

62  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

**"PRODUCCION DE ACIDO LACTICO A PARTIR DE UN  
HIDROLIZADO ENZIMATICO DE PAPA".**

**TESIS MANCOMUNADA**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A N :  
SOCORRO PAEZ GONZALEZ  
JUAN GERARDO RAMIREZ OROZCO**

México, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1988



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 está 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.

I N D I C E

CAPITULOS		PAGINAS
I	INTRODUCCION	4
II	GENERALIDADES	9
	2.1. Datos generales de la papa.	10
	2.2. Generalidades del ácido láctico	16
	2.3. Características generales del - género <u>Aspergillus</u> .	24
	2.4. Características generales del género <u>Lactobacillus</u> .	28
III	PARTE EXPERIMENTAL	35
	3.1. Fermentación Amilolítica	35
	3.2. Fermentación láctica	41
	3.3. Extracción del ácido láctico como lactato de calcio.	54
IV	DISCUSION DE RESULTADOS	58
V	RESUMEN	62
VI	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
VII	BIBLIOGRAFIA	66
VIII	APENDICE	76

C A P I T U L O I

I N T R O D U C C I O N

## INTRODUCCION

El ácido láctico es un compuesto químico de uso muy variado en la industria mexicana. Se utiliza en la industria alimentaria, farmacéutica, textil, curtidurías, tabacaleras, etc. Por su versatilidad, su demanda --- anual aumenta considerablemente y se prevee que contfne aumentando -- para los próximos años.

En México aún no se ha desarrollado la tecnología necesaria para la producción de ácido láctico y su importación se hace cada día más - necesaria con la salida de divisas que ello lleva consigo.

Ya desde 1950, Cordon y colaboradores (9), propusieron un mé todo para producir ácido láctico a partir de papa, utilizando amilasas fún- gicas que convierten los almidones en azúcares utilizables por lactobaci-- los, los cuales, realizan la fermentación de éstos hasta ácido láctico, que- se recupera como metil lactato, obteniendo rendimientos de hasta 85%

En 1984, Maldonado y Garduño (26), empleando papa de desecho afirman haber obtenido ácido láctico siguiendo una secuencia similar a la - propuesta por Cordon, sin embargo, la optimización del proceso continuó siendo el problema, al igual que la caracterización recuperación y purifica- ción del producto.

Este trabajo tiene por objeto optimizar las condiciones de obten-- ción del ácido láctico como lactato de calcio.

En la producción de ácido láctico se puede utilizar como fuente de -- carbono una gran variedad de productos, tales como: suero de leche, papa, mieles incristalizables, maíz, sorgo, trigo, cebada, malta, etc. Se eligió la papa -- por ser fácil de adquirir, su suministro es continuo y su costo razonable.

Tan sólo en 1985, en el territorio nacional se cosecharon 70,000 hec--- táreas de este tubérculo; que produjeron 840,000 toneladas de las cuales, alre--- dedor de 84,000 toneladas (10% aproximadamente) no tuvieron colocación en el -- mercado. (2,26)

Este 10% de desecho puede ser bien aprovechado para la producción -- de ácido láctico u otros productos de importancia económica en nuestro País.

En este trabajo se ha intentado diseñar un proceso para producir ---- ácido láctico mediante fermentación de hidrolizado de papa por bacterias lácticas.

La Metodología realizada fue la siguiente:

- a) Obtención de hidrolizado enzimático de papa, utilizando glucoamilasas produ--- cidas por Aspergillus Niger;
- b) Acondicionamiento del sustrato descrito para la obtención de ácido láctico por fermentación con bacterias lácticas.

#### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de ácido láctico a partir de papa de desecho.

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Selección de cepas de A. Niger productoras de glucoamilasa.
- Obtención del hidrolizado de papa con la cepa seleccionada.
- Comprobación de los parámetros recomendados para obtener altos -- rendimientos de ácido láctico a partir del hidrolizado de papa.
- Determinar la estabilidad del hidrolizado de papa a diferentes periodos de tiempo.
- Extracción del ácido láctico como lactato de calcio.

## HIPOTESIS

Si las bacterias lácticas han sido adaptadas a un hidrolizado enzimático de papa, entonces, al optimizar las condiciones de fermentación, éstas deben producir ácido láctico como producto final de sus funciones metabólicas.



C A P I T U L O   I I

G E N E R A L I D A D E S

## 2.1 DATOS GENERALES DE LA PAPA (SOLANUM TUBEROSUM)

La papa pertenece a la familia de las Solanáceas, su centro de -- origen es en el Perú, entre Cuzco y el Lago Titicaca, donde existe el ma-- yor número de variedades nativas cultivadas y especies silvestres.

Fué llevada a Europa en 1565, donde se difundió y se llegó a cul-- tivar en la mayoría de los Países con gran éxito. (7)

En la República Mexicana, el Valle de Toluca constituye el núcleo del sistema de producción de semilla certificada de papa. Es la zona de -- protección, autosuficiente y surtidora. Es zona de protección por estar -- prohibida la introducción de semilla de origen desconocido o proveniente de lugares infestados con el Nemátodo Dorado (Heterodera rostochiensis) y --- Pudrición bacteriana (Pseudomonas solanacearum). Es autosuficiente por - producir su propia semilla. La producción en el Valle de Toluca se efectúa a través de la asociación de productores de semilla, organización que man-- tiene una posición monopólica en su rama, debido en gran parte a las ven-- tajas comparativas del Valle originadas en sus condiciones ecológicas favora-- bles al cultivo de semillas de alto riesgo. (4).

La composición química de la papa es variable, dependiendo del - clima, fertilización, variedad, almacenaje, etc., y todas aquellas condicio-- nes que favorezcan la producción de un buen tubérculo.

Tabla (1)

- 11 -

COMPOSICION QUIMICA APROXIMADA DE LA PAPA (26, 52)

Carbohidratos Totales	18.0	-	20.0%
Azucares Reductores	0.8	-	1.2%
Humedad	0.0	-	80.0%
Grasa	0.1	-	1.0%
Potasio	430,000 mg/100g de papa pelada		
Manganeso	0.253	"	" " " "
Magnesio	20.8	"	" " " "
Fósforo	47.8	"	" " " "
Calcio	0.8	"	" " " "
Cobre	0.6	"	" " " "
Yodo	0.018	"	" " " "
Zinc	0.042	"	" " " "
Fierro	0.68	"	" " " "
Aluminio	0.609	"	" " " "
Sodio	7.7	"	" " " "
Vitamina C	21.4	"	" " " "
Niacina	1.4	"	" " " "
Tiamina	52.6	"	" " " "
Riboflavina	33.7	"	" " " "

En México no existe producción de papa planeada para emplearla como forraje, sin embargo, se utiliza como tal o como desperdicio, papas -- no podridas que no pueden venderse por daños mecánicos o fisiológicos (enfermedades) o por tamaño extremo (papas muy chicas o muy grandes y -- papas deformes). Estos tubérculos y el material podrido es lo que los ---- agricultores consideran "merma", aunque por lo dicho anteriormente, está -- claro que parte de la merma puede ser utilizada económicamente.

A manera de ejemplo, podemos citar que, de la cantidad total de papa consumida en 1978, aproximadamente 12% fué en forma elaborada (productos de papa vendidos por la industria procesadora, las modalidades principales son: papas fritas, puré de papa, sopas y tortas instantáneas de -- papa), el 88% del consumo se verificó en forma fresca.

En el País no se utiliza la papa en procesos industriales, cuya -- finalidad sea otra que el consumo humano. (4,7).

Los periodos de producción de papa en México, en diferentes estados de la República abarcan la mayor parte del año, lo que asegura su -- disponibilidad para usarla como sustrato en la producción de ácido láctico.

Tabla. (2) SUPERFICIE Y PRODUCCION NACIONAL DEL CULTIVO DE PAPA

PERIODO AGRICOLA 1974 - 1985 (2)

A Ñ O	SUPERFICIE COSECHADA (miles de Has)	PRODUCCION <sup>a</sup> . (miles de tons.)	RENDIMIENTO (Kg/Ha)
74-76	56	661	11,847
79-81	78	993	12,662
82	68	941	13,842
83	74	835	11,225
84	70f.	830b.	11,857
85	70f.	840f.	12,000

a. Pérdidas del 10% de la producción, equivalentes a 84,000 tons./año en 1985.

b. Dato no oficial.

f. Estimación de la F.A.O.

"Anuario F.A.O. de producción", 1985, vol.39, Roma, Italia.

Tabla. (3) PRODUCCION NACIONAL DE PAPA (13, 14)

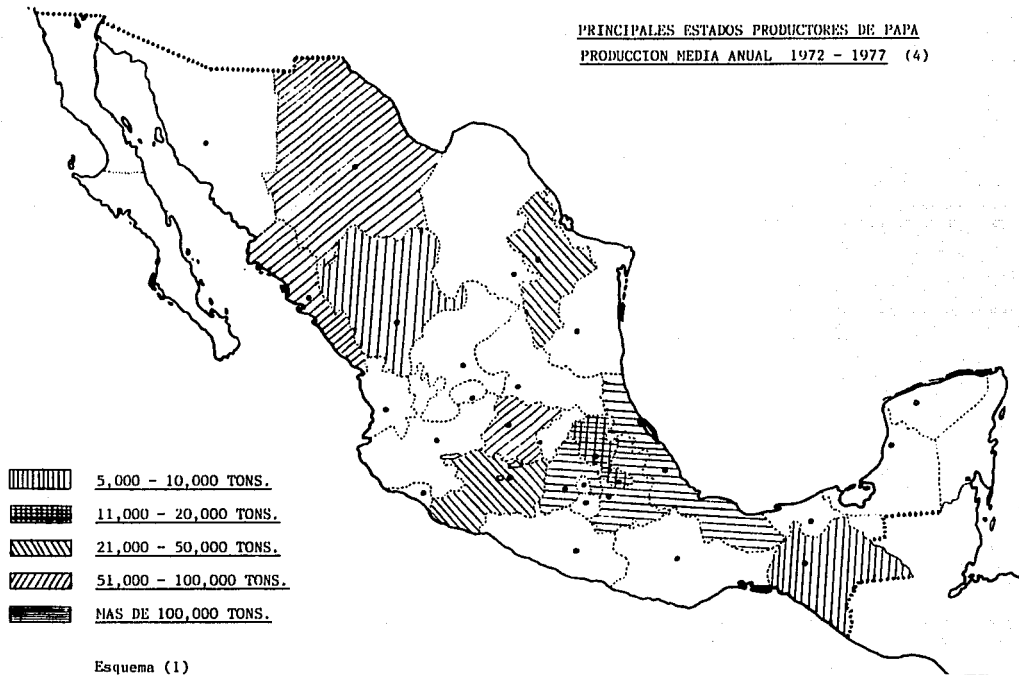
ESTADOS	PERIODOS DE PRODUCCION	PRODUCCION ANUAL TONS. **	VALOR PROMEDIO MILES DE PESOS *
MEXICO	ENE - FEB	900.000	6. 700.000
PUEBLA	JUN - JUL		
HIDALGO	JUN - SEPT.		
MICHOACAN	SEPT. - OCT.		
GUANAJUATO	OCT. - NOV.		
JALISCO	MAY. - JUN.		
TLAXCALA	MAR. - ABR.		
VERACRUZ	JUN. - SEPT.		

\* AÑO AGRICOLA 1980.

\*\* PERDIDAS DEL 10% EQUIVALENTE A 90.000 TONS./AÑO.

ANUARIO ESTADISTICO DE LOS E.U.M. (1981) S.A.R.H.

PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE PAPA  
PRODUCCION MEDIA ANUAL 1972 - 1977 (4)



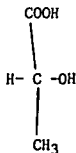
Esquema (1)

## 2.2 GENERALIDADES DEL ACIDO LACTICO

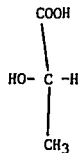
### 2.2.1. Características del ácido láctico.

El ácido láctico o ácido 2-hidroxipropiónico ( $C_3H_6O_3$ ) es un líquido ligeramente viscoso, transparente, incoloro, o débilmente amarillento, inodoro, muy higroscópico, soluble en agua, alcohol o éter en todas proporciones. La molécula de ácido láctico tiene un carbón asimétrico, por lo cual se presentan dos isómeros ópticamente activos, sin embargo la mezcla racémica es ópticamente inactiva.

(5, 18, 19, 26, 33, 35, 38)



D(-) Acido láctico



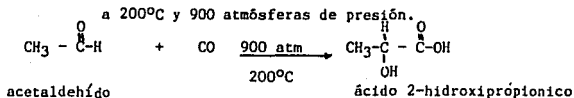
L(+) Acido láctico

### 2.2.2. Métodos de Obtención.

La producción de ácido láctico se realiza por métodos químicos y por métodos microbiológicos.

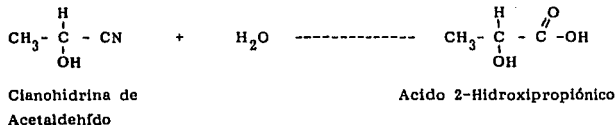
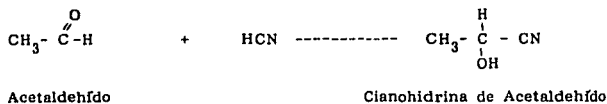
Métodos químicos.

a) Al hacer reaccionar acetaldehído con monóxido de carbono

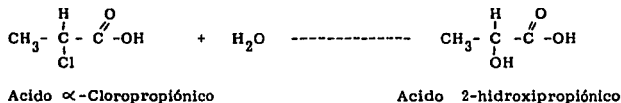
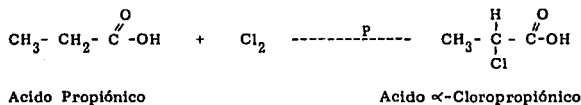




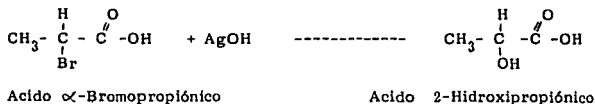
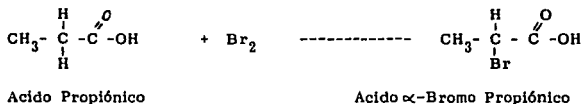
- b) Por hidrólisis de cianohidrina de acetaldehído, preparada con etanal--  
dehído y ácido cianhídrico.



- c) Por Hidrólisis del Acido Cloro Propiónico, obtenido por cloración del -  
Acido Propiónico.



- d) Por la reacción de hidróxido de plata con ácido Bromo Propiónico.



Los métodos químicos son generalmente más caros que la fermentación de productos biológicos y por esta razón no se emplean mucho. (23, 38).

#### Métodos Microbiológicos.

Con bacterias lácticas, la producción industrial de ácido láctico - se realiza por fermentación de glucosa refinada, almidones, suero de leche y melazas, desechos de licores sulfúricos, jugos de cítricos, hidrolizados, - ácidos de madera, aserrín, paja y mazorca de maíz. (9,21,23)

El rendimiento teórico producido es el 100% del peso de la hexosa fermentada, pero en la práctica no se obtiene este rendimiento, tomando en cuenta que los microorganismos utilizan carbohidratos como fuente de energía, industrialmente se considera óptimo un rendimiento del 85%, (23,35,50).

### 2.2.3. Métodos de Extracción.

La tecnología de la extracción del ácido láctico del líquido de -- fermentación varía según la calidad del ácido que se desea obtener, los - métodos más conocidos se mencionan a continuación :

- a) Extracción como lactato de calcio
- b) Extracción como lactato de metilo
- c) Extracción como lactato de zinc
- d) Extracción con Eter Isoprópicico
- e) Extracción con Destilación al vacío

#### a) Extracción como Lactato de Calcio

Al término de la fermentación el mosto se pasa por un tamiz de malla fina, con el objeto de eliminar residuos sólidos y micelio. Al filtrado se adiciona carbonato de calcio hasta ajustar el pH a 10 y se calienta a - 82° C, este procedimiento sirve para matar las bacterias, coagular las proteínas del medio y convierte todo el ácido a lactato de calcio, en seguida se filtra para eliminar el exceso de carbonato de calcio.

La solución se calienta y se le agregan pequeñas cantidades de carbón activado para eliminar color e impurezas. Posteriormente se procede a concentrarlo al vacío hasta 32% del volumen original, el producto obtenido se deja en refrigeración durante toda la noche para que cristalice el lactato de calcio. (5,19,21,23,32,33,39)

b) Lactato de Metilo

El ácido láctico crudo se deshidrata para obtener una solución con un contenido elevado de ácido, y esa solución se esterifica después con metanol. La esterificación puede realizarse calentando la mezcla a reflujo en presencia de ácido sulfúrico, o bien se hace pasar vapor de metanol a través del ácido láctico, calentado a 100° C. Este método da rendimientos más altos de lactato de metilo, ya que el equilibrio se desplaza favorablemente por eliminación del lactato de metilo volátil con una corriente de vapor de agua.

El lactato de metilo puede fraccionarse o no, y después hidrolizarse completamente por ebullición en exceso de agua con eliminación - continúa del metanol regenerado. La solución acuosa residual procedente de este tratamiento es el ácido de calidad U.S.P. (5,9,17,23,33,39)

c) Lactato de Zinc

Este método es poco utilizado debido a la poca solubilidad de la solución de zinc.

Al fermentado se le agrega óxido de zinc y se deja reposar - durante ocho días, después se concentra la solución por calentamiento - y se cristaliza la sal en agua caliente. (5,19,23,33)

d) Extracción con eter isopropilico

El ácido láctico se extrae del líquido de fermentación por medio de este disolvente y de la solución etérea se extrae el ácido láctico con agua (5,23,33,35,39)

e) Destilación al Alto Vacío

Este procedimiento no se utiliza comercialmente debido a que el punto de ebullición relativamente alto del ácido láctico, ocasiona la autoesterificación con la formación de poliésteres volátiles (5,23,33,39)

2.2.4. Usos

Los usos del ácido láctico pueden dividirse en dos categorías comestibles e industriales.

Las propiedades del ácido láctico hacen que sea apropiado en -- gran variedad de productos alimenticios: 1) sabor ácido suave que contrasta con el sabor picante de otros ácidos; 2) no oculta ni domina con otros sabores; 3) en algunos productos alimenticios impide su alteración.

El ácido láctico crudo se usa en la industria de los cueros para desencalar las pieles y para remojar e hinchar el cuero para suelas.

Es la materia prima para preparar los lactatos de : metilo, etilo- y n-butilo que se usan como disolventes, esta calidad también se utiliza para tinte ácido de la lana y otros textiles. Otros usos: en adhesivos, fórmulas para limpieza y pulimento, en galvanoplastia y electropulimento, en insecticidas fungicidas y reveladores litográficos.

Tabla (4)

USOS DEL ACIDO LACTICO				
1º GRADO CRUDO 22%	2º GRADO COMESTIBLE 44% y 50%	3º GRADO PLASTICO 50%	4º GRADO U.S.P. 85%	
Tañido de sedas lanas	Acidulante	Industria de plásticos	Farmacía	
Preparación de Cueros	Confiterías		Comestibles	
Dosecado de Pieles	Inhibidor de bacterias en la fermentación		Plastificante	
Encurtido de vegetales	Manufactura de cerveza		Catalizador de resinas, aldehído - fenólicas	
Fuente en pastas de soldar	Fabricación de levadura			
Adhesivos	Ajustar pH en aguas duras			
Limpiadores y pulidores	Saborizante			
Electrodeposición	Productos de panadería			
Reveladores litográficos	Fabricación de bebidas efervescentes			
Tintas especiales	Preservador ( sopas, frutas			
Solventes (ésteros de metil, etil, n-butil - lactato )	dulces, pepinos agriosomos, carne extractos, quesos )			

DERIVADOS DEL ACIDO LACTICO :

Lactato de calcio en calcioterapia; lactato de fierro en tratamiento de anemias; lactato de aluminio como antiperspirante; lactato de cobre en electrodeposición; lactato de antimonio en tintorerías; lactato de sodio en plastificantes y humectantes; lactato de etilo, n-butilo en lubricantes y solventes. (21, 23, 26, 33, 40).

El ácido láctico no se produce a nivel nacional, lo que origina la necesidad de importarlo en grandes volúmenes.

Tabla (5). IMPORTACIONES MEXICANAS DE ACIDO LACTICO Y SUS DERIVADOS  
1982 - 1987

AÑO	VALOR DE IMPORTACION EN DOLARES		
	ACIDO LACTICO	LACTATO DE CALCIO	LACTATO DE LAURILIO
82	1 119,000	17,000	-
83	1 194,000	26,000	1,000
84	1 545,000	34,000	1,000
85	1 462,000	135,000	130,000
86	927,000	73,000	4,000
87	850,000	20,000	60

Subdirección de Investigaciones Económicas y Bancarias.

"Importaciones de Fracciones Arancelarias y Países de Origen"

Banco de México, S. A. D. F. 1982-1987.

(43, 44, 45, 46, 47, 48).

## 2.3 CARACTERISTICAS GENERALES DEL GENERO Aspergillus.

### 2.3.1 Características Morfológicas:

El género Aspergillus es uno de los hongos más importantes dentro de la micología desde el punto de vista industrial, su nombre proviene de la forma de sus órganos asexuados de reproducción que son parecidos a un "aspersorio" (latín aspergillus-aspersorio o hisopo). Como sinónimo de éste género debemos citar el de "sterigmatocystis", usado todavía por algunos autores.

Las características de la especie niger son:

Las colonias jóvenes son de color blanco ligeramente amarillentas sobre las que van apareciendo puntos negros, cabezas aspergillares obscuras típicamente radiadas y globosas, que pueden alcanzar hasta 1 mm de diámetro, esterigmas en una serie, conidióforos de tamaño variable, vesículas globosas, de paredes delgadas comúnmente de 20 a 50 micras de diámetro, excretores globosos superficiales (no son producidos por todas las cepas). En algunos estudios conviene tener colonias gigantes en las que se debe observar los siguientes aspectos: forma, tipo de crecimiento, superficie, tamaño, zonas, desarrollo sectorial, color, aspecto anverso y reverso.

Aspergillus Niger se caracteriza por tener un habitat típicamente saprófito, pero en determinadas circunstancias se puede adaptar a la vida parasitaria y causar otomicosis. (1,26,51)



2.3.2. Características taxonómicas :

Los mohos del género Aspergillus se clasifican dentro de los ascomicetes al igual que el género Penicillium, y como estos, son igualmente --- abundantes. Forman masas de conidios negros, cafés, o verde olivo; los -- esterigmas de Aspergillus están formados como proyecciones de un engro-- samiento en la parte distal del conidióforo.

La clase ascomicetes se caracteriza por presentar esporas sexuales contenidas en una estructura en forma de bolsa llamada "asca"; generalmente tienen micelio septado y en la mayoría de los casos se forman conidios asexuales en el ápice de las hifas especializadas.

En el género Aspergillus dado que los conidióforos y las conidias se producen en forma abundante, su color es el predominante en la colonia. Por esto las colonias de Aspergillus pueden verse negras, cafés, amarillas o verdes. El color depende de la especie y del medio en el cual el hongo es tá creciendo. Por ello el color de la colonia es uno de los criterios para su clasificación y no se puede sobre enfatizar la importancia del uso de un medio de crecimiento estándar o de composición química conocida y condiciones estándar para el crecimiento del Aspergillus.

La producción de pigmentos en el género Aspergillus es profundamente influida por la ausencia o presencia de cantidades muy pequeñas de -- los llamados elementos traza; y estos hongos son tan sensibles que se ha usado a Aspergillus Niger para detectar cobre en suelos y otras sustancias en - cantidades tan pequeñas que sólo son detectadas por métodos químicos; 2.5 millonésima de gramo de cobre es suficiente para inducir una pérdida de co-- lor en este organismo; cuando el cobre contenido por el medio es menor a -- ésta cantidad el color del conidio es proporcionalmente más luminoso y en ---

completa ausencia de cobre el conidio pasa de un color negro o café oscuro a amarillo. (1, 26).

### 2.3.3. Importancia del Género Aspergillus :

El ascomiceto Aspergillus Niger y otros del mismo género se utilizan para producir la enzima glucoamilasa en escala comercial; dicha enzima digiere los almidones en azúcares simples y estos son fermentados por otros microorganismos produciendo alcohol u otro producto de fermentación.

Aspergillus Niger produce también un antibiótico llamado aspergillina, que es soluble en éter y en alcohol, estable a 70° C y que es activo contra bacterias gram positivas y gram negativas pero no contra bacilos esporulados. Los aspergilos también se utilizan para producir cantidades industriales de ácido cítrico (mediante un proceso más económico que si se extrajera directamente de los limones) así como otros ácidos orgánicos como el glucónico, itacónico y el fumárico, todos ellos componentes comunes de los plásticos. (1, 26, 51).

### 2.3.4. Actividad Enzimática

Corman y Langlyke estudiaron la acción de ciertas enzimas amilolíticas de filtrados de cultivos de A. Niger que producen la sacarificación del almidón y establecieron que la acción hidrolítica se debe a la  $\alpha$ -amilasa y a una enzima glucogénica. La eficiencia de ésta sacarificación fue posteriormente correlacionada con la enzima glucogénica mejor que con la actividad de la  $\alpha$ -amilasa y se le denominó glucoamilasa. (1, 26)

Investigadores de los Estados Unidos y Japón han demostrado que muchos microorganismos pueden producir glucoamilasa, pero al mismo tiempo, tienen también una producción considerable de transglucosidasa, enzima de -

importancia que reduce los rendimientos de dextrosa del almidón, pues produce glucosacáridos no fermentables con enlaces.  $\alpha(1-6)$  (26).

A fin de tener una mejor comprensión de la acción de estas enzimas sobre la molécula del almidón, recordemos que éste es un polisacárido compuesto por amilosa y amilopectina. La amilosa es una fracción lineal formada por moléculas de glucosa en enlaces  $\alpha(1-4)$ ; mientras que la amilopectina son cadenas laterales formadas por moléculas de glucosa en enlaces  $\alpha(1-6)$ . Se sabe que existe una cadena lateral por cada 25-30 unidades de glucosa en la amilopectina, y que cada tipo de enlace tiene diferente velocidad de hidrólisis. (1, 37)

Cuando se hidroliza el almidón con agua y un catalizador adecuado las moléculas de agua se añaden a las moléculas de almidón, por consiguiente, una cantidad de almidón produce más de una cantidad de productos de hidrólisis. En nuestro trabajo lo que interesa es la conversión del almidón al producto final glucosa, en el cual, 162 unidades de almidón reaccionan con 18 unidades de agua para producir 180 unidades de glucosa.

Cuando la hidrólisis del almidón no es completamente se obtienen productos intermedios, como maltosa y algunos oligosacáridos, con los que se dificulta determinar el rendimiento. Sin embargo la hidrólisis por enzimas de Aspergillus como la glucosidasa generalmente es completa. (26)

## 2.4 CARACTERISTICAS GENERALES DEL GENERO

### LACTOBACILLUS

#### 2.4.1. Características Morfológicas :

Los lactobacillus forman un grupo de bacterias clasificadas como - bacilos gram positivos, normalmente no esporulados, en la especie L. delbrückii, los bacilos miden de 0.5 a 0.8 micras de ancho por 2 a 9 micras de - largo, tienen extremos redondeados y pueden aparecer solos o en cadenas - cortas. por tinción con azul de metileno revelan granulaciones internas. No móviles, originan colonias normalmente ásperas y no pigmentadas cuyo - crecimiento y desarrollo en medio sólido se aumenta frecuentemente por anaerobiosis y presencia de CO<sub>2</sub> de 5 a 10%. Su rango de temperatura de -- crecimiento es de 2°C a 53°C; pero es generalmente óptimo a los 30° - 40° C (24). (10, 20, 41)

#### 2.4.2 Características Taxonómicas :

Para la clasificación de los lactobacilos se aplican los métodos ---- taxonómicos modernos, con los que se determina la proporción de bases guanina y citosina contenidas en su D.N.A. y se relacionan las propiedades -- fenotípicas.

La especie L. delbrückii presenta un porcentaje de bases G+G -- 49-51%/mol. Su pared celular contiene ácido teicoico y glicerol, el peptidoglicano es del tipo L-lisina-D-aspartato.

Debido a la gran similitud genotípica y fenotípica entre las diferentes especies de lactobacillus, en la actualidad solamente L. delbrückii -

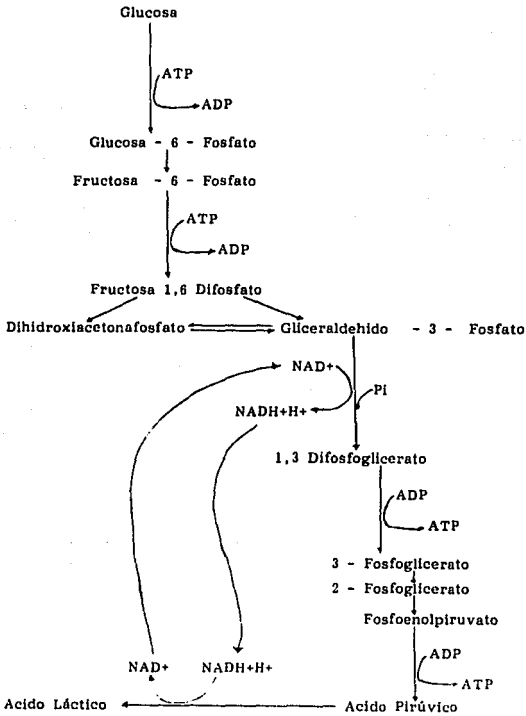
se ha dejado como una especie separada, mientras que las cepas de L. lactis y L. Leichmanni, ambas, son consideradas como L. delbrüeckii subespecie -- lactis y la especie L. bulgaricus como L. delbrüeckii subespecie bulgaricus.

El nombre delbrüeckii, adoptado para éstas a sido tomado de la pa labra Delbrück, apellido del bacteriólogo alemán M. Delbrück, quien trabajó con estos microorganismos. (25, 41).

#### 2.4.3. Importancia del género Lactobacillus

Los Lactobacillus son microorganismos que pueden encontrarse en - artículos de uso diario, gramíneas, agua potable, aguas residuales, cervezas, vinos, frutas y jugos de frutas, vegetales picados, leche y productos lac--- teos, son así mismo saprófitos de la boca, del intestino y vagina de muchos - animales homotermos, incluido el hombre, más no son patógenos. (25)

LA FORMACION DE ACIDO LACTICO POR LAS BACTERIAS  
L. delbrücke SIGUE LA VIA EMBDEN-MEYERHOFF-PARNAS (EMP)



(11, 22, 24, 36, 50) Esquema (2)

#### 2.4.4. Capacidad de Fermentación

Las cepas de L. delbrüeckii a partir de glucosa y otros carbohidratos forman ácidos sin gas. Fermentan la maltosa (aunque pueden aparecer variantes maltosa negativas susceptibles de aislar), son típicamente homofermentadores, producen D(-) ácido láctico, generalmente producen también amoníaco a partir de arginina y no acidifican la leche.

Se les considera generalmente bacterias acidúricas, su pH óptimo está usualmente entre 5.5 y 6.2 y pueden desarrollar a pH 5.0 ó menos. En condiciones neutras o ligeramente alcalinas, la fase lag puede ser alargada hasta la detención del crecimiento.

En cuanto a factores del crecimiento, estas bacterias requieren ácido pantoténico y niacina en forma esencial. Riboflavina, ácido fólico, vitamina B-12 y timidina solamente son necesarias para algunas cepas, mientras que tiamina, piridoxina, biotina y ácido para-aminobenzoico no son necesarios. (12, 41).

A continuación se presentan las características fermentativas que distinguen a la especie L. delbrüeckii de otros Lactobacillus :

Lactobacillus delbrüeckii ATCC 9649: <sup>AL</sup>(leichmann 1896) Weiss, Schillinger and Kandler 1984, 270 <sup>VP</sup> (effective publication : Weiss, Schillinger and Kandler 1983b, 556). Esta cepa es aislada principalmente de plantas y materiales fermentados a altas temperaturas (48-53° C).

Notas:

AL: Significa la inclusión de éste nombre en "The approved of lists of bacterial names".

VP: Significa que este nombre ha sido publicado con validez en la revista oficial "International Journal of Sistematic Bacteriology" (41).

Tabla. 6 PATRON DE CARBOHIDRATOS FERMENTABLES DE LA ESPECIE  
L. delbrückii.

	FERMENTACION
Amigdalina	-
Arabinosa	+
Celobiosa	d
Esculina	-
Fructosa	+
Galactosa	-
Glucosa	+
Gluconato	-
Lactosa	-
Maltosa	d
Manitol	-
Manosa	+
Melekitosa	-
Melibiosa	-
Rafinosa	-



Cont.

CARBOHIDRATO

FERMENTACION

Ramnosa	-
Ribosa	-
Salicina	-
Sorbitol	-
Sacarosa	+
Trehalosa	d
Xilosa	-

Símbolos: (+) Positivo para el 90% ó más de las cepas.

(-) Negativo para el 90% ó más de las cepas.

(d) Positivo para el 11-89% de las cepas. (41)

Tabla 7.

Caracterfsticas fisiológicas y bioquímicas de L. delbrückii.

Tipo de peptidoglicana (b)	Lys-D-Asp
Acido Teicoico	Glicérol
Movilidad electroforética (c)	1.5
% de G+G mol	49-51
Isómero (d)	D(-)
Crecimiento a 15° C	(-)
Amoníaco de arginía	+/-

- Notas:
- b. Abreviaturas usadas por Schleifer y Kandler (1972).
  - c. Determinada en electroforésis de discos de gel de poliacríla--  
mida pH 7.5.
  - d. El isómero tiene esa configuración en 90% ó más de su total.
- +/- De 11 a 89% de cepas positivas. (41)

C A P I T U L O . I I I  
P A R T E    E X P E R I M E N T A L

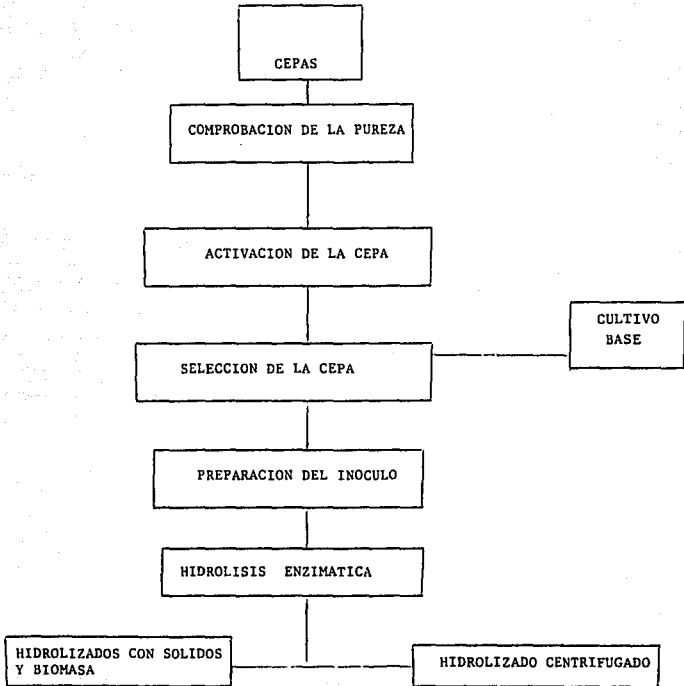
La obtención de ácido láctico se realizó en dos procesos secuenciales, una fermentación amilolítica, fase I, donde se hidrolizaron los almidones a glucosa mediante glucoamilasas fungicas de A.niger y una fermentación láctica, fase II, donde se fermentó la glucosa obtenida de la fase I, hasta ácido láctico mediante L. delbrückii.

Los microorganismos empleados fueron :

1) Una cepa de Aspergillus niger seleccionada de un grupo de 6 cepas, existentes en el cepario de la Facultad de Química, U.N.A.M. por -- presentar la mayor capacidad fermentativa en el menor tiempo posible (cuadro Número 1 )

2) Una cepa de Lactobacillus delbrückii ATCC-9649 obtenida del laboratorio de colección de cepas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV, I.P.N. caracterizada como una cepa productora de ácido láctico.

FASE I.- FERMENTACION AMILOLITICA. DIAGRAMA DE TRABAJO



Esquema (3)

3.1.

FASE I.- FERMENTACION AMIOLITICA.

Las 6 cepas de A. niger se sembraron cada una en tubos inclinados con medio de Agar Sabouraud y se incubaron durante siete días a 28°C en todas ellas se verificó su pureza mediante microcultivos y observación de las características macroscópicas de las colonias. Para su conservación los cultivos se mantuvieron en refrigeración.

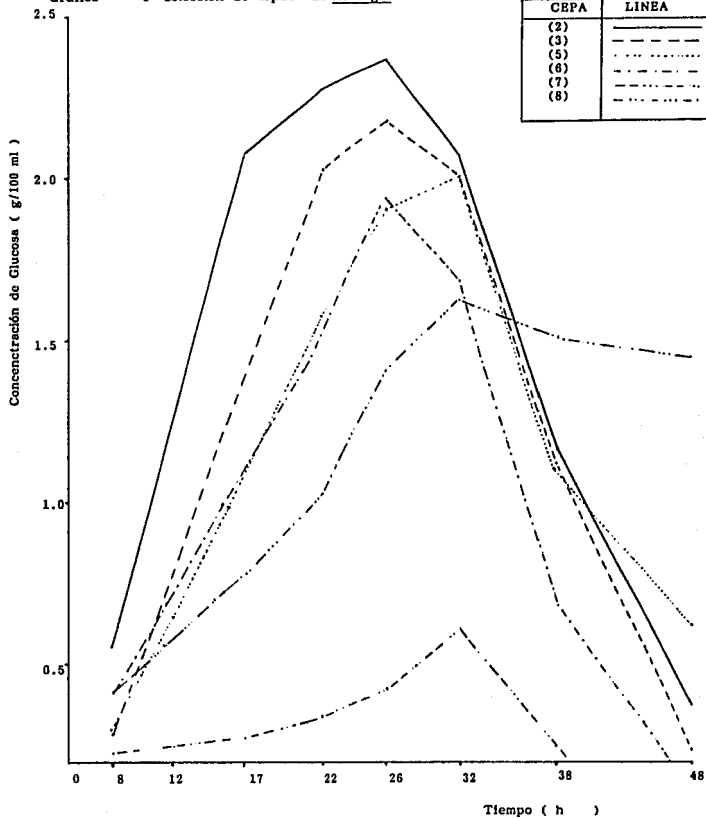
Con el fin de comprobar la actividad amilolítica de las cepas, estas se activaron mediante la siembra en 50 ml de medio de Agar Sabouraud - contenidos en matraces Erlenmeyer de 300 ml. Después de 7 días de incubación se preparó una suspensión de esporas con solución de Tween 80 al 1%; ajustando el número total de esporas aproximadamente  $80 \times 10^6$  esporas / ml utilizando para ello la cámara de Neubauer (pág. 90). De cada suspensión se adicionaron 4 ml a matraces Erlenmeyer de 300 ml que contenían 100 ml de medio de papa (pág. 77), el cual se incubó durante 24 horas a 28°C con agitación de 200 rpm para obtener el inóculo, de éste inóculo al medio de papa se le adicionó un inóculo del 10% v/v de cada cepa de A. niger y se incubó a 28°C con agitación 200 rpm observándose la actividad enzimática del hongo, mediante la cuantificación de la glucosa liberada en el medio cada 12 horas. La cepa seleccionada fue aquella que produjo mayor cantidad de glucosa en el menor tiempo.

Tabla. 8

RESULTADOS DE LA SELECCION DE CEPAS DE A. NIGER.

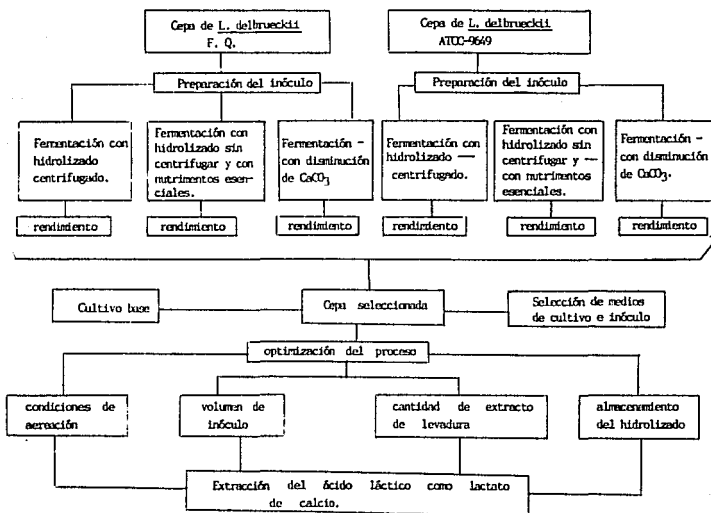
T I E M P O H R S.	CONCENTRACION DE GLUCOSA LIBERADA $\mu$ / 100 ml					
	C E P A S					
	2	3	5	6	7	8
0	-	-	-	-	-	-
8	0.55	0.28	0.29	0.41	0.23	0.41
17	2.07	1.36	1.07	0.84	0.27	0.78
22.5	2.27	2.00	1.57	1.50	0.33	1.03
26.5	<u>2.36</u>	<u>2.17</u>	1.90	<u>1.93</u>	0.42	1.40
32.0	2.06	2.00	<u>2.00</u>	1.68	<u>0.61</u>	<u>1.62</u>
38.5	1.15	1.12	1.10	0.68	0.25	1.50
48	0.37	0.24	0.62	0.10	0.20	1.44

Gráfica 1 Selección de Obpas de A. niger





FASE II. FERMENTACION LACTICA. DIAGRAMA DE TRABAJO.



Esquema (4)

### 3.2.

#### FASE II. FERMENTACION LACTICA

La segunda fase del trabajo consistió en fermentar los azúcares -- obtenidos en la fase I hasta ácido láctico mediante la acción metabólica de -- las bacterias lácticas.

Se compararon 2 cepas de Lactobacillus delbrueckii, una procedente del cepario de la Facultad de Química U.N.A.M. utilizada en un trabajo previo y una cepa de colección ATCC-9649, con estas cepas se prepararon los -- respectivos inóculos y se realizaron las fermentaciones del hidrolizado de --- papa, de acuerdo con las condiciones establecidas en el trabajo anterior (26). Como no se obtuvieron resultados satisfactorios se modificó la composición -- del medio original. El hidrolizado de papa no fue centrifugado, se usó con el total de sólidos incluyendo la biomasa se le agregaron los nutrimentos necesarios para el desarrollo de los lactobacilos y se redujo la cantidad de ---  $\text{CaCO}_3$ , debido a que la cantidad establecida de esta sal incrementaba el pH en el curso de la fermentación lo que provocaba inhibición en el metabolismo de las bacterias lácticas, encontrándose como cantidad adecuada un 2% de -  $\text{CaCO}_3$ .

Las condiciones utilizadas en estas fermentaciones fueron las si--- guientes: Temperatura 45°C, pH inicial 6.0, pH durante el proceso 4.5, -- inóculo 20%.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó la cepa de L. delbrueckii ATCC 9649.

Tabla (9) CUADRO DE RESULTADOS EN LA COMPARACION DE CEPAS DE L. Delbrueckii FQ. Y ATCC-9649

C E P A	GLUCOSA INICIAL (g/100 ml)	GLUCOSA FINAL (g/100 ml)	ACIDO LACTICO (g/100 ml)	RENDIMIENTO (%)
---------	----------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------

Condiciones de fermentación: T° 45°C, pH inicial 6.0, pH proceso 4.5, ----  
inóculo 20%

#### OPTIMIZACION DEL PROCESO

Con el fin de optimizar las condiciones de fermentación se reali---  
zaron las siguientes variaciones: disponibilidad de volumen de aire, disminu  
ción de la cantidad de extracto de levadura.

Para establecer cada uno de estos parámetros se realizaron fer---  
mentaciones por triplicado bajo las condiciones indicadas en cada caso con -  
la valoración de glucosa y ácido láctico formadas.

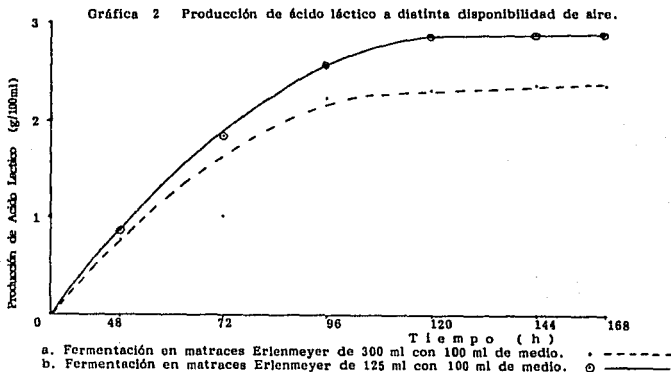
Los valores encontrados se reportan como promedio de las tres --  
determinaciones. (Tabla No. 10).

DISPONIBILIDAD DE AIRE

Para disminuir la columna de aire y así bajar su disponibilidad, las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 100 ml de medio.

Tabla ( 10 ) Disponibilidad de Aire

Medio (ml)	Matraz (ml)	Inóculo (%)	Ext. de Levadura (%)	Glucosa Inicial (g/100ml)	Glucosa Final (g/100ml)	Acido Láctico (g/100ml)	Rendimiento to. (%)
100	300	20	2.0	5.31	2.9	2.31	43.83
100	125	20	2.0	5.31	2.5	2.71	53.08



### CANTIDAD DE INOCULO

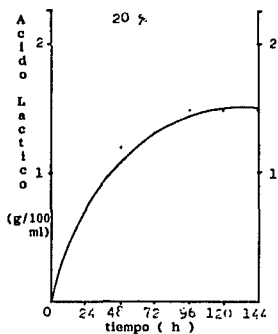
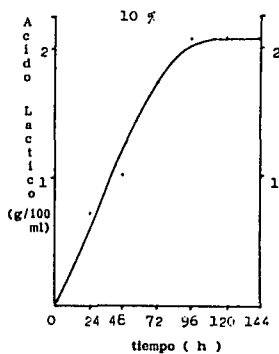
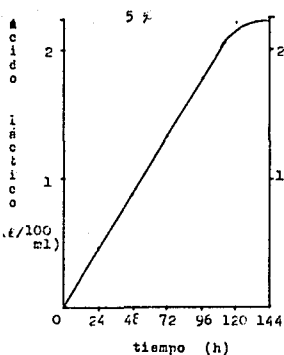
Se hicieron fermentaciones probando 20,10 y 5% de inóculo.

Tabla ( 11 ) Cantidad de inóculo

Medio (ml)	Matraz (ml)	Inóculo (%)	Ext. de Levadura	Glucosa Inicial (g/100 ml)	Glucosa Final (g/100ml)	Acido Láctico (g/100ml)	Rendimiento (%)
100	125	20	2.0	3.48	1.97	1.49	42.0
100	125	10	2.0	3.48	1.40	2.06	60.0
100	125	5	2.0	3.48	1.25	2.21	64.4

C. AFICA

3. Producción de ácido láctico con diferentes concentraciones de inóculo.



CANTIDAD DE EXTRACTO DE LEVADURA

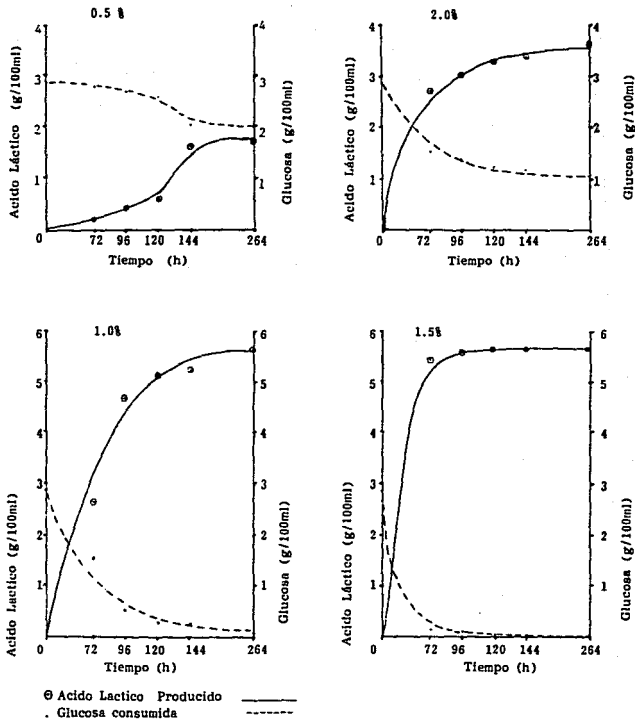
La cantidad óptima de extracto de levadura se determinó realizando fermentaciones en las que se varió la concentración de esta en 2.0; 1.5; 1.0 y 0.5%.

Tabla ( 12 ) Cantidad de extracto de levadura

Medio (ml)	Matraz (ml)	Inóculo (%)	Ext. de Levadura (%)	Glucosa Inicial (g/100ml)	Glucosa Final (g/100ml)	Acido Láctico (g/100ml)	Rendimiento (%)
100	125	5	0.5	2.99	2.77	0.21	7.31
100	125	5	1.0	2.99	0.43	2.46	85.80
100	125	5	1.5	2.99	0.37	2.70	<u>90.59</u>
100	125	5	2.0	2.99	1.03	1.92	64.40

GRAFICA 4

PRODUCCION DE ACIDO LACTICO Y CONSUMO DE GLUCOSA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE LEVADURA.





## DISPONIBILIDAD DE LA ESTABILIDAD DEL HIDROLIZADO DE PAPA A DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO

Con el fin de conocer si es posible mantener el hidrolizado de papa inalterable para su uso en una fermentación posterior se determinó su estabilidad a 30, 60 y 90 días de almacenamiento en refrigeración. Para ello el hidrolizado enzimático de papa se dividió en tres lotes y se sometió a los tratamientos siguientes :

Matraces Erlenmeyer de 300 ml almacenados por 30 días

Matraces Erlenmeyer de 300 ml almacenados por 60 días

Matraces Erlenmeyer de 300 ml almacenados por 90 días

A cada uno de estos lotes se le determinaron concentraciones de glucosa iniciales y finales, nitrógeno, pH, color y esterilidad al tiempo 0 y al tiempo final de su almacenamiento. Después el contenido de cada lote se utilizó para preparar el medio 4-II (Pág. 80) el cual fué colocado en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 100 ml de dicho medio. Las condiciones de fermentación que se sometieron fueron iguales inóculo del 5% concentración de extracto de levadura 1.5%, pH inicial 6.0 y pH durante el proceso 4.5.

Tabla ( 13 ) Fermentación del hidrolizado de papa almacenada a diferentes intervalos de tiempo.

Tiempo de Almacenamiento (días)	Glucosa Inicial (g/100ml)	Glucosa Final (g/100ml)	Acido Láctico (g/100ml)	Rendimiento (%)
0	2.5	0.35	2.14	85.8
30	2.5	0.90	1.58	63.2
60	2.5	1.36	1.13	45.3
90	2.5	1.73	0.77	32.6

Tabla 14. ESTABILIDAD DEL HIDROLIZADO DE PAPA A DIFERENTES PERIODOS DE ALMACENAMIENTO

I. Valores de glucosa. Concentración (g/100 ml).

<u>TIEMPO DE ALMACENAMIENTO</u>			
0 Días	30 días	60 días	90 días
3.95	3.83	-	-
3.95	3.86	3.71	-
3.95	3.83	3.73	3.44

II. Valores de Nitrógeno. Concentración (mg/100 ml)

<u>TIEMPO DE ALMACENAMIENTO</u>			
0 Días	30 días	60 días	90 días
15.96	16.00	-	-
15.96	15.96	15.97	-
15.96	15.96	15.97	15.97

III. Valores de pH

0 días	<u>TIEMPO DE ALMACENAMIENTO</u>		
	30 días	60 días	90 días
6.0	6.0	-	-
6.0	5.9	5.9	-
6.0	6.0	5.9	5.9

IV. Apariencia y color.

En el transcurso de la experimentación se observó que el hidrolizado de papa varia según el tipo de papa utilizada, sin embargo, en los matraces almacenados no se presentó ningún cambio aparente en aspecto o color. En todo el tiempo de almacenamiento el hidrolizado conservó siempre su consistencia gelatinosa y su color café claro característico.

Tabla. (15) COMPARACION DE RESULTADOS POR LOTE

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (días)	GLUCOSA (g/100 ml)	NITROGENO (g/100 ml)	pH	APARIENCIA COLOR
0	3.95	15.96	6.0	sin cambio
30	3.83	16.00	6.0	sin cambio
0	3.95	15.96	6.0	sin cambio
30	3.86	15.96	5.9	sin cambio
60	3.71	15.97	5.9	sin cambio
0	3.95	15.96	6.0	sin cambio
30	3.83	15.96	6.0	sin cambio
60	3.73	15.97	5.9	sin cambio
90	3.44	15.97	5.9	sin cambio

Tabla. (16)

## RESUMEN DE RESULTADOS

FERMENTACION		RENDIMIENTO EN AC. LACTICO (%)
I	CONDICIONES RECOMENDADAS	43.63
	. Condiciones aerobias	
	. 20% de inóculo	
	. 2% de extracto de levadura	
II	DISPONIBILIDAD DE AIRE	
	. condiciones aerobias	43.63
	. Condiciones microaerobias	53.08
III	CONDICIONES MICROAEROBIAS	
	VOLUMEN DE INOCULO	
	. 20%	53.08
	. 10%	60.00
	. 5%	64.40
IV	CONDICIONES MICROAEROBIAS	
	5% DE INOCULO	
	% DE EXTRACTO DE LEVADURA	
	2.0	64.40
	1.5	<u>90.59</u>
	1.0	<u>85.80</u>
	0.5	7.31
V	CONDICIONES SELECCIONADAS	90.59
	. Condiciones microaerobias	
	. 5% de inóculo	
	. 1.5% de extracto de levadura	

### 3.3 EXTRACCION DEL ACIDO LACTICO COMO LACTATO DE CALCIO

Para extraer el ácido láctico como lactato de calcio, el medio fermentado se calentó a baño maría a 60°C y se filtró al vacío, lavando los sólidos retenidos en el papel con pequeñas porciones de agua caliente, que se unieron al primer líquido filtrado, luego de lo cual se eliminaron los sólidos. Posteriormente se ajustó el pH a 5-6 usando unas gotas de ácido láctico Q.P.

Con el propósito de decolorar la solución, se mantuvo caliente en baño maría y se le adicionaron pequeñas porciones de carbón activado, agitando luego de cada adición, al final se filtró para eliminar el carbón. (3,31)

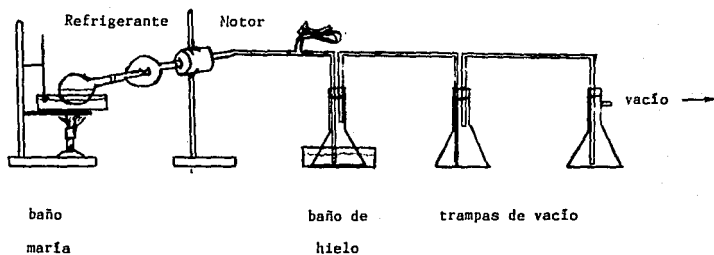
Si el filtrado presentaba algún color se ajustaba el pH a 7-8 por la adición de pequeñas cantidades de  $\text{CaCO}_3$ , después se añadía más carbón activado en pequeñas porciones agitando constantemente el medio, posteriormente se filtró para eliminar el carbón y el carbonato, el proceso se repitió hasta que el filtrado no presentó color.

Una vez decolorado el filtrado, se concentró al vacío utilizando un rotavapor, hasta obtener una concentración de 15° brix, se pasó a un cristallizador, dejándose toda la noche en refrigeración para la cristalización del lactato de calcio. (3,15)

Los cristales de lactato de calcio se lavaron 2-3 veces con pequeñas porciones de agua destilada fría, estos lavados se guardaron para una segunda concentración al vacío y los cristales así obtenidos fueron unidos a los primeros, ya juntos se lavaron nuevamente con pequeñas porciones de agua destilada y de acetona, estas aguas de lavado se desecharon. Los cristales de lactato de calcio se secaron a 30-60°C durante una hora y se molieron a polvo fino.

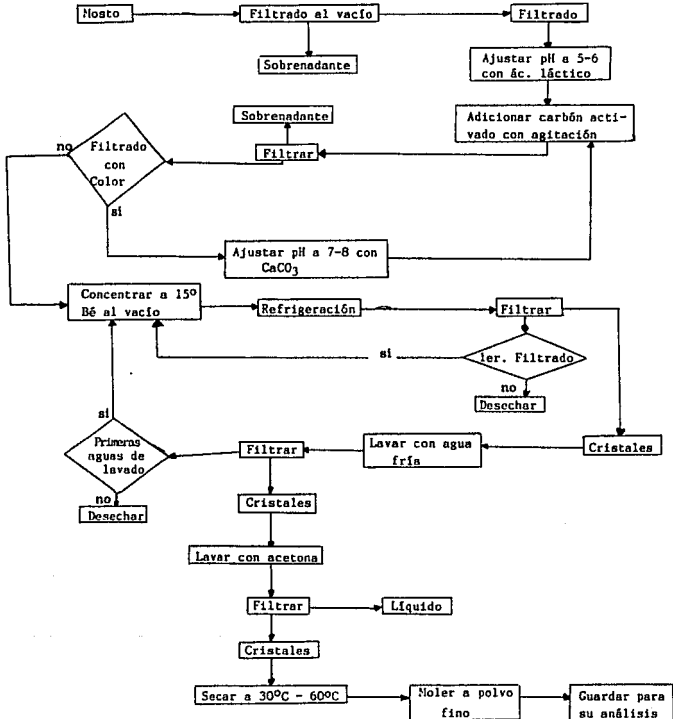
Los cristales así obtenidos se les siguieron los ensayos para lactato de calcio siguientes : apariencia, solubilidad, acidéz, valoración como lactato de calcio, coloración, metales pesados y estabilidad, según las especificaciones de la U.S.P. XV. También se le determinó su punto de fusión.

SISTEMA AL VACIO PARA LA EXTRACCION DEL ACIDO LACTICO



Esquema (5)

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA OBTENCION DE LACTATO DE CALCIO



Esquema (6)



Tabla. (17) ENSAYOS DEL LACTATO DE CALCIO. (49)

PRUEBA	ESPECIFICACION U.S.P.	RESULTADOS DE LA MUESTRA
1. Apariencia	- Polvo cristalino blanco	- Polvo cristalino blanco lg. amarillento
2. Solubilidad en agua fría al 20%	- Poco soluble	- Poco soluble
3. Solubilidad en agua caliente al 20%	- Soluble	- Soluble
4. Solubilidad en alcohol frío	- Poco soluble	- Poco soluble
5. Solubilidad en alcohol caliente	- Algo soluble	- Algo soluble
6. Solución acuosa 20% calentado ligeramente	- Solución transparente	- Solución transparente
7. Solución acuosa 20% más fenolf.	- Solución transparente	- Solución transparente
8. Metales pesados		
a) Soln. Aq. 20% + Acético dil.	- La solución no se altera	- La solución no se altera
b) Soln. Aq. 20% + Na <sub>2</sub> S	- La solución no se altera	- La solución no se altera
9. Soln. Aq. 20% + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /Ba (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	- La solución no se altera	- La solución no se altera
10. Soln. acuosa 20% + ferricianuro - de potasio	- La solución permanece transparente	- La solución permanece transparente
11. Acidez. Titulación de solución Aq. 20%+fenolftaleína.	- Se necesitaron 0.5 ml de NaOH 0.1 N para enrojecer la solución	- Se necesitaron 0.5 ml de NaOH 0.1 N para enrojecer la solución.
12. Soln. Aq. 20% + HNO <sub>3</sub> + AgNO <sub>3</sub> (soln.)	- La solución no se enturbia	- La solución no se enturbia
13. Arsénico. 1 g de lactato + 3ml Hipofosfito de sodio. 15' B.M.	- La solución no se enturbia	- La solución no se enturbia
14. Punto de fusión	- 100°C	- 113°C

Los datos anotados son resultado de tres determinaciones hechas por triplicado.

**DISCUSION DE RESULTADOS**

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## DISCUSION DE RESULTADOS

### 1.- Selección de cepas de A. niger

Todas las cepas de A. niger ensayadas, presentaron la mayor actividad amilolítica entre las 26.5 y 32 h de fermentación. Se seleccionó la cepa No. 2 por ser la mejor productora de glucoamilasa en el menor tiempo como se aprecia en la gráfica No. 1. Esta cepa fué utilizada para realizar las subsecuentes fermentaciones amilolíticas.

2.- Resultados de fermentación de L. delbrüeckii ATCC-9649 en un medio de composición conocida y en un hidrolizado enzimático de papa.

Al comparar la fermentación láctica del hidrolizado de papa y un medio de referencia, se observó que aunque los rendimientos de ácido láctico son comparativamente bajos respecto a lo reportado en la literatura científica, la diferencia entre ellos no es significativa, lo que indica que el hidrolizado de papa es un buen sustrato para realizar la fermentación láctica pero que en esas condiciones aún no se han alcanzado las condiciones óptimas de fermentación.

### 3.- Disponibilidad de Aire

Esta fué la primera variación hecha al sistema de fermentación láctica con el fin de optimizarlo. Al disminuir la disponibilidad de aire, los rendimientos en el ácido láctico se incrementaron al favorecer el metabolismo microaerobio de las bacterias.

### 4.- Disminución de la cantidad de inóculo

Al disminuir la cantidad de inóculo a 5% los rendimientos en ácido láctico aumentaron.

5.- Cantidad de extracto de levadura

Se demostró que las necesidades de los lactobacilos por el extracto de levadura tienen un punto óptimo, que para estas condiciones fué de 1.5% como lo sugiere también Ohleyer et. al. (30), y que este nutrimento a concentraciones altas o bajas de su punto óptimo origina la inhibición del metabolismo de la bacteria.

6.- Resumen de resultados

La fermentación en las condiciones recomendadas nunca dió rendimientos mayores al 50% . Variando esas condiciones y seleccionando las óptimas en : microaerófila, de inóculo 5% y de extracto de levadura 1.5% se lograron rendimientos en ácido láctico hasta el 90%.

7.- Fermentación de hidrolizado almacenado en diferentes períodos de tiempo.

El hidrolizado de papa es afectado por el tiempo de almacenamiento, los rendimientos de ácido láctico se vieron disminuidos conforme aumentó este tiempo.

8.- Estabilidad del hidrolizado de papa a diferentes períodos de almacenamiento.

El hidrolizado de papa obtenido de la fermentación amilolítica y almacenado por diferentes períodos de tiempo presentó disminución de la concentración de glucosa que se acentuó con el tiempo de almacenamiento, con una consecuente variación en los valores de pH del orden de decimas de unidad ( apenas perceptible ). Mientras que la concentración de nitrógeno no tuvo variación.

9.- Ensayo de lactato de calcio

Los resultados obtenidos en los análisis del lactato de calcio son congruentes con los reportados en la literatura (19,49). El punto de fusión ligeramente elevado sugiere la presencia de alguna impureza en la muestra.

R E S U M E N

La papa se hidrolizó mediante la acción de glucoamilasa producida por Aspergillus niger. Se seleccionó la mejor cepa productora de la enzima.

El hidrolizado se enriqueció con extracto de levadura e inóculo con Lactobacillus delbrueckii, procediéndose a variar ciertos parámetros de la biosíntesis tales como el pH, la disponibilidad de aire, concentraciones de extracto de levadura e inóculo, a fin de optimizar el rendimiento de ácido láctico, el cual se cuantificó por el método de Nanni-Baldini y se separó en forma de lactato de calcio.

El rendimiento de glucosa en la hidrólisis del almidón de papa, fluctuó alrededor del 85%. El mayor rendimiento de ácido láctico fue de 90%, bajo las siguientes condiciones de fermentación: pH inicial 6.0, microaerófila, concentración de extracto de levadura 1.5% y concentración de inóculo 5.0%.

**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que :

El hidrolizado enzimático de papa es un buen sustrato para la obtención de ácido láctico. El proceso de fermentación láctica debe ser al término de la hidrólisis enzimática pues su almacenamiento no reportó los resultados deseados.

Las condiciones óptimas encontradas para la fermentación láctica con este trabajo son : cepa : Lactobacillus delbrückii ATCC-9649

volumen de inóculo : 5% v/v

extracto de levadura : 1.5%

carbonato de calcio : 2.0%

disponibilidad de aire: condiciones microaeróbias

azúcares iniciales 3-4 g/100 ml

azúcares residuales : 0.05-0.09 g/100 ml

temperatura : 45°C

pH inicial : 6.0

pH proceso : 4.5

La extracción del lactato de calcio por el método empleado en este trabajo fué adecuada, dada la sencillez y buen rendimiento del método.



## RECOMENDACIONES

- 1.- Se recomienda ampliar los estudios sobre los métodos de extra  
cción del ácido láctico.
- 2.- Por el interés industrial que este trabajo puede presentar, se  
recomienda escalar el proceso a volúmenes mayores a nivel laboratorio y planta  
piloto y ampliar los estudios sobre el uso de levadura de cerveza de desecho-  
como posible sustituto del extracto de levadura en la fermentación láctica.
- 3.- Para la fermentación láctica se recomienda hacer pruebas del -  
proceso en cultivo continuo.

B I B L I O G R A F I A

1. Alexopoulos, C. J (1979)  
" Introductory micology "  
John Wiley and Sons. Third edition, New York.  
p. 291 - 294
  
2. Anuario FAO de Producción. (1985)  
FAO. ONU. vol. 39, Roma, Italia p. 126
  
3. Brewster, R. Q. (1970).  
" Curso práctico de Química Orgánica "  
Ed. Alhambra, Madrid.
  
4. Cabrera, S.J. (1980).  
" La Producción de papa en México "  
Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.  
Programa de papa, México, D.F.  
p. 1-15.
  
5. Casida, L. E. Jr. (1980).  
" Industrial Microbiology "  
John Wiley and Sons. Inc. New York  
p. 304 - 313

6. Catálogo de Medios de Cultivo y Reactivos. (1986).  
CINVESTAV. I.P.N. México, D.F.
  
7. Christiansen, A. (1980)  
" Utilización de la papa "  
Memorias del Curso Tecnología de la papa, Honduras, C.A.  
p. 2 - 5
  
8. Copius, J.W. (1969)  
" Foodstuffs and their additives " in " Thin-Layer Chromatography  
a Laboratory Handbook "  
Ed. By, Stahl. Egon, New York.
  
9. Cordon, T.C. et. al. (1950)  
" Lactic acid from potatoes "  
Ind. and Eng. Chem. V. 42, Núm. 9, p.p. 1983 -1986
  
10. Davis, B.; Dulbecco, R. et. al. (1978)  
" Tratado de Microbiología ".  
Salvat Editores, S.A. 2a. Ed. Barcelona, España .
  
11. Dawes, B.T. Sutherland, D.I. (1976)  
" Fisiología de los microorganismos "  
H. Blume Ediciones, Madrid, España.

12. Difco Laboratories (1953).  
" Difco Manual of dehydrated Culture media and reagents for micro-  
biological and clinical Laboratory Procedures".  
Ninth ed., Detroit, Michigan. U.S.A.
  
13. Dirección General de Economía Agrícola, S.A.R.H. (1980)  
" Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos "  
Editado por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática,  
México, D.F.  
P. 177 y 178.
  
14. Dirección General de Economía Agrícola, S.A.R.H. ( 1981)  
" Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos "  
Editado por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática,  
México, D.F.  
P. 168 - 169.
  
15. Echegaray, A. A. (1951)  
" Fermentación de los Mieles Incristalizables por un Lactobacillus del --  
pulque "  
Tesis de Q.B.P. Esc. Nac. de Ciencias Biológicas.  
I.P.N., México, D.F.
  
16. Facultad de Química, U.N.A.M. (1980)  
" Prácticas del Curso : Análisis Bioquímico-Clinico "  
Editado por U.N.A.M., México, D.F.

17. Filachione, E. W.; Fisher, C. H. (1946).  
" Purification of Lactic Acid, Production of Methyl Lactate from aqueous solution of crude acid "  
Ind. and Eng. Chem. V. 38, Núm. 2, P. 228 - 232
  
18. Garret, J. F. (1930).  
" Lactid Acid "  
Ind. and Eng. Chem. V. 22, Núm. Jul-Dic, P. 1153 - 1154
  
19. Giral F. (1946)  
" Productos Químicos y Farmacéuticos " V. I  
Ed. Atlants, S.A. , México, D.F.  
P. 530 - 533
  
20. Hoeckeldull, D.J.D. (1960)  
" Progress in Industrial Microbiology " V. II  
Ed. By Heywood Co. L.T.D. London.  
P. 3 - 20
  
21. Inkeep, G., Taylor, G. G. (1952)  
" Lactic Acid from corn sugar "  
Ind. and Eng. Chem. V. 44, Núm. 9  
P. 2955 -2966.

22. Kandler, O. ( 1982)  
" Mechanisms of lácric ácid fermentation by lácric ácid bacteria ".  
Forum Mikrobiologie 5:16, P. 16 - 22.
  
23. Kirk-Othmer (1961)  
" Enciclopedia de Tecnología Química " V. IX  
Primera ed. Español, U.T.E.A.  
P. 818 - 831
  
24. Lehninger, A. (1978)  
" Bioquímica "  
Ed. Omega, 2a. Edición, Barcelona, España.
  
25. London, J. (1976)  
" The Ecology and Taxonomic Status of the Lactobacilli "  
Ann. Rev. Microbiol. 30: P. 279 - 301
  
26. Maldonado, V. A.; Garduño, T.L. (1984)  
" Biosíntesis Microbiana del ácido láctico a partir de papa "  
Tesis de Q.F.B., Fac. de Química, U.N.A.M.  
México, D.F.
  
27. Norris, J. R.; Ribbons, D. W. (1970)  
" Methods in Microbiology " V. 4  
Academic Press, London and New York.  
P. 33

28. Norris, J. R. : Ribbons, D. W. (1970)  
" Methods in Microbiology " V. 5 - B  
Academic Press, London and New York.  
P. 265 - 270
  
29. Norris, J. R. : Ribbons, D. W. (1970)  
" Methods in Microbiology V. 6 - A  
Academic Press, London and New York,  
P. 155 - 178
  
30. Ohleyer E; Wilke, C. R. Blanch, HW. (1985).  
" Continuous Production of Lactic Acid from Glucosa and Lactose  
in a Cell-Recycle Reactor "  
Appl. Biochem. and Biotechnol.  
V. 11 P. 457 - 463
  
31. Pavia, D. L. (1976)  
" Introduction to Organic Laboratory Techniques "  
W. B. Sanders, Co. Philadelphia.
  
32. Peppler, H. J. (1977)  
" Microbial Technology "  
2a. Ed., Robert E. Krieser Publishing Co. New York.  
P. 407 - 409

33. Prescott, S. C. (1959)  
" Industrial Microbiology "  
Mc. Graw Hill, Book, Co. Inc.  
P. 304 - 307
  
34. Randerath, K. (1965)  
" Thin-Layer Chromatography "  
Academic Press, London and New York
  
35. Rose, A. H. (1961)  
" Industrial Microbiology "  
Ed. By Butterworths, Co. Londres, Inglaterra  
P. 172 - 177
  
36. Sánchez, M. A. (1961)  
" Principios de Microbiología Industrial "  
Editado por la Facultad de Química, U.N.A.M., México, D.F.  
P. 187 - 192
  
37. Schindell, W. (1983)  
" Producao de Amiloglucosidase por *Aspergillus* " en  
Biotecnología de Enzimas, Dpto. de Biotecnología, U.N.A.M.  
P. 54 - 67



38. Simpson, F. J. (1977)  
" Lactid Acid "  
The Enciclopedia of Since E. Technology, V. 7  
Mc. Graw-Hill Book Co. New York, U.S.A.  
P. 426 - 428
39. Smith, L. T. (1939)  
" The Production of Pure Lactic Acid "  
Ind. and Eng. Chem. V. 17, P. 641
40. Smith, L. T. ; Claborn, H. V. (1939)  
" Utilization of Lactic Acid "  
Ind. and Eng. Chem. V. 17, P. 370 - 371
41. Smeath, P. (1984)  
" Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology " V. 2  
Williams & Wilkins Baltimore, 9a. Edición, U.S.A.  
P. 1208 - 1223
42. Society of American Bacteriologist ( 1957 )  
" Manual of Microbiological Methods "  
Mc. Graw-Hill Book Co., New York
43. Subdirección de Investigación Económica y Bancaria ( 1982 )  
" Importación de Fracciones Arancelarias y Paises de Origen "  
Banco de México, S.A. , México, D.F.

44. Subdirección de Investigación Económica y Bancaria ( 1983 )  
" Importación de Fracciones Arancelarias y Países de Origen "  
Banco de México, S.A. México, D.F.
  
45. Subdirección de Investigación Económica y Bancaria ( 1984 )  
" Importación de Fracciones Arancelarias y Países de Origen "  
Banco de México, S.A., México, D.F.
  
46. Subdirección de Investigación Económica y Bancaria ( 1985 )  
" Importación de Fracciones Arancelarias y Países de Origen "  
Banco de México, S.A., México, D.F.
  
47. Subdirección de Investigación Económica y Bancaria ( 1986 )  
" Importación de Fracciones Arancelarias y Países de Origen "  
Banco de México, S.A., México, D.F.
  
48. Subdirección de Investigación Económica y Bancaria ( 1987 )  
" Importación de Fracciones Arancelarias y Países de Origen "  
Banco de México, S.A., México, D.F.
  
49. U.S.P.  
United States Pharmacopoeia  
XV Revisión, U.S.A.

50. Velázquez, R. et. al. ( 1984 )  
" Ecology of Lactic Fermentations of Starch Food "  
Lactic Fermentation in the Food Industries Symposiums Memories  
Ed. by Depto. de Biotecnología, U.A.M., México, D.F.
51. William, G. W. ( 1980 )  
" Introducción a la Microbiología  
Ed. C.E.C.S.A., México, D.F.  
P. 55 - 57
52. Woot, T. W. L. ( 1978 )  
" Tabla de Composición de Alimentos para uso en América Latina "  
Ed. Interamericana, México, D.F.

A P E N D I C E

M E D I O   D E   P A P A

Suspensión de papa	100 ml.
Na NO <sub>3</sub>	0.364 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.109 g.
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.1025 g.
KCl	0.0057 g.
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.0027 g.
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.00024 g.
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0.00021 g.
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	0.00019 g.

SUSPENSION DE PAPA

300 g de papa previamente lavada y cortada en cuadritos chicos se pasa a un recipiente, se agregan 800 ml de agua destilada, se deja en ebullición a fuego lento hasta obtener una suspensión homogénea, a continuación se determinan carbohidratos totales por el método de antrona ajustando entre 4 - 5%. (26,28,31)

Medio de cultivo No. 3 (26)

Extracto de levadura	2.0 g.
Glucosa	2.0 g.
Sol. "A" de sales	0.88 ml.
Sol. "B" de sales	0.74 ml.
H <sub>2</sub> O destilada	100.0 ml.

Se disuelven los ingredientes en agua y se ajusta el pH entre - 5.5 - 6.0, se esteriliza a 120°C durante 15 minutos.

Sol. "A" de sales		Sol. "B" de sales minerales	
HgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	10.0 g.	Acetato de sodio	12,5 g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.5 g	Tween 80	0.6 g
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0.5 g.	H <sub>2</sub> O	100.0 ml
H <sub>2</sub> O	100.0 ml		

Medio de cultivo No. 26 (6)

Leche descremada (skim milk)	100.0 g
Jugo de tomate	100.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Filtrar el jugo y dejar toda la noche a 10° C; ajustar el pH a - 7.0 y esterilizar a 15 lb/15 minutos.

MEDIO DE FERMENTACION No. 3 (26)

Glucosa	4.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
CaCO <sub>3</sub>	2.0 g
Sol. "A" de sales minerales	0.88 ml
Sol. "B" de sales minerales	0.74 ml

Se disuelven los ingredientes en agua y se ajusta el pH entre -  
5.5 - 6.0, se esteriliza a 120° C durante 15 minutos.

MEDIO DE FERMENTACION No. 4

Hidrolizado de papa centrifugado	100.0 ml
Extracto de levadura	2.0 g
CaCO <sub>3</sub>	5.0 g

Se disuelven los ingredientes en el hidrolizado y se ajusta el ----  
pH 5.8 - 6.1, se esteriliza a 120°C durante 15 minutos.

Medio de Fermentación No. 4-I

Hidrolizado de papa con sólidos	100.0 ml
Extracto de levadura	2.0 g
CaCO <sub>3</sub>	5.0 g
Sol. "A" de sales minerales	0.88 ml
Sol. "B" de sales minerales	0.74 ml

Se disuelven los ingredientes en el hidrolizado y se ajusta el pH entre 5 - 6 con ácido sulfúrico diluido al 25%, se esteriliza durante 15 minutos a 120° C

Medio de Fermentación No. 4-II

Hidrolizado de papa con sólidos	100.0 ml
Extracto de levadura	2.0 g
CaCO <sub>3</sub>	2.0 g
Sol. "A" de sales de minerales	0.88 ml
Sol. "B" de sales minerales	0.74 ml

Se disuelven los ingredientes en el hidrolizado y se ajusta el pH entre 5 -6 con ácido sulfúrico diluido al 25%, se esteriliza a 120° C durante 15 minutos.



## M E T O D O S

### DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS TOTALES. (28)

#### Método de antrona

##### Fundamento :

- A. Hidrólisis de los polisacáridos a monosacáridos.
- B. Deshidratación y rearreglo de los monosacáridos a la forma furfural, a partir de pentosas o hidroximetilfurfural a partir de hexosas.
- C. Reacción del furfural o hidroximetilfurfural con el desarrollador de color, para formar un compuesto colorido que se determina espectrofotométricamente.

Los carbohidratos dan un color verde característico con antrona y calentando en una solución de ácido sulfúrico. El color es debido a la condensación de la antrona con los derivados de furfural a partir de los azúcares en ácido caliente. La forma antronal es la que reacciona.

##### REACTIVOS :

1. Solución patron de glucosa ( 1.0 mg/ml en una solución al 0.15% de ácido benzoico), es estable por largos períodos de tiempo a 0° C.
2. Solución base de ácido sulfúrico (75% v/v), añadir 750 ml de ácido sulfúrico a 250 ml de agua destilada.
3. Reactivo de antrona : se agregan 5 ml de etanol absoluto a 200 mg de antrona, se llevan a 100 ml con la solución base de ácido sulfúrico, se agita para su disolución; este reactivo se prepara cada día, el etanol sirve para estabilizar el color.

	BLANCO	PROBLEMA	ESTANDAR
A G U A	1.0 ml	-----	-----
Macerado de papa con 5% de carbohidratos totales. (dilución 1 : 1000 )	-----	1.0 ml	-----
Solución estándar de glucosa 1 mg/ml (disolución 1:20)	-----	-----	1.0 ml
B A Ñ O D E H I E L O			
Reactivo de antrona agregar lentamente con agitación	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml
Baño de agua en ebullición durante 10 minutos			
Enfriar en baño de hielo y leer a 625 nm.			

NOTA : Se lee el problema y el estándar contra un blanco de agua para tener mayor especificidad y evitar la interferencia de sustancias. Los disacáridos y polisacáridos dan cuantitativamente el mismo -- valor de color por mol de glucosa.

CALCULOS :

$$\frac{\text{D.O. del problema}}{\text{D.O. del estándar}} \times 5 = \text{concentración de carbohidratos totales en g/100 ml.}$$

## CUANTIFICACION DE GLUCOSA (29)

### Fundamento :

La glucosa forma con la orto-toluidina en solución de ácido acético caliente una sustancia de color verde, que puede determinarse por espectrofotometría.

### Reactivos :

1. Acido tricloroacético al 3%, funciona como agente desproteinizante.
2. Solución patron de glucosa 1 mg/ml.
3. Reactivo de orto-toluidina. Pesar las siguientes sustancias :  
0.5 g de tiourea. Conservador  
9.0 ml de orto-toluidina. Formador del color.  
100.0 ml de ácido acético. Desproteinizador y estabilizador del complejo colorido.

### Preparación :

Disolver la tiourea en un poco de ácido, calentando muy ligeramente, adicionar la o-toluidina y mezclar cuidadosamente, posteriormente adicionar ácido acético hasta la marca del aforo. Guardar en frasco ámbar. El reactivo es estable por 2 meses.

---

### TECNICA CON DESPROTEINIZACION

---

	PROBLEMA	Sol. Std. de glucosa	BLANCO
Ac. Tricloroacético	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Problema ( dil. 1:20 )	0.1 ml	-----	-----
Estandar	-----	0.1 ml	-----

---

	PROBLEMA	Sol. Std. de glucosa	BLANCO
	Mezclar	y	Centrifugar

---

Sobrenadante	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Reactivo de color	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

---

Mezclar y poner en baño de agua hirviendo durante 10 minutos , en seguida pasar a agua fría. La absorbancia se lee contra blanco de reactivos a 525 mm.

CALCULOS :

$$\frac{\text{D.O del problema}}{\text{D.O del estándar}} = \text{concentración de glucosa en g/100 ml}$$

## CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL ACIDO LACTICO (8,34,42)

### Principio :

Los ácidos orgánicos solubles en agua son separados e identificados por cromatografía en capa fina. El eluyente usado es éter dietílico --- ácido fórmico en relación 7 a 1 y la detección se hace ya sea con un indicador de pH o con molibdato de amonio.

### Material :

**Placas:** Se utiliza una placa de vidrio de 20 x 20, sílica gel "H" - aplicador ajustable. Las placas se secan durante 3 - 4 --- horas y se guardan en un desecador hasta ser usadas, la subsecuente activación por calor es innecesaria.

**Eluyente:** Eter dietílico saturado con agua y ácido fórmico al 88% - se mezclan en proporción 7 : 1 por volumen en un embudo de separación, se agregan pequeñas cantidades de agua -- destilada con agitación hasta que se observa saturación. La capa acuosa inferior es desechada.

**Indicador:** Azul de bromofenol al 0.3% y rojo de metilo al 0.1% se disuelven en etanol al 96%.

### Procedimiento :

**Eluyente:** La cámara de cromatografía se llena con el eluyente hasta cubrir un centímetro de profundidad, tapandola con una placa de vidrio y sellando con vaselina. Dejar saturar la cámara por 24 horas.

**Muestras :** Con ayuda de un tubo capilar se coloca una pequeña cantidad de muestra (aprox. 10  $\mu$ l) conteniendo aprox. 30  $\mu$ g de ácido ( o -

su sal ) se aplican en solución etanólica a 2.5 cm del fondo de la placa y con una separación de 2 - 3 cm entre sí.

Después del desarrollo del cromatograma y para prevenir la disminución de cetoácidos, las placas se secan al aire por 4 horas aproximadamente hasta evaporar el ácido fórmico y el éter.

Revelado: El indicador se rocía con un atomizador sobre la placa, los ácidos aparecen como puntos amarillos sobre un fondo azul oscuro.

Rf de ácido láctico: 0.6.

TABLA No. DETECCION CUALITATIVA DE ACIDO LACTICO (8.34)

Muestra : Mosto fermentado del medio 4-IV  
Método : Cromatografía en capa fina  
Placas : Placas de vidrio de 50 x 200 m.m. recubiertas con gel de sílice.

Cantidad de muestra utilizada : 10  $\mu$ l.

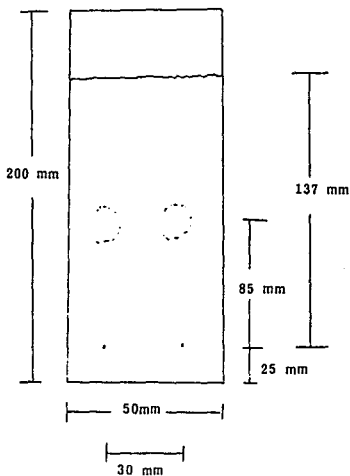
Eluyente : Dietil éter - ácido fórmico 7 : 1

Indicador : Azul de bromofenol - rojo de metilo

Identificación : Manchas amarillas en fondo azul

R<sub>F</sub> Estándar = 0.62

R<sub>F</sub> Problema = 0.62



## CUANTIFICACION DEL ACIDO LACTICO

( Método de Nanni y Baldini ). ( 29 )

### Principio :

La muestra desproteinizada se trata con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para eliminar el piruvato interferente. Así el  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  se aña de junto con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado el cual bajo la influencia del calor convierte el ácido láctico en acetaldehído. Este reacciona con Para-hidroxidifenilo-produciendo un cromoforo violeta, que tiene su máxima absorción a 568 nm.

### Reactivos :

1. Solución patrón de ácido láctico. 0.2133 g de lactato de litio se se disuelven en 100 ml de agua destilada, junto con 1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , se lleva a un volúmen final de 1 litro con agua destilada, quedando una concentración final de 20 mg/100 ml.
2. Solución de para-hidroxidifenilo: 150 mg de para-hidroxidifenilo, se disuelven en 10 ml de etanol absoluto.
3. Solución de sulfato de cobre :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 20% (w/v).
4. Solución de sulfato de cobre  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 15% (w/v).
5. Hidroxido de calcio Q. P.
6. Acido sulfúrico concentrado.

### Método :

La derminación se realiza con la solución patrón, muestra problema y blanco simultaneamente.

1 ml. de solución libre de proteínas conteniendo de 10 a 200 mg- de ácido láctico se colocan en un tubo de 15 x 110 mm. Se agrega un ml- de sulfato de cobre al 20% y se lleva a un volúmen final de 10 ml con agua destilada.



Se agrega un gramo de hidróxido de calcio, los tubos se tapan y se agitan vigorosamente, por períodos de 30 segundos a intervalos de 5 minutos por 30 minutos, al fin de los cuales se centrifugan los tubos.

Un ml del sobrenadante se pipetea en un tubo de 15 x 180 mn., se coloca en un baño de hielo y se añaden 0.05 ml de sulfato de cobre al 15% seguido por 6 ml de  $H_2SO_4$  concentrado que se añade lentamente con agitación continua, goteando de una bureta.

Cuando todo el ácido se ha añadido, los tubos se agitan vigorosamente, se tapan y se transfieren a un baño de agua a  $60 \pm 1^\circ C$  por 30 minutos, se enfrían de 8 a  $10^\circ C$  y se agrega 0.1 de para-hidroxifenilo y se agita vigorosamente.

Los tubos se colocan en un baño de agua a  $29 \pm 1^\circ C$  por 30 minutos, seguido por 90 segundos de baño de agua en ebullición, con este tratamiento se elimina el exceso de para-hidroxidifenilo.

Inmediatamente después de este tratamiento, los tubos se enfrían en baño de hielo y se mide la extinción de 568 nm contra blanco de reactivos.

CUENTA DE ESPORAS DE A.NIGER (16,27)

( Método de la cámara de Neubauer )

Material :

Pipetas de Thoma para glóbulos rojos.

Boquilla

Cámara de Neubauer

Microscopio óptico

Gradilla

Muestras de esporas en suspensión.

Procedimiento :

1. Llenar con muestra homogénea la pipeta de Thoma hasta la marca de 0.5
2. Con una gasa limpiar la parte externa de la pipeta.
3. Diluir con solución de Tween 80 al 2%
4. Agitar durante 3 minutos para mezclar perfectamente.
5. Colocar el cubreobjeto sobre la cámara de Neubauer.
6. Descartar las primeras 4-5 gotas de la pipeta y llenar la cámara por uno de los bordes del cubreobjetos.
7. Dejar que el líquido penetre lentamente entre la cuadrícula y el cubreobjeto hasta que la plataforma de recuento esté cubierta.
8. Dejar reposar de 3 a 5 minutos sobre la platina del microscopio.
9. Con objetivo de 40X se cuentan las esporas contenidas en 80 cuadros pequeños, un central y cuatro de los extremos (del cuadro central -- de 1 mm<sup>2</sup> ).

Cálculos :

Si se considera que el retículo central tiene 400 cuadritos, se -  
realizará el siguiente cálculo :

$$\frac{N \times 200 \times 10 \times 400}{80} = N \times 10\,000 = \text{cantidad de esporas por mm}^3$$

N = Número de esporas contadas.

200 = Factor de dilución.

10 = Corrección por la altura de la cámara.