fosfato. En esta via no se libera CO_2 y el metabolito predominante es el ácido acético.

Desde el punto de vista de formación de ATP, la via de la fosfocetolasa se comporta similarmente a la via HMF. La producción neta es de una mol de ATP.

En general, las dos vias de la fosfocetolasa, son desde el punto de vista enegético, menos eficientes que la fermentación homoláctica, pues en esta via se obtienen dos moles de ATP por mol de hexosa consumida.

USOS DEL ACIDO LACTICO

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. Se emplea la calidad comestible en confitería y fabricación de extractos, escencias y zumos de frutas, limonadas, jarabes y otros productos. También se emplea en el curado de la carne y en las conservas de pescado y vegetales.

En las coles ácidas actúa como preservativo de la putrefacción. Se emplea también para acidular los extractos de malta en la manufactura de cerveza, para ajustar la acidéz de la salmuera de las aceitunas, en la fabricación de bebidas efer

vescentes. Se emplea también en el proceso industrial de la producción de proteína unicelular para inhibir el crecimiento de las bacterias del ácido butírico (Prescott y Dunn, 1962).

Dentro de la industria química se emplea en el teñido de telas y otros textiles, como mordientes en el estampado de la lana, en la preparación de cueros, en el curtido vegetal y como fundente en las pastas de soldar.

También los lactatos tienen usos importantes. El lactato cálcico se emplea en los polvos de repostería, en la panificación y en productos farmacéuticos. El lactato de hierro se emplea en farmacia, el lactato sódico para ayudar a retener la humedad en algunos productos como el tabaco.

Por otro lado, algunos derivados del ácido láctico también son de gran importancia (Tabla 3-3).

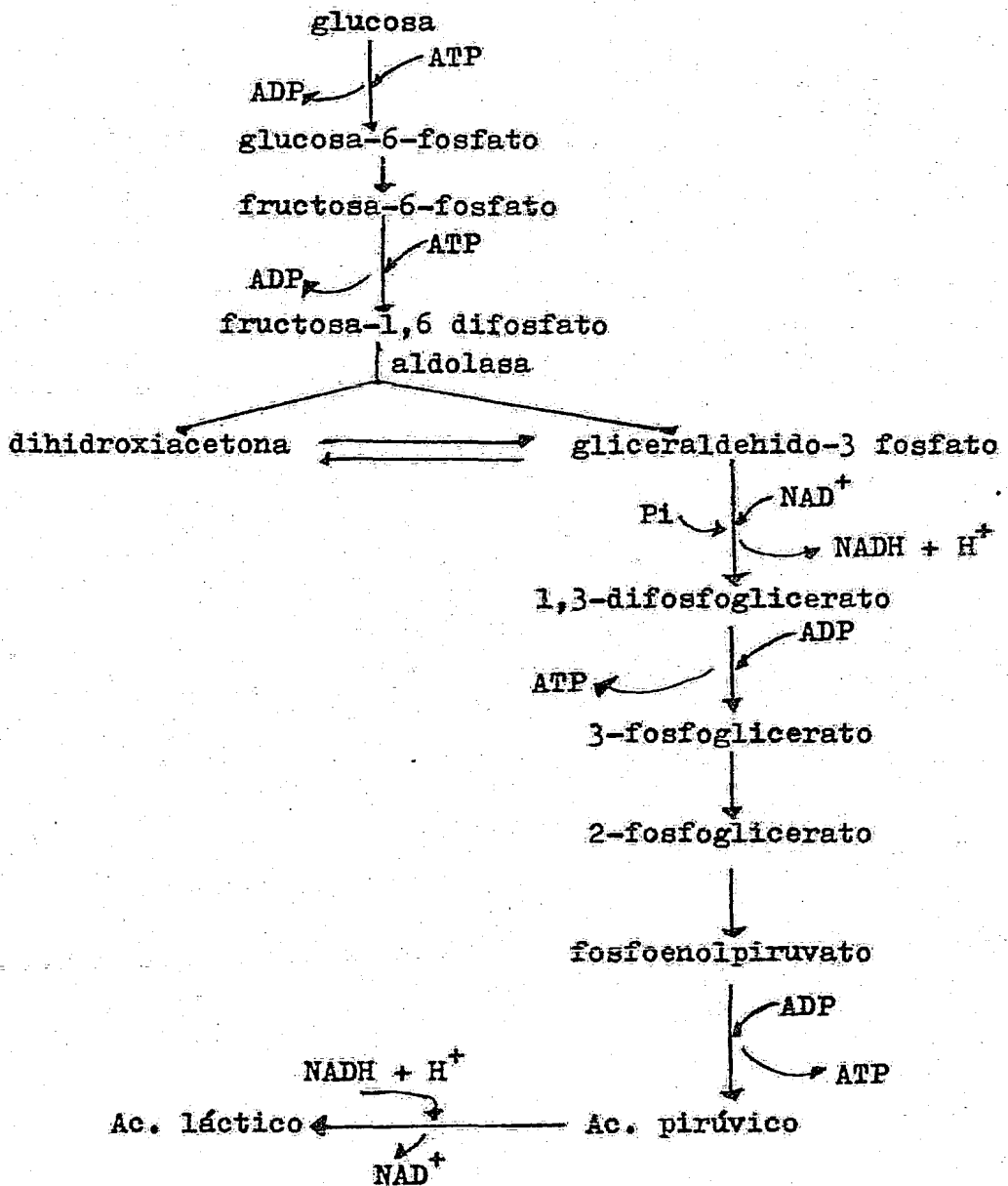


Fig. 3-1 Formación de ácido láctico por bacterias lácticas homofermentativas.

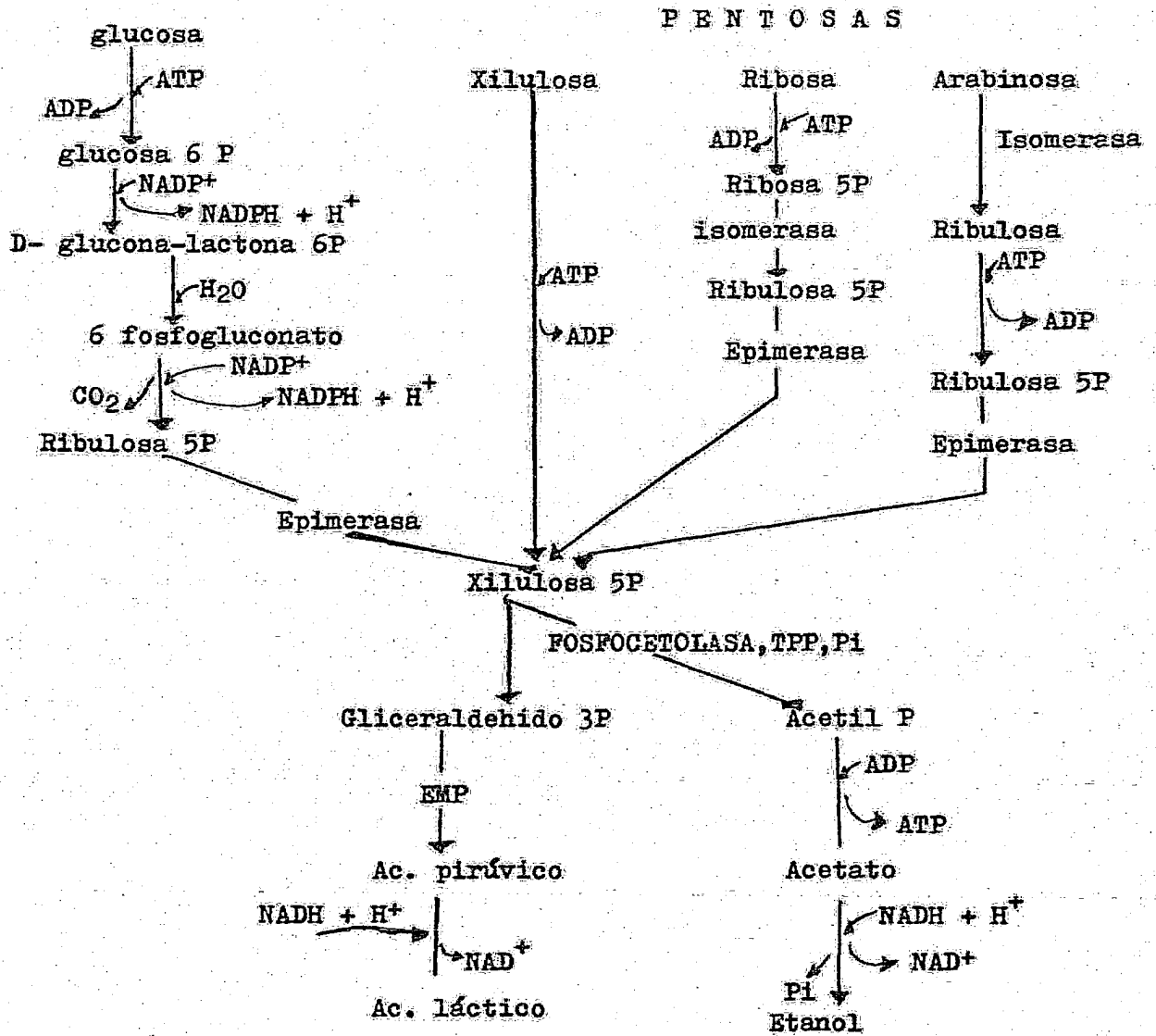


Fig. 3-2 Heterofermentación de Bacterias Lácticas por la vía de la Pentosa Fosfocetolasa.

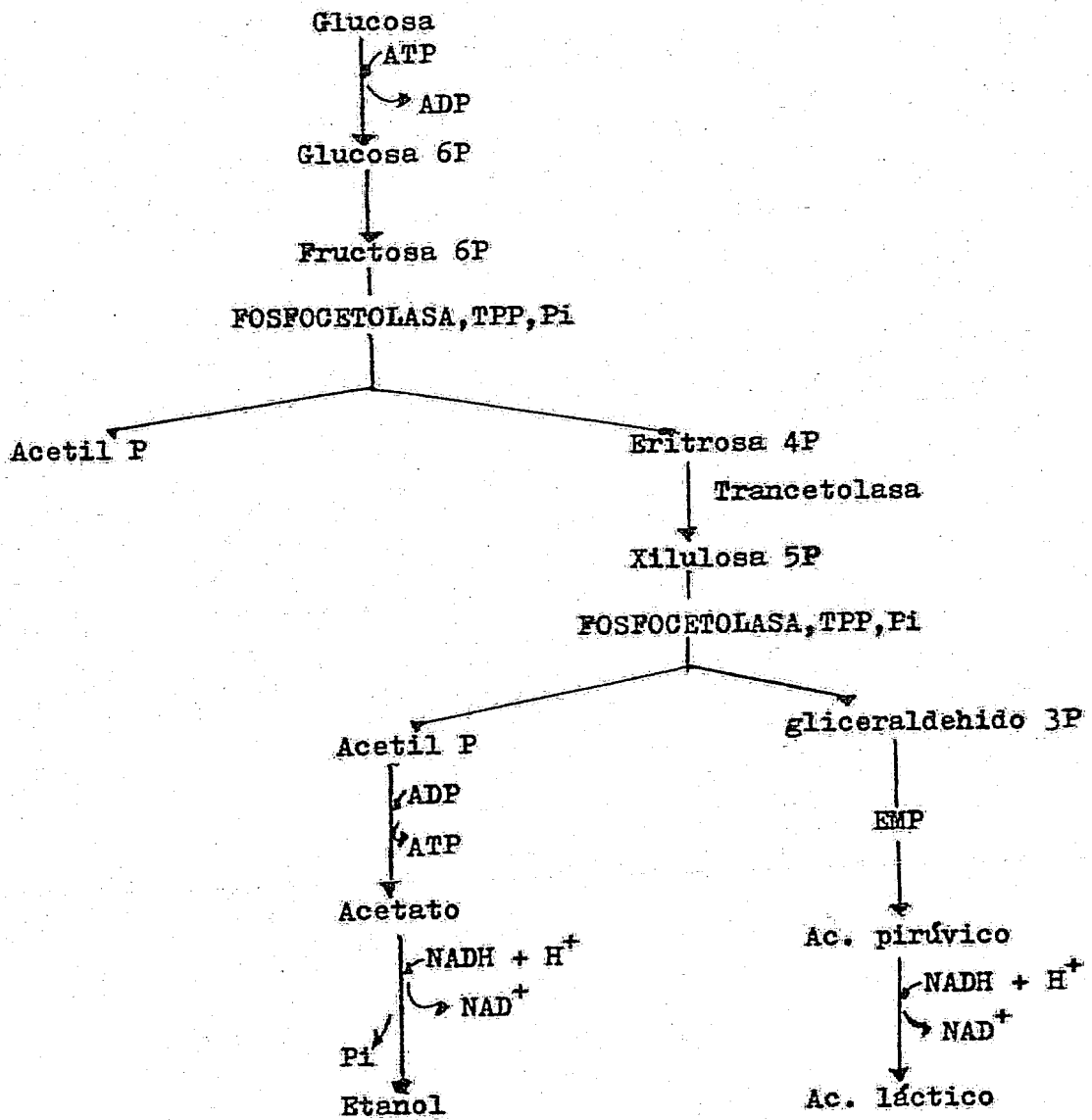


Fig. 3-3 Vía de la Hexosa Fosfocetolasa seguida por bacterias con fermentación heteroláctica. (Género Bifidobacterium)

Tabla 3-1 AMINOACIDOS ESCENCIALES PARA CULTIVOS PUROS DE ALGUNAS BACTERIAS LACTICAS.

MICROORGANISMO	NUMERO DE AMINOACIDOS ESCENCIALES	FUENTE NATURAL
HOMOFERMENTATIVOS:		
<u>Lactobacillus:</u>		
<u>acidophilus</u>	6	leche
<u>casei</u>	8	leche
<u>delbrueckii</u>	14	leche
<u>leichmanii</u>	11	leche
<u>Streptococcus:</u>		
<u>bovis</u>	0-3	sistema digestivo de rumiantes.
<u>cremoris</u>	9	leche
<u>lactis</u>	7	leche
HETEROFERMENTATIVOS:		
<u>Lactobacillus:</u>		
<u>buchneri</u>	13	leche, ensilados, heces humanas y bovinas.
<u>brevis</u>	15	leche, col agria.
<u>fermentum</u>	12	leche
<u>Leuconostoc:</u>		
<u>dextranicum</u>	3-8	leche, vegetales fermentados.
<u>mesenteroides</u>	4-5	soluciones de azucar, leche, frutas, vegetales.

Tabla 3-2. Bacterias Lácticas, sus fuentes de Carbono y sus productos metabólicos principales.

Microorganismo	Dextrosa	Lactosa	Sacarosa	Celobiosa	Xilosa	Ac. Acético	Ac. Láctico	Etanol
<u>Streptococcus bovis</u>	+	+	+	-	+	+	+	-
<u>S. thermophilus</u>	+	+	+	-	-	-	+	-
<u>S. lactis</u>	+	+	-	+	-	-	+	-
<u>S. cremoris</u>	+	+	-	-	-	+	+	-
<u>Leuconostoc mesenteroides</u>	+	+	+	+	+	+	+	-
<u>L. dextranicum</u>	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>L. paramesenteroides</u>	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>L. lactis</u>	+	+	+	-	-	-	+	+
<u>L. cremoris</u>	+	+	-	-	-	-	+	+
<u>Lactobacillus lactis</u>	+	+	+	-	-	-	+	+
<u>L. bulgaricus</u>	+	+	-	-	-	-	+	-
<u>L. jensinii</u>	+	-	+	+	-	-	+	-
<u>L. casei</u>	+	+	+	+	-	+	+	-
<u>L. plantarum</u>	+	+	+	-	-	+	+	-
<u>L. brevis</u>	+	-	-	-	+	+	+	+

Buchanan y Gibbon, 1974

Tabla 3-3. DERIVADOS DEL ACIDO LACTICO Y SUS USOS.

DERIVADOS	FORMULA	USO
Lactato de antimonio	$(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_3\text{Sb}$	como mordiente en tintoreria.
Lactato de calcio	$(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_2\text{Ca} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	calcioterapia.
Lactato de cobre	$(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_2\text{Cu} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	baños galvánicos.
Lactato de hierro	$(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_2\text{Fe} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	tratamiento de la anemia.
Lactato de sodio	$(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})\text{Na}$	plastificante y humectante.
Lactato de estroncio	$(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_2\text{Sr} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	productos farmacéuticos.
Lactato de n-butilo	$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	disolvente para lacas
Lactato de etilo	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOCH}_2\text{CH}_3$	disolvente y lubricante
Lactato de metilo	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOCH}_3$	producto intermedio industrial.

Prescott y Dunn, 1962

ESTIERCOL.

DEFINICION.- El estiércol es el producto que se obtiene de la fermentación anaeróbica, que se lleva a cabo en el intesti- no, de los residuos alimenticios no utilizados por el rumian- te (Hungate, 1966).

PRODUCCION DE ESTIERCOL DE BOVINO EN MEXICO. El estiércol de bovino es un residuo agropecuario abundante pues se estima que en México existen 30 millones de cabezas de ganado que en pro- medio producen 55 millones de Kg. de estiércol diario a razón de 2 Kg/dia/animal, lo cual representa una producción anual - de 20.44 millones de toneladas, siendo esta cifra la que co- loca al estiércol entre los subproductos orgánicos de mayor vo- lumen.

COMPOSICION QUIMICA DEL ESTIERCOL DE BOVINO. Es obvio que la composición del estiércol esta influenciada por varios facto- res, siendo el principal el tipo de la ración y su digestibi- lidad, otros factores que la afectan son la edad del ganado y el estado general del animal.

La composición química del estiércol encontrada por va- rios autores fué recolectada por Albin (1971) y se reproduce en la Tabla 3-4, donde se muestra que la máxima cantidad de proteína (N X 6.25) corregida por la humedad es de 19.5% y la mínima es de 1.87%.

Recientemente Rhodes y Orton (1974) mencionan algunas ca

racterísticas del estiércol, como la de que el nitrógeno se encuentra soluble en un 70%, del cual el 20% esta en forma de proteína y el 30% en forma de urea y amoniaco. La proteína está representada por células vivas teniendo éstas capacidad de sintetizar proteína microbiana a partir de una fuente de nitrógeno no protéico (urea u otros compuestos).

MICROFLORA DEL ESTIERCOL. No han sido plenamente identificados los grupos bacterianos que constituyen al estiércol pero, pruebas parciales de identificación señalan la presencia de cocos y bacilos Gram + así como una gran cantidad de levaduras.

USOS DEL ESTIERCOL.

El uso principal de este desperdicio es el que se le da como abono para la agricultura. Sin embargo, actualmente se ha estado utilizando en la producción de gas metano (Varel et al., 1977; Robbins et al., 1979; Pipyn y Verstraete, 1981). También se ha estado utilizando como inóculo de fermentación en la producción de alimentos forrajeros (Pérez-Gavilan y Viniestra-González, 1976)

Tabla 3-4 CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL ESTIERCOL DE BOVINOS.

peso de los animales (kg)	% Humedad	Nitrogeno en por ciento	Fósforo en por ciento	Potasio en por ciento
364	68	1.0	0.18	0.54
454	68	0.9	0.09	0.44
---	liquido	0.24-0.6	0.09-0.25	0.14-0.28
---	80	0.7	0.2	0.45
432	85	0.5	---	---

Albin, 1971

IV. MATERIAL Y METODOS.

Medios de Cultivo.

La composición de los medios de cultivo se indica en las Tablas 4-1 y 4-2. La fuente de nitrógeno en un caso es proteíca (Medio I), y en el otro es inorgánica (Medio II). En ambos medios se mantiene una relación C/N = 4.

Todos los reactivos utilizados son J.T. Baker, excepto la peptona (Bioxon) y las vitaminas (Viterra Plus y Calanda).

Las vitaminas se prepararon disolviendo una cápsula de vitaminas Calanda y otra de Viterra Plus, en 25 ml. de agua destilada con agitación durante 5 min. (en vortex Genie, modelo K-550). Enseguida se centrifugaron a 1000 rpm (en centrifuga Sol-Bat) durante 5 min., y se añadió 1 ml de sobrenadante por cada 100 ml. de medio preparado.

Amortiguadores

De acuerdo a la región de pH estudiada, se añadió al medio de cultivo, una cantidad equivalente a 0.25 M de ácido succínico (entre 4 y 5.5); Fosfato monosódico (entre 6 y 7.5); Tris (entre 8 y 8.5) y Glicina (9.0)

Inóculo

Los inóculos consistieron de 10 g de estiércol proveniente de vacas lecheras Holstein, alimentadas con una dieta de maíz y pastura la cual fué variada durante todo el tiempo que duró este trabajo, por cada 100 ml de medio de cultivo, ino-

culados en condiciones no estériles.

EFEECTO DE pH Y FUENTE NITROGENADA.

Los matraces con los diferentes medios (I y II) se ajustaron a diferentes valores de pH entre 4 y 9 a intervalos de 0.5 unidades de pH. El ajuste se hizo adicionando NaOH 3N ó HCl 3N.

EFEECTO DE VITAMINAS.

Después de encontrar el pH óptimo para cada fuente de nitrógeno, los matraces con los diferentes medios se ajustaron al pH óptimo encontrado y se suprimieron las vitaminas. Se hicieron controles los cuales llevaron todos los componentes de los medios.

EFEECTO DE CO₂

Los matraces con los diferentes medios se ajustaron a su pH óptimo respectivo, se les suprimieron las vitaminas y al momento de incubar no se les burbujeó CO₂. Se hicieron controles los cuales llevaron todos los componentes de los medios, y además se les burbujeó CO₂ al momento de incubar.

EFEECTO DE TEMPERATURA.

Los matraces con los diferentes medios se ajustaron a su pH óptimo respectivo y se incubaron a diferentes temperaturas que fueron desde 30 a 55°C a intervalos de 5°C.

En todos los casos, la máxima fluctuación de temperatura fué de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ para un período de 24 horas. La temperatura de incubación fué de 37°C . Al momento de incubar y cuando se tomaron las muestras se burbujeó CO_2 . Las muestras fueron tomadas a las 0, 5, 11, 25, 35 y 48 horas a partir de la inoculación. La agitación mecánica se llevó a cabo a 200 rpm aproximadamente.

EXAMEN CUALITATIVO CELULAR.

Se tomaron muestras al inicio y final de cada experimento. De estas muestras se prepararon ~~frotis~~ , se hizo coloración de Gram y se hicieron observaciones al microscopio.

CUANTIFICACION DE LAS MUESTRAS.

Los productos de fermentación fueron cuantificados por cromatografía de gases a los tiempos asignados variando la técnica de Cottyn y Bouque (1968) que consiste en tratar 5 ml de la muestra con 0.6 ml de una mezcla de ácido fosfórico con centrado y ácido fórmico al 25% en proporción 3:1. A continuación las muestras se agitan y se centrifugan a 4000 rpm durante una hora y se conservan tapadas entre 3 y 4°C hasta el momento de su lectura.

Para la determinación de alcohol y ácidos grasos volátiles se toman 3 microlitros directamente de la muestra para la inyección al cromatógrafo.

Para la determinación de ácido láctico y ácido succínico, se prepararon los estándares junto con las muestras de la si-

guiente manera:

A un ml de la muestra se le agregan 0.6 ml de ácido sulfúrico al 50% V/V y 3 ml de metanol absoluto. Enseguida la muestra se incuba durante una hora a 55°C (Termo agitador Haake E12).

Transcurrido el tiempo de agitación, se dejan enfriar y se les agrega un ml de agua destilada y se agita en vórtex durante un minuto. Enseguida se les adiciona un ml de cloroformo y se agita de nuevo en vórtex durante un minuto. Se dejan separar dos fases. Se toma de la fase clorofórmica (3 microlitros) para la inyección al cromatógrafo.

CROMATOGRAFIA DE GASES

En todos los casos se midió por cromatografía de gases (Varian, 1400), alcohol, ácidos grasos volátiles (AGV'S), ácido láctico y ácido succínico empleando una columna de acero inoxidable de 1.60 metros, empacada con Cromosorb W 60/80 y como fase estacionaria ácido fosfórico al 2% y tween 80 al 20%. La fase móvil fué nitrógeno. El detector empleado fué el de ionización de flama. La cuantificación se hizo en un integrador digital (Varian CDS 111).

Las condiciones de cromatografía para alcohol y ácidos grasos volátiles fueron: Temperatura inicial, 80°C variada en una proporción de 12°C por minuto. Temperatura final. 130°C. Atenuación, 32×10^{-10} .

Las condiciones de cromatografía para ácido láctico y ácido succínico fueron: Temperatura inicial, 90°C variada en

una proporción de $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Temperatura final, 130°C ; atenuación, 4×10^{-9} .

La calibración se hizo por medio de estándares. Todos los experimentos se hicieron por triplicado y se trabajó con un error estándar no mayor de $\pm 5\%$.

Tabla 4-1 COMPOSICION DEL MEDIO I DE CULTIVO PARA INOCULOS MIXTOS (ESTIERCOL).

REACTIVO	CANTIDAD (g/100)
peptona	1.87
glucosa	3.0
sulfato de magnesio heptahidratado	0.1
fosfato monobásico de potasio	0.1
cloruro de sodio	0.2
vitaminas*	1.0 ml

* Ver la preparación en el inciso de Medios de Cultivo dentro de Material y Métodos.

Tabla 4-2 COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO II PARA INOCULOS MIXTOS(ESTIERCOL).

REACTIVO	CANTIDAD (g/100)
sulfato de amonio	1.4
glucosa	3.0
sulfato de magnesio heptahidratado	0.1
fosfato monobásico de potasio	0.1
cloruro de sodio	0.2
vitaminas	1.0 ml.

V. RESULTADOS Y DISCUSION.

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se trabajó con un error estándar de $\pm 5\%$.

EFEECTO DE FUENTE NITROGENADA.

En las Figuras 1 y 2 se muestran la cinética de la fermentación láctica con diferentes fuentes de nitrógeno. En la Fig. 1 se muestra la cinética de la fermentación láctica usando tanto peptona como sulfato de amonio como fuentes nitrogenadas y a pH de 6.5, el cual se mantiene constante durante la fermentación. En ella se observa que la concentración máxima de ácido láctico (1.4 g%) se alcanza aproximadamente a las 12 horas de fermentación cuando la fuente nitrogenada es peptona y, a las 24 horas de fermentación cuando la fuente nitrogenada es sulfato de amonio y, que éste es el único producto obtenido bajo estas condiciones. En la Figura 2 se muestra la cinética de la fermentación láctica usando tanto peptona como sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno y a pH no constante de 6.5. En esta gráfica se observa que cuando el pH no se controla durante la fermentación se obtiene una mezcla de productos como son el ácido láctico, etanol, ácido acético y ácido propiónico. Además, los niveles alcanzados de ácido láctico son menores que en el caso donde el pH se mantiene constante.

Los resultados mostrados en estas Figuras, son similares a los reportados por Anthony, (1970) y Pérez-Gavilán y Viniegra-González, (1976). Ellos trabajaron con forrajes fermenta-

dos con diferentes fuentes de nitrógeno y sin control de pH. Encontraron que, cuando utilizaban urea como fuente de nitrógeno predominaba el etanol, ácido acético y ácido propiónico, por el contrario, cuando utilizaban proteína la fermentación era láctica.

Shida et al., 1975, demostraron que la composición del medio y la suplementación con nutrientes influye notablemente sobre la fase de retardo de la curva de crecimiento bacteriano. Señalan, que cuando el medio de cultivo es adicionado de proteína, la fase de retardo de la curva de crecimiento bacteriano se reduce y, cuando el medio es adicionado de sulfato de amonio la fase de retardo es mayor. Este efecto de la composición del medio de cultivo se puede apreciar claramente en las Figuras 1, 2, 6 y 7.

Una posible explicación de estos resultados podría ser, el hecho de que, cuando a un microorganismo lo ponemos en un medio rico (Medio I), éste ya no tiene que sintetizar sus nutrientes (aminoácidos) puesto que la proteína se los esta proporcionando. De esta forma el microorganismo empieza a reproducirse y crecer para posteriormente producir el ácido láctico, lo que se traduce en una fase de retardo más corta. Por el contrario, cuando el medio de cultivo es mínimo (Medio II), el microorganismo tiene que empezar a fabricar sus aminoácidos para su reproducción y crecimiento, por lo tanto, la concentración máxima de ácido láctico se alcanzará en un tiempo más largo.

EFEECTO DE pH Y FUENTE NITROGENADA.

En la Figura 3 se muestra el perfil de pH de una fermentación de glucosa con peptona como fuente de nitrógeno. Los productos se midieron a las 35 horas de fermentación. Se observa que a valores bajos de pH el producto metabólico principal es el etanol y, a medida que el valor de pH es mayor, el producto principal es el ácido láctico. La concentración máxima de ácido láctico (2.2 g%) se alcanza a valores de pH francamente alcalinos.

En la Figura 4 se muestra el perfil de pH de la fermentación de glucosa con sulfato de amonio como fuente nitrogenada. Como en el caso anterior los productos se midieron a las 35 horas de fermentación. En ella se observa que el etanol aparece en forma significativa a valores de pH bajos cuando se emplea nitrógeno inorgánico, y el nivel máximo alcanzado es mayor que cuando se emplea peptona como fuente nitrogenada. El nivel máximo alcanzado de ácido láctico es menor que en el caso donde se emplea peptona como fuente nitrogenada.

Existen muchas evidencias de que el tipo de fuente nitrogenada es un factor limitante para la fermentación láctica. Por ejemplo, los trabajos de Nurmiikko, (1956); Bryant *et al.*, (1961); Virtanen, (1966) y Pérez-Gavilán y Viniegra-González, (1976), señalan los cambios que sufren los patrones de fermentación en el tracto digestivo de rumiantes cuando sus dietas son adicionadas de proteína. Por otro lado, Gómez y Viniegra-González, (1981), señalan que el pH también es un factor limitante en la fermentación láctica. Demostraron que, independientemente de

la fuente nitrogenada, a valores de pH cercanos a la neutralidad el producto principal es el ácido láctico. Los resultados mostrados en las Figuras 3 y 4, difieren a los reportados por Gómez y Viniegra-González, en el sentido de que, estos autores encontraron un máximo de producción de ácido láctico (1.4 g%) a pH de 6.5, con una producción nula de etanol.

Sin embargo, es interesante confirmar lo señalado por estos autores, en el sentido de que, es posible producir cantidades apreciables de ácido láctico a partir de fuentes inorgánicas de nitrógeno, tales como el sulfato de amonio si se mantiene el pH cercano a la neutralidad.

Existen algunos trabajos que tratan de explicar la dependencia metabólica del pH. Por ejemplo, Neuberg y Hirsch, (1919) y, por otro lado Neish y Blackwood, (1951), encontraron que la fermentación alcohólica se modificaba a diferentes valores de pH. Observaron que la concentración de alcohol disminuía a medida que el valor de pH se elevaba. Roger y Wittier, (1928), encontraron que, a medida que la concentración de hidrogeniones en el medio aumentaba, la fermentación se hacía más lenta. Señalaron que este efecto se debía fundamentalmente a los ácidos no disociados, ya que estos pueden ser fácilmente intercalados dentro de las estructuras lipídicas de la membrana, y de esta manera inhiben el transporte o asimilación de nutrientes. Wang et al., 1980, estudiando el efecto de pKa del ácido acético demostraron que cuando el pH esta por debajo del pKa del ácido, éste inhibe o retarda la fermentación acética y que, por el contrario, cuando el pH esta por encima del pKa del á-

cido, el efecto inhibitorio se reduce considerablemente, es decir, que de esta forma no se presenta el fenómeno de inhibición por producto final.

Este efecto de la disociación de los ácidos se puede observar en las Figuras 3 y 4. A valores de pH mayores al pKa (pKa del ácido láctico es de 4.86), éste se encuentra disociado por lo que el fenómeno de inhibición por producto final no es significativo. Complementando esta posible explicación se podría decir que, cuando el ácido se encuentra en su forma no disociada puede penetrar a la célula y alterar el pH fisiológico de ésta, causándole posiblemente la muerte.

EFECTO DE TEMPERATURA Y FUENTE NITROGENADA.

En la Figura 5 se muestra el perfil de temperatura de la fermentación láctica usando tanto peptona como sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno. Se puede observar claramente que la fermentación láctica alcanza niveles de concentración hasta de 2.2 g%, en el medio que contiene peptona como fuente de nitrógeno. La concentración máxima de ácido láctico cuando la fuente nitrogenada es sulfato de amonio, es de 1.5 g%. Además se observa que en presencia de peptona, el inóculo es más tolerante a temperaturas relativamente altas y el nivel de producción de ácido láctico es casi constante en el intervalo de 34-45°C sin una caída brusca en la formación del metabolito. En cambio, cuando el medio contiene sulfato de amonio como fuente nitrogenada, el intervalo en el

que se alcanza la producción más alta es más corto, con una caída brusca después de los 35°C. A 55°C en el medio I hay una disminución de aproximadamente 25% de ácido láctico, en cambio, en el medio II a esta temperatura es de más de 60%.

Existen algunas teorías que explican el efecto de la temperatura en la estructura y metabolismo celular. Es evidente que la actividad celular depende de su temperatura ambiental, ya que la temperatura citoplasmática es igual a la temperatura externa. De lo anterior podemos decir, que modificaciones a la temperatura ambiental tendrán repercusiones en la célula. Por ejemplo, los trabajos hechos por Ingraham, (1962); Innis, (1975) y Lynch, (1975) entre otros, señalan la marcada importancia que tiene la temperatura sobre el crecimiento y metabolismo de los microorganismos. Demuestran que la temperatura de crecimiento influye notablemente en la síntesis de proteína, actividad enzimática y en los componentes estructurales de la pared celular.

Por otro lado, Buchanan y Gibbon, (1974) señalan que las bacterias lácticas necesitan algunos aminoácidos específicos para su crecimiento y esta necesidad aumenta con el aumento de temperatura, ya que, a temperaturas elevadas disminuye la estabilidad del material genético (Zeikus et al., 1970; Zeikus, 1979). Es probable que estos efectos puedan reducirse en presencia de peptona.

EFECTO DE VITAMINAS Y FUENTE NITROGENADA.

En la Figura 6 se muestran los experimentos en presencia y ausencia de factores de crecimiento en los medios I y II. Se observa que en el medio II es necesaria la presencia de vitaminas, ya que la ausencia de éstas influye notoriamente en la producción de ácido láctico. Sin embargo en el medio I la ausencia de vitaminas no tiene efecto significativo en términos de producción máxima de ácido láctico, pero sí influye en el aspecto cinético, ya que en presencia de vitaminas la producción máxima de ácido láctico se alcanza en menor tiempo.

Actualmente, la única bacteria láctica que se conoce que puede crecer con sulfato de amonio, como fuente de nitrógeno es, Streptococcus bovis (Niven et al., 1948). Por otro lado Buchanan y Gibbon, 1974, señalan que las bacterias lácticas, además de necesitar la presencia de aminoácidos en el medio de cultivo, es necesario adicionar factores de crecimiento. Esto no es necesario para el caso de cultivos mixtos, como se puede apreciar en la Figura 6, donde se muestra una producción significativa de ácido láctico en ausencia de vitaminas en el medio de cultivo que contiene peptona como fuente nitrogenada. Esto se debe, a que, las bacterias lácticas en simbiosis pueden proporcionarse diversos requerimientos nutricionales básicos, como las vitaminas (Nurmik0, 1956).

EFEECTO DE CO₂ Y FUENTE NITROGENADA.

En la Figura 7 se muestran los experimentos en presencia y ausencia de CO₂ en los medios I y II. Se observa que la ausencia de CO₂ no tiene efecto significativo, en el nivel de ácido láctico alcanzado, en ninguno de los dos casos, pero sí en términos de cinética cuando la fuente nitrogenada es peptona, ya que el nivel máximo de ácido láctico se obtiene hasta las 24 horas de fermentación, lo cual sugiere que la ausencia de CO₂ en este caso influye sobre la fase de retardo de la curva de crecimiento de los microorganismos.

EXAMEN CUALITATIVO CELULAR.

Se estudió microscópicamente (coloración de Gram) la microflora al inicio y al final de la fermentación durante todo el tiempo que duró esta investigación. Al inicio de la fermentación la microflora es muy heterogénea, encontrándose principalmente gran cantidad de cocos Gram +, algunos Gram -, levaduras abundantes y muy pocos bacilos Gram +. Al final de la fermentación la microflora se hace más homogénea, encontrándose en su mayoría bacterias cocoides. Pruebas parciales de identificación taxonómica indican que son bacterias lácticas (Familia Lactobacillaceae).

VI. CONCLUSIONES.

En base a los resultados expuestos, podemos señalar que:

- a). La fermentación alcohólica se lleva a cabo a valores de pH ácidos independientemente del tipo de fuente nitrogenada.
- b). La fermentación homoláctica se lleva a cabo a valores de pH cercanos a la neutralidad independientemente del tipo de fuente nitrogenada.
- c). A temperaturas altas y a valores de pH cercanos a la neutralidad, la fermentación láctica solo es posible si la fuente nitrogenada es proteica.
- d). La fermentación láctica a valores de pH cercanos a la neutralidad es independiente de los factores de crecimiento si la fuente nitrogenada es proteica.
- e). La fermentación láctica a valores de pH cercanos a la neutralidad y a 35^oC, depende de los factores de crecimiento si la fuente nitrogenada es inorgánica.

Por lo tanto se puede establecer, que es posible producir ácido láctico a partir de fuentes inorgánicas de nitrógeno suplementado con vitaminas y el pH cercano a la neutralidad, utilizando al estiércol como inóculo.

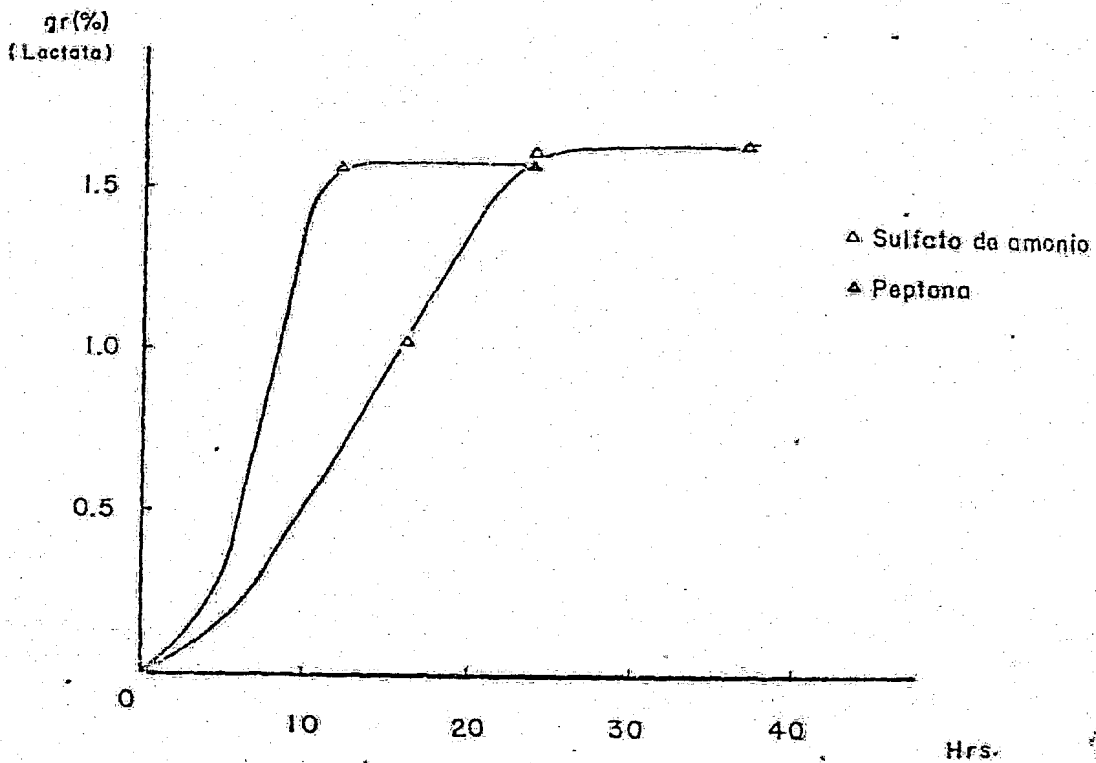


Fig.1 Fermentación de glucosa con diferentes fuentes de nitrógeno. Peptona. (▲) ácido láctico
Sulfato de amonio. (△) ácido láctico.
 El pH fué constante de 6.5. Fué regulado mecánicamente.
 La temperatura fué de 37°C.

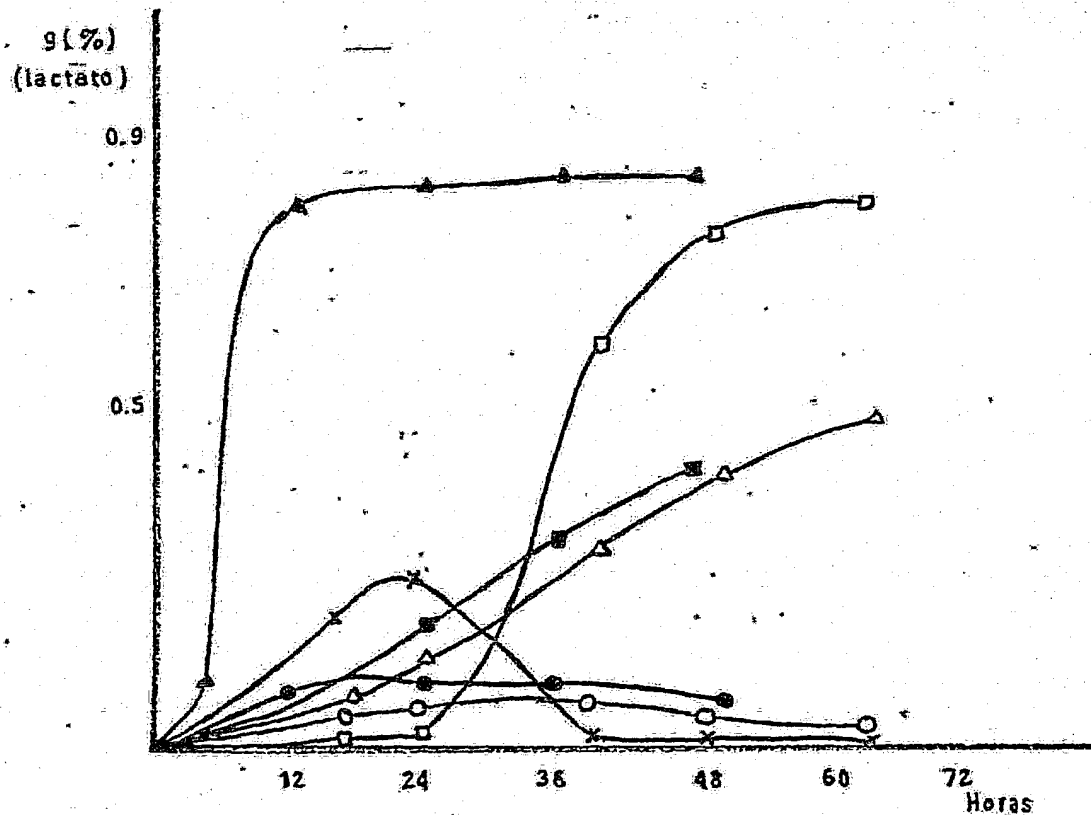


Fig.2 Fermentación de glucosa con diferentes fuentes de nitrógeno a pH no constante de 6.5.
Peptona. (Δ) ácido láctico. (■) etanol. (●) ácido acético
Sulfato de amonio. (Δ) ácido láctico. (■) etanol.
 (○) ácido acético. (*) ácido propiónico. La temperatura
 fué de 37°C. El pH fué regulado con sustancias químicas.

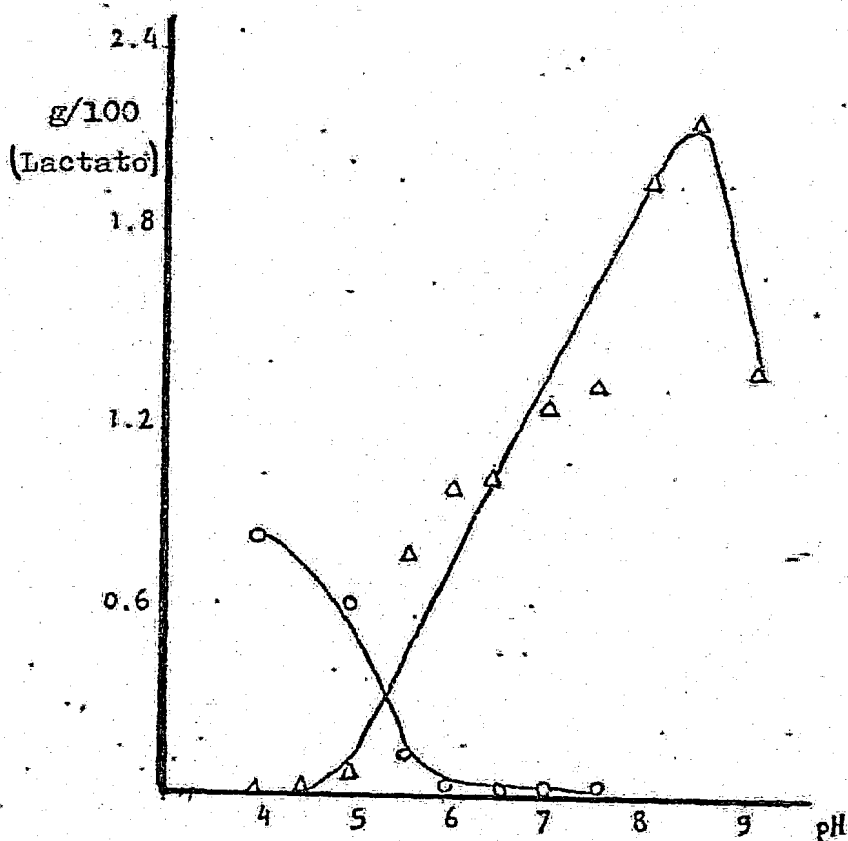


Fig.3 Fermentación de glucosa a diferentes valores de pH usando peptona como fuente nitrogenada. (Δ) ácido láctico. (○) etanol. La temperatura fué de 37°C. Los puntos corresponden a las 35 horas de fermentación. El pH fué regulado con sustancias químicas.

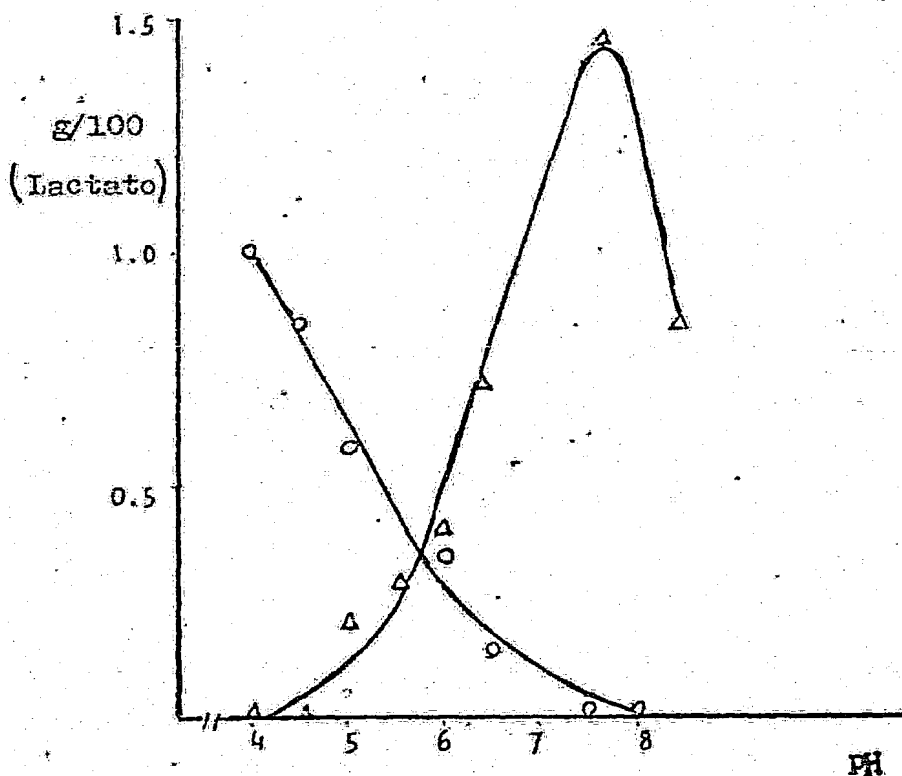


Fig. 4 Fermentación de glucosa a diferentes valores de pH usando sulfato de amonio como fuente nitrogenada. (Δ) ácido láctico. (○) etanol. La temperatura fue de 37°C. Los puntos corresponden a las 35 horas de fermentación. El pH fue regulado con sustancias químicas.

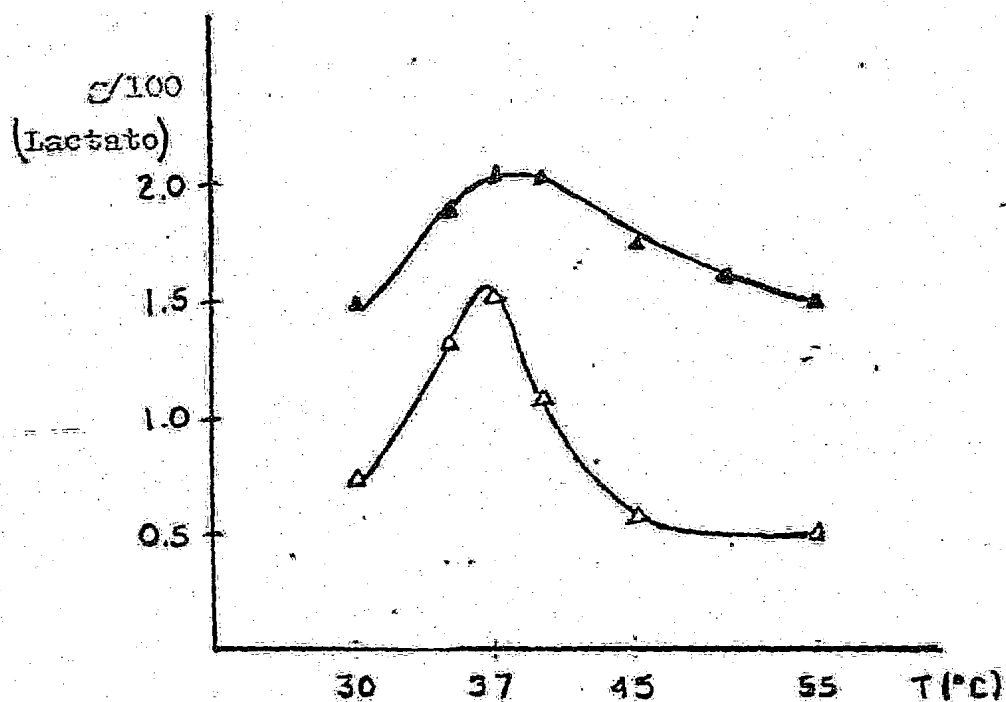


Fig. 5 Fermentación de glucosa a diferentes valores de temperatura. Fructosa a pH de 3.5 (▲) ácido láctico. Sulfato de amonio a pH de 7.5 (△) ácido láctico

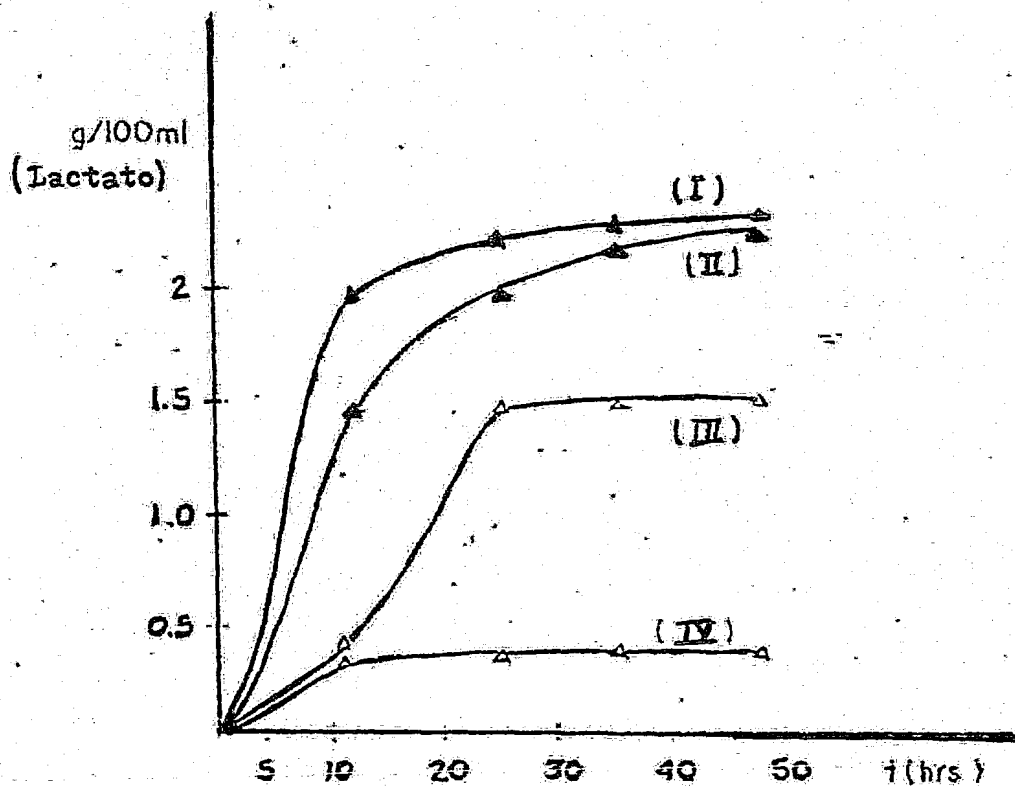


Fig. 6 Fermentación de glucosa con diferentes fuentes de nitrógeno en ausencia y presencia de factores de crecimiento.

I y II con Peptona; II sin factores de crecimiento.
 III y IV con Sulfato de selenio; IV sin factores de crecimiento.

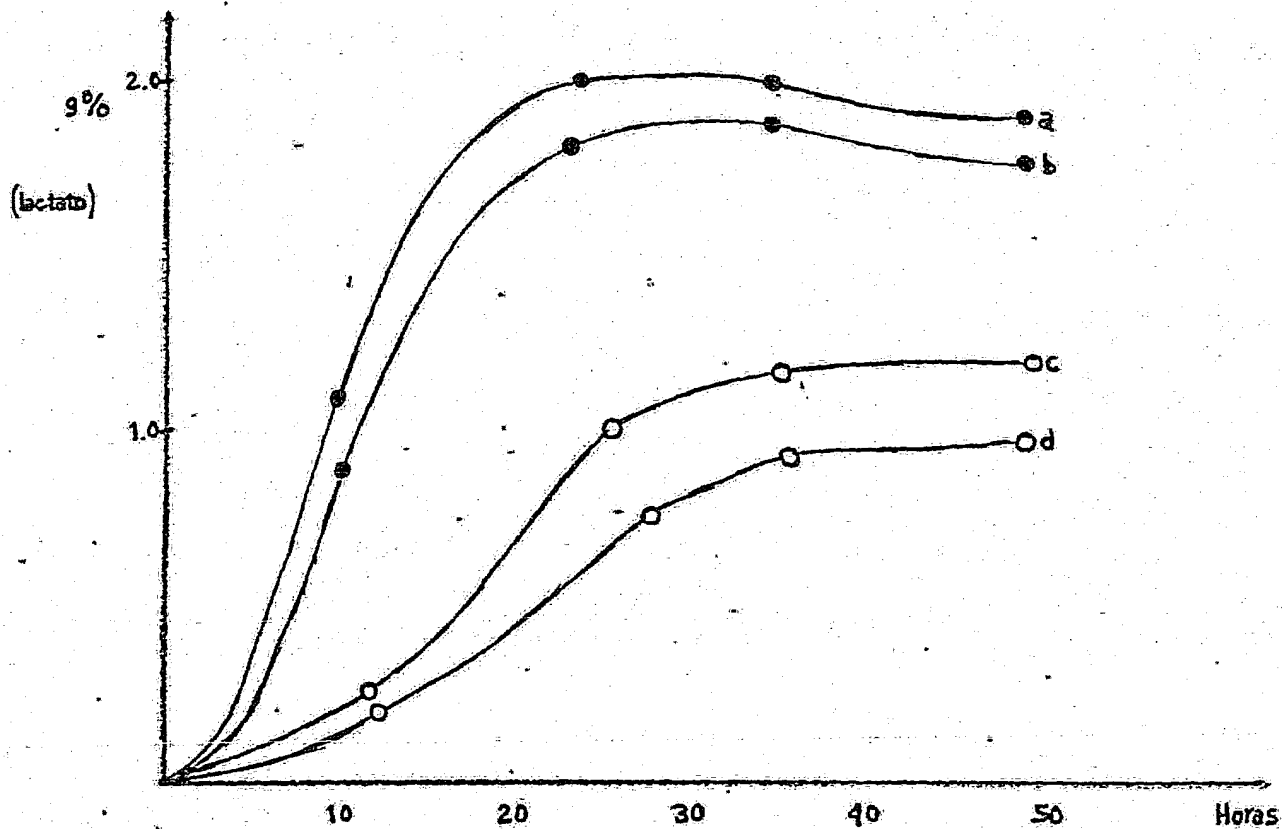


Fig.7 Fermentación de glucosa con diferentes fuentes de nitrógeno en presencia y ausencia de CO_2 .
 a y b con peptona; b sin CO_2 .
 c y d con Sulfato de amonio; d sin CO_2 .

VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Albin, R.C. (1971). Handling and disposal of cattle feedlot waste. *J. Animal. Sci.* 32: 803.
2. Alvarez, R., Pacheco, V., Pérez-Gavilan, J.P.E., Pouso, I. y Viniegra-González, G. (1979). Sustitución de maíz por biofermel. *Cuban. Agric. Sci.* 13:83-
3. Anthony, W.B. (1968). Wastelage. A new Concept in cattle feeding. *J. Anim. Sci.* 27: 289.
4. Bryant, M.P. and Robinson, I.M. (1961). Some nutritional requirements of the genus *Ruminococcus*. *Appl. Microbiol.* 9:91.
5. Brown, W.V. and Collins, E.B. (1977). End products and fermentation balances for lactic streptococci grown aerobically on low concentrations of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 : 38.
6. Buchanan, R.E. and Gibbon, N.E. (1974). *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. 8th. Ed. pp. 501-568. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
7. Cottyn, B.G and Boucque, CH.V. (1968). Rapid method for the Chromatographic determination of volatile acids in rumen fluid. *J. Agric. Food. Chem.* 16:105.
8. Cravioto, D.R., Cravioto, Y.O., Massieu, H.G. y Guzman, G.J. (1955). El pozol forma indígena de consumir maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes en la dieta. *Ciencia.* 15:27.
9. Datta, R. (1981). Acidogenic fermentation of corn stover. *Biotech. Bioeng.* 23:61.
10. Deley, J. (1962). Comparative biochemistry and enzymology in bacterial classification. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 12:190.
11. Doelle, H.W. (1975). *Bacterial metabolism*. 2nd. edition. pp. 244- 250 y 622-646. Academic. Press, N.Y.
12. Gibbs, M., Dumrose, R., Bennett, F.A. and Bubeck, M.R. (1950). On the mechanism of bacterial fermentation to lactic acid studied with ¹⁴C-glucose. *J. Bacteriol.* 108:1284.

13. Gómez, J. and Viniegra-González, G. (1981). Orientation of sugar fermentation inoculated with heterogeneous microbial population. *Advances in Biotechnology*. 2:627.
14. Hanson, T.P. and Tsao, G.T. (1972). Kinetics studies of the lactic acid fermentation in batch and continuous culture. *Biotech. and Bioeng.* 14:233.
15. Herrera, T. y Ulloa, M. (1970). Aspectos generales sobre la microbiología del pozol. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 12:103.
16. Hungate, R.E. (1966). *The rumen and its microbes*. Academic Press. Inc. N.Y.
17. Ingraham, J.L. and Allen, G.M. (1962). Effect of temperature on the composition of fatty acids in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 84:1260.
18. Innis, W.E. (1975). Interaction of temperature and psicrophilic microorganism. *Ann. Rev. Microbiol.* 29:445.
19. Kitahara, K and Obayashi, A. (1955). D.L. forming lactic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1:237.
20. Krueger, K.K. and Peterson, W.H. (1948). The nutritional requirements of Lactobacillus pentosus. *J. Bacteriol.* 55:683.
21. Lasking, A. and Lechevalier, H. (1974). *Handbook of Microbiology* CRC Press, Ohio.
22. Lynch, W.H.J., MacLeod, J. and Franklin, M. (1975). Effect of growth temperature on the accumulation of glucose-oxidation products in Pseudomonas fluorescens. *Can. J. Microbiol.* 21:1561.
23. London, J. (1968). Regulation and function of lactate oxidation in Streptococcus faecium. *J. Bacteriol.* 95:1380.
24. Metchnikoff, E. (1907). *The prolongation of the life*. Heinemann, London.
25. Monod, J. (1950). *Ann. Inst. Past.* 79:390.
26. Muller, H.G. (1981). Kempe. *Advances in Biotechnology, Proc. 6th. Internatl. Ferment. Symp. London, Canada, July 20-25, (1980)*. 2:541.

27. Neish, A.C. and Blackwood, A.C. (1951). Dissimilation of glucose by yeast at poised hydrogen concentrations. *Can. J. Tech.* 29:123.
28. Neuberg, C. and Hirsch, E. (1919). Alcoholic fermentation in an alkaline medium. *Biochem. Z.* 96:175.
29. Niven, C.F., Washburn, M.R. and White, J.C. (1948). Nutrition of *Streptococcus bovis*. *J. Bacteriol.* 55:601.
30. Nurmikko, V. (1956). Biochemical factors affecting symbiosis among bacteria. *Experientia.* 7:245.
31. Pérez-Gavilan, J.P.E. y Viniegra-González, G. (1976). Potencial del uso del estiércol en la alimentación de los bovinos. *Ciencia Veterinaria.* 2:241.
32. Pette, J.W. and Lokema, J. (1951). Yoghurt, V. Firmness and whey separation of milk yoghurt. *Neth. Milk. Dairy. J.* 5:27.
33. Pipyn, P. and Verstraete, W. (1981). Lactate and ethanol as intermediates in two-phase anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.* 23:1145.
34. Prescott, S.C. and Dunn, C.G. (1962). *Industrial Microbiology.* 3th. Ed. pp. 324-359. Mc Graw-Hill, N.Y.
35. Rhodes, R.A. and Orton, W.L. (1974). Solid substrate of feedlot waste combined with feed grains. Presented at American Society of Agricultural Engineers Meeting, Stillwater, Oklahoma. June 23-26.
36. Robbins, J.E., Melvin, T.A. and Stephen, L.L. (1979). Methane production from cattle waste and delignified straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:175.
37. Rogosa, M., Mitchell, J.A. and Wiseman, R.F. (1951). *J. Bacteriol.* 62:132.
38. Roger, L.A. and Whittier, E.O. (1928). Limiting factors in the lactic fermentation. *J. Bacteriol.* 16:211.
39. Sánchez marroquin, A. and Hope, H. (1953). Fermentation and chemical composition studies of some species of agave juice. *J. Agric. Food Chem.* 1:246.
40. Shida, T., Komagata, K. and Mitsugi, K. (1975). Reduction of lag time in bacterial growth. Effect of inoculum size and nutrients. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 21:75.

41. Torre de la, I. and Gomá, G. (1981). Characterization of anaerobic microbial culture with high activity. *Biotech. Bioeng.* 23:185.
42. Ulloa, K. y Herrera, T. (1970). Resistencia de las aflatoxinas durante la fermentación del pozol. *Re. Lat-Amer. Microbiol.* 12:19.
43. Varel, V.H., Issacson, H.R. and Bryant, M.P. (1970). Thermophilic methane production from cattle waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:298.
44. Virtanen, A.I. (1966). Studies of the use of urea and ammonium salts as the sole nitrogen source open new important perspectives. *Science.* 153:1603.
45. Wang, D.C., Fleischater, R.J. and Wang, G.V. (1980). A novel route to the production of acetic acid by fermentation. *Aiche. Symp. Series.* 74:105.
46. Wittenberger, C.C. and Angelo, N. (1970). Purification and properties of a fructose 1,6-diphosphate-activated lactate dehydrogenase from *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 101:717.
47. Zeikus, J.G. (1979). Thermophilic bacteria: Ecology physiology and technology. *Enzym. Microb. Technol.*
48. Zeikus, J.G., Taylor, M.W. and Brock, T.D. (1970). Thermal stability of ribosomes and RNA from *Thermus aquaticus*. *Acta.* 204:512.