

2 by No. 66



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**“ BIOSINTESIS MICROBIANA DEL ACIDO LACTICO  
A PARTIR DE PAPA ”**

TESIS MANCOMUNADA PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ALTAGRACIA MALDONADO VALENZUELA  
LUIS GARDUÑO TORRES

MEXICO, D. F. 1984.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# I N D I C E

	Pag.
I	INTRODUCCION ..... 1
II	OBJETIVO ..... 2
III	JUSTIFICACION ..... 4
IV	GENERALIDADES ..... 6
V	PARTE EXPERIMENTAL ..... 20
	5.1 Material ..... 21
	5.2 Reactivos ..... 23
	5.3 Métodos ..... 24
	5.4 Hidrólisis enzimática ..... 31
	5.5 Fermentación láctica ..... 35
VI	RESULTADOS ..... 41
VII	CONCLUSIONES ..... 45
VIII	BIBLIOGRAFIA ..... 46

# I

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

El ácido láctico tiene gran importancia por su consumo y diversidad de aplicaciones, no habiendo producción en México, el abastecimiento del mercado depende de la importación; lo que significa una fuerte salida de divisas. (Cuadro Nº 1)

El ácido láctico se obtiene de cualquier producto que nos proporcione almidón o azúcares como fuente de carbono, como por ejemplo, el suero de leche, mieles incristalizables, licores sulfúricos, maíz, trigo, cebada, malta, papa, etc.

En este trabajo se utiliza papa, porque es fácil de adquirir y el suministro es continuo, y de costo relativamente económico. Por lo tanto el uso de desecho de papa es una alternativa digna de tomarse en cuenta y con bastante posibilidad de éxito industrial.

## II

### OBJETIVO

Producir ácido láctico a partir de papa clasificada como desecho agrícola.

Adecuar las condiciones de pH, medio de cultivo, inóculo, temperatura y agitación para obtener el mayor rendimiento de azúcares del hidrolizado de papa.

Adaptar las bacterias lácticas al medio seleccionado para llevar a cabo la fermentación láctica.

### III

## J U S T I F I C A C I O N

En México, durante el año de 1982 se sembraron 68,014 -- hectáreas de papa con una producción de 941,483 toneladas, de esta producción el 10% no tiene ubicación en el mercado, lo -- que corresponde a más de 90,000 toneladas de papa de desecho.

Se considera que la producción nacional de papa llegó a un punto de equilibrio entre oferta y demanda; un exceso en -- la producción ocasionaría una tendencia a la baja de precios, siendo éste un inconveniente para los productores de papa, de -- bido a esto se busca diversificar su uso para apoyar otros -- proyectos para la fabricación de galletas y tortillas de harina de papa. Este tubérculo se consume de la siguiente manera:

Fresco .....	68%
Semilla .....	16%
Industria .....	6%
Esquimos (desechos) .....	10%

El 10% de desecho del dato anterior puede ser aprovecha -- do, no sólo para la producción de ácido láctico, sino para -- otros productos de importancia para la economía nacional. .

Para esta investigación se utilizó papa de la variedad -- "Greta", proporcionada por la S.A.R.H. de Toluca, Edo. de Mé -- xico. Es importante mencionar que el contenido de carbohidra -- tos en las variedades de papa existentes es muy similar.

Composición química aproximada de la papa:

Carbohidratos totales .....	18	-	20	%
Azúcares reductores .....	0.8	-	1.2	%
Humedad .....			80	%
Grasa .....	0.1	-	1.0	%
Potasio .....	430	mg./100g.	de papa pelada	
Manganeso .....	0.253	mg./100g.	de papa pelada	
Magnesio .....	20.8	"	"	"
Fósforo .....	47.8	"	"	"
Calcio .....	0.8	"	"	"
Cobre .....	0.6	"	"	"
Yodo .....	0.018	"	"	"
Zinc .....	0.042	"	"	"
Hierro .....	0.68	"	"	"
Aluminio .....	0.609	"	"	"
Sodio .....	7.7			

**CUADRO 1**

**IMPORTACION DE ACIDO LACTICO EN DIFERENTES PAISES DURANTE 1981, 1982 Y 1983**

PAISES	1981 KGB	1982 KGB	1983 KGB	1981 Dls. *	1982 Dls.	1983* Dls.
ALEMANIA OCC.	13,084	402	4,293	21,743	1,559	9,684
BRASIL	—	750	5,040	—	4,085	6,908
ESPAÑA	2	19,003	127,639	15	23,441	173,973
E.E.U.U.	116,293	220,386	8,500	320,644	494,326	10,859
HOLANDA	1	600	178,089	10	2,275	391,248
JAPON	16,100	128,800	—	26,303	189,952	—
SUIZA	400	—	—	1,402	—	—
TOTAL AC. LACTICO	456,261	656,629	323,558	761,548	1,118,510	592,672
				PESOS \$ 114,237,000	PESOS \$ 167,776,000	PESOS \$ 88,900.00

FUENTE: BIBLIOTECA DEL IMCE (23.16 a DOO2)

\*EQUIVALENTE 1er. TRIMESTRE 1983.

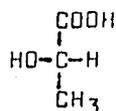
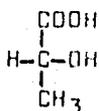
KGB - KILOGRAMO BRUTO.

## IV

## GENERALIDADES

El ácido láctico (ác. 2-hidroxi**pr**opiónico, ó  $\alpha$ -hidroxi**pr**opiónico)  $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ , es un ácido que está ampliamente distribuido en la naturaleza, es un constituyente ácido del suero de la leche (de aquí deriva su nombre), y un constituyente normal de la sangre y tejido muscular de los animales.

Scheele lo aisló e identificó en el suero de la leche en 1780. El ácido láctico contiene un átomo de carbono asimétrico, existe en dos formas ópticamente activas y una modificación racémica, todas solubles en agua. (3, 10, 12, 18, 31, 34, 35)



D(-) ác. láctico.

L(+) ác. láctico.

El D(-) ác. láctico posee la configuración D y es levorrotatorio, el L(+) ác. láctico posee la configuración L y es dextrorrotatorio, sin embargo las sales del ác. Láctico D(-) son dextrorrotatorias y las sales del ác. láctico L(+) son levorrotatorias.

El ácido que se produce comercialmente por fermentación - es la forma ópticamente inactiva. (3, 18, 31, 34, 35)

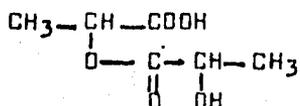
Es un líquido siruposo, transparente, incoloro o débilmente amarillo, casi inodoro de sabor ácido, soluble en agua, alcohol o éter en todas proporciones, es insoluble en cloroformo, éter de petróleo y disulfuro de carbono, es muy higroscópico y tiende a descomponerse con la ebullición. (12, 32, 27)

Peso molecular .....	90.08
Gravedad específica .....	1.249
Indice de refracción $n_D^{10}$ .....	1.4414
Punto de ebullición 14mm. Hg.....	122.0°C

( 18, 35 ).

El ácido láctico comercial es una mezcla del ácido con agua a diferentes concentraciones y grados de pureza.

Existe como una mezcla de ácido láctico libre, ác. lactil-láctico y otros ésteres intermoleculares.



ácido lactil-láctico

La composición de soluciones diluidas de ácido láctico, -conteniendo aproximadamente el 20% de ácido láctico corresponden esencialmente al ácido láctico monomérico y agua. (18, -34, 35).

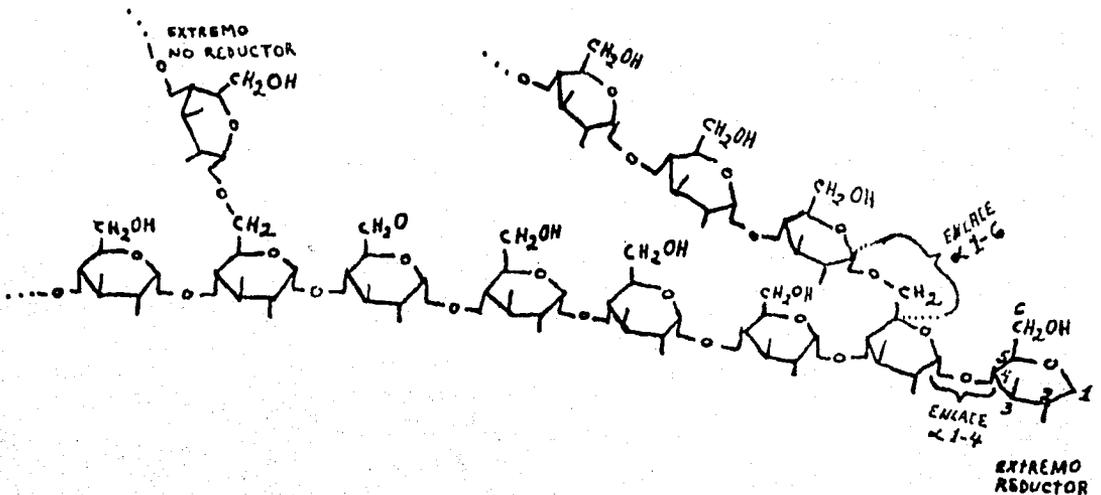
Las soluciones de alta concentración son más complejas a causa de la propia esterificación que sufre el ácido láctico, formando los ácidos polilácticos.

Ciertos derivados del ácido láctico tienen un alto poder solvente debido a la presencia de los siguientes grupos funcionales: hidróxilo, éster ó eter. (35)



## Hidrólisis enzimática del almidón:

El almidón es un polisacárido, está compuesto de amilosa, una fracción lineal, la cual a su vez está compuesta de n-moléculas de glucosa enlazadas en la posición  $\alpha$  (1-4), y amilopectina, brazos laterales (también compuestos de moléculas de glucosa) enlazados en la posición  $\alpha$  (1-6) (5, 22, 23).



El contenido de almidón de vegetales varía con la porción de la planta, madurez, variedad y condiciones de crecimiento, los almidones de diferentes fuentes tienen diferentes proporciones de amilosa y amilopectina.

Hay alrededor de una cadena lateral por cada 25-30 unidades de glucosa en la amilopectina.

Existen muchas hipótesis acerca de los dos principales tipos de enlace, tienen diferentes velocidades de hidrólisis.

Los resultados llevan a la conclusión que desde el punto de vista práctico, las velocidades no son lo suficientemente diferentes para afectar significativamente la naturaleza de los productos formados. (22, 23).

Cuando se hidroliza el almidón con agua y un catalizador apropiado, las moléculas de agua se añaden a las moléculas de almidón. Esto significa que una cantidad dada de almidón debe producir más de una cantidad de productos hidrolíticos. El caso extremo es la conversión del almidón al producto final glucosa. (5, 22, 23)

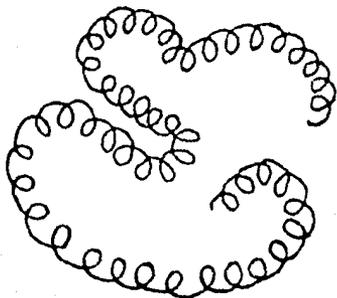
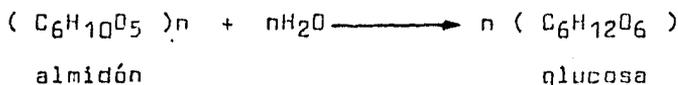


Diagrama esquemático de una molécula de amilosa con seis unidades de glucosa por vuelta.

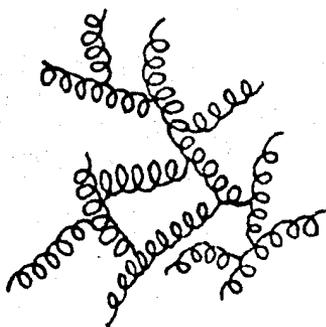
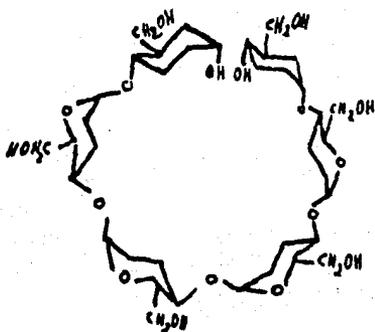


Diagrama esquemático de una molécula de amilopectina con seis unidades de glucosa por vuelta.



Una vuelta de una molécula de almidón de seis unidades de glucosa enlazadas en las posiciones L-(1-4).

Por ejemplo en la hidrólisis del almidón, 162 unidades de almidón reaccionan con 18 unidades de agua para producir 180 unidades de glucosa.

Cuando no ocurre hidrólisis total, se obtienen productos tales como la maltosa y otros polisacáridos, esto impide determinar el rendimiento, por lo tanto se debe encontrar un método que permita llevar a cabo la hidrólisis del almidón en la forma más completa posible. (22, 23)

La hidrólisis ácida del almidón se efectúa utilizando como catalizador un ácido mineral diluido ( $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ), agua, calor y agitación mecánica.

El rompimiento de los enlaces glucosídicos ocurre al azar, dando como productos de hidrólisis: monosacáridos, disacáridos y polisacáridos de cadena corta. No ocurre hidrólisis total a monosacáridos.

En el transcurso de la hidrólisis ácida se producen compuestos del tipo furfural, polisacáridos no almidones, destrucción de la dextrosa, también se forman compuestos que dan un efecto perjudicial en el sabor y color de los productos. (5, 22, 23).

Corman y Langlyke estudiaron la acción de enzimas amilolíticas de filtrados de cultivos fúngicos que produzcan la sacarificación del almidón, y establecieron que la acción hidrolítica se debe a la  $\alpha$ -amilasa y a una enzima glucogénica. (2).

Este sistema de enzimas actúa sobre la maltosa, dextrinas y almidón, produciendo glucosa. La eficiencia de la sacarificación fue correlacionada con la enzima glucogénica, mejor que con la actividad de  $\alpha$ -amilasa. (2, 16, 24, 30, 33, 37).

Kita reconoció en el hongo del koji una enzima que produce glucosa directamente del almidón. (35, 37).

Kerr y colaboradores reconocieron la presencia de enzimas de este tipo en la amilasa fúngica comercial en la producción de jarabes, a la enzima glucogénica se le denominó glucoamilasa.

Investigaciones en muchos laboratorios, particularmente en Estados Unidos y Japón, demostraron que un considerable número de microorganismos pueden producir glucoamilasa, pero también es importante su producción simultánea de apreciables cantidades de transglucosidasa, ya que esta enzima reduce los rendimientos de dextrosa de la hidrólisis del almidón a causa de la producción de oligosacáridos no fermentables, conteniendo enlaces  $\alpha$ -(1-6). (16, 24, 39).

Cepas de Rhizopus delemar y Rhizopus niveus, producen glucoamilasa libre de transglucosidasa. (30, 34).

Las desventajas de los cultivos de Rhizopus, es que no dan rendimientos satisfactorios de glucoamilasa en cultivo sumergido y las propiedades son algo inferiores comparada con la glucoamilasa de Aspergillus niger, como se observa en la siguiente tabla:

Microorganismos	<u>Aspergillus</u>	<u>Rhizopus</u>	<u>Endomyces</u>
Nombre comercial	Diazima	Sumizima	Matulasa
$\alpha$ -amilasa SKB/g.	30	500	25
Unidades de glucoamila- lase	31	50	95
1, 6 glucosidasa % de hidrólisis.	9.8	1.6	0.1
pH óptimo	(3.5-5.0)	(4.5-5.5)	(4.8-5)
Temperatura óptima °C	(50-60)	(50-55)	(50-55)

Las enzimas dan esencialmente las mismas conversiones - de almidón a glucosa cuando se usan bajo sus condiciones ópti- mas de pH y temperatura. (16, 33, 39)

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS AMILOLITICAS			
Microorganismos productores de..	$\alpha$ -amilasa	Glucoamilasa	$\alpha$ -amilasa
Bacterias	<u>B.subtilis</u> <u>B.stercor-</u> <u>mophylus.</u> <u>B.amylolique-</u> <u>faciens</u>		
Hongos	<u>A.niger</u> <u>A.alliaceus</u> <u>A. foetidus</u> <u>A. wentii</u> <u>Rhizopus</u> <u>Mucor</u> <u>Monilia</u>	<u>A.niger</u> <u>Rhizopus</u> <u>Endomyces</u>	<u>A.niger</u> <u>Rhizopus</u>

### Acción y características de la glucoamilasa:

La glucoamilasa fué caracterizada desde 1951, y es estrictamente una exoenzima, la cual hidrolisa enlaces glucosídicos  $\alpha(1-4)$  en el almidón y separa unidades sucesivas de glucosa de la parte final de la cadena no reductora.

Actúa principalmente sobre cadenas largas y también hidroliza enlaces  $\alpha(1-6)$  y  $\alpha(1-3)$ . Aunque más lentamente que los enlaces  $\alpha(1-4)$ , así ésta enzima es capaz de convertir el almidón completamente a glucosa. (2, 16, 24, 30, 33, 34).

La glucoamilasa convierte cuantitativamente el almidón a glucosa en soluciones de baja concentración. (39)

Las conversiones son menos completas cuando las concentraciones de almidón se incrementan. (39)

Se ha demostrado que la glucoamilasa pura causa cierta polimerización de la glucosa, ésta acción se incrementa con altas concentraciones de enzima. Esta reacción de polimerización -- provoca la acumulación de oligosacáridos no descables con enlaces  $\alpha(1-6)$ , tales como isomaltosa e isomaltotriosa. Esto conduce a restringir las concentraciones máximas de almidón para que puedan ser eficientemente convertidas a glucosa. En la práctica industrial se usan concentraciones de almidón abajo del 40%, comúnmente en el rango de 30 a 35 con un nivel óptimo de glucoamilasa, obteniéndose la máxima producción de glucosa a las 48-96 horas. (16, 33, 39)

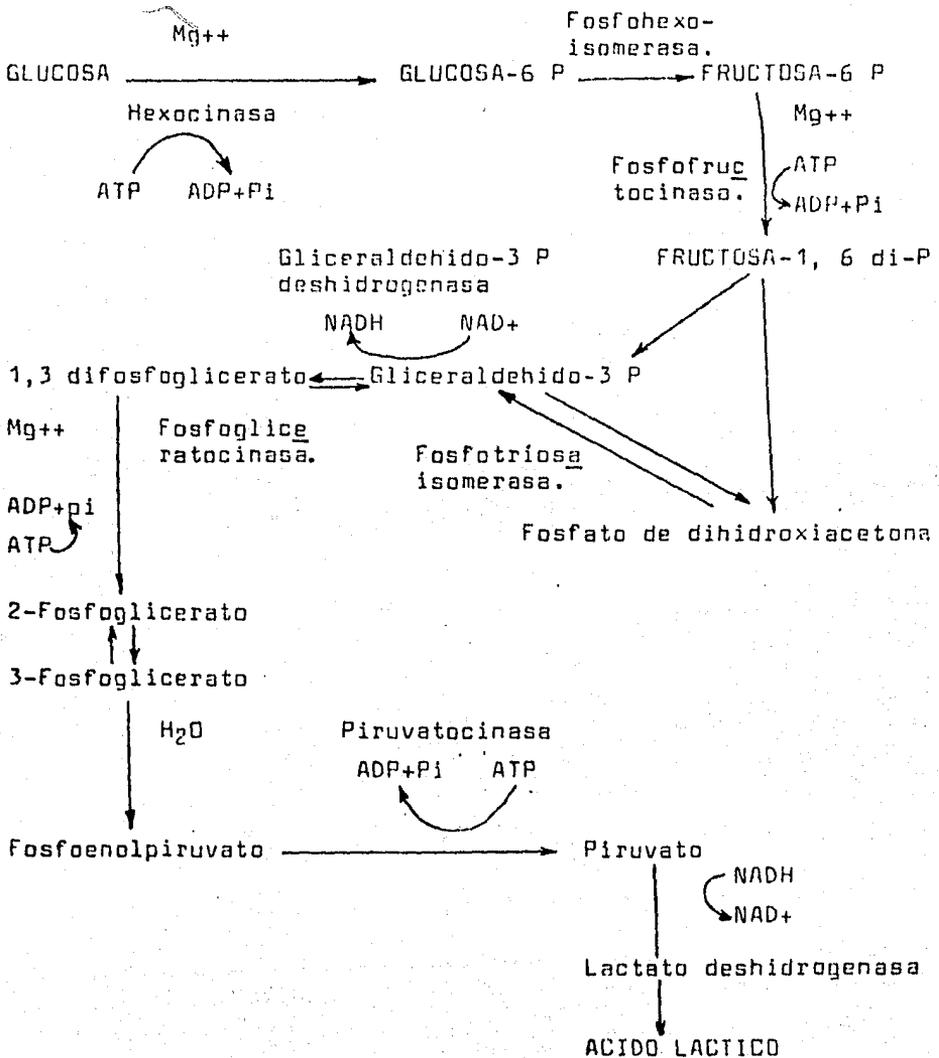
Por lo expuesto anteriormente se eligió al Aspergillus niger productor de glucoamilasa para llevar a cabo la hidrólisis del almidón de papa, de ésta forma se obtienen buenos rendimientos y se evita la formación de productos indeseables.

El hidrolizado de almidón de papa, se utilizará para producir ácido láctico por fermentación.

Fermentación láctica:

Las bacterias lácticas, se caracterizan por su capacidad de producir ácido láctico a partir de glucosa y otros azúcares.

El ácido láctico se forma como producto final del ciclo conocido de Embden-Meyerhof, el cual se describe a continuación - (13, 17, 21, 31).



Las bacterias del ácido láctico obtienen su energía por fermentación parcial de azúcares, sin la utilización de oxígeno libre. Utilizando cantidades considerables de azúcar para obtener relativamente pequeñas cantidades de energía para su crecimiento, y al mismo tiempo se producen grandes cantidades de productos finales de fermentación. Así las especies pueden ser parcialmente identificadas por los productos finales de fermentación.

Las especies homofermentativas producen ácido láctico como producto principal, y las cantidades varían del 85 al 95% en base a la hexosa fermentada, además se producen pequeñas cantidades de dióxido de carbono y ácido acético. A partir de pentosas se producen cantidades equimoleculares de ácido láctico y ácido acético. (14, 31, 32, 38). Las especies heterofermentativas convierten arriba del 50% de glucosa en ácido láctico del 20% al 25% en CO<sub>2</sub> y el 25% en alcohol o ácido acético.

Las bacterias del ácido láctico no son putrefactivas, -- son poco proteolíticas y no son fuertemente lipolíticas.

El ácido pirúvico es un importante intermediario en la formación del ácido láctico por bacterias homofermentativas, éste es reducido por la deshidrogenasa y lo convierte en ácido láctico. El cambio total se expresa por la siguiente ecuación. (14, 31, 32, 38).



Microorganismos utilizados:

Los microorganismos que se pueden utilizar para la producción de ácido láctico por fermentación son:

Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus bulgaricus, --  
Lactobacillus pentosus, Lactobacillus casei, Lactobacillus --  
leichmannii, Lactobacillus plantarum y Streptococcus láctis, -  
 todos éstos microorganismos son homofermentativos. (3,14,31,-  
 32,38).

El siguiente cuadro muestra los sustratos sobre los cuales éstos microorganismos pueden actuar.

Sustrato que Fermenta	Leche ó Suero	Glucosa y Maltosa	Hidrolizado de Almidón
Micro-organismos	<u>L.bulgaricus</u> <u>L.casei</u> <u>Str.láctis</u>	<u>L.plantarum</u> <u>L.delbrueckii</u> <u>L.pentosus</u> <u>L.leichmannii</u>	<u>L.delbrueckii</u> <u>L.plantarum</u> <u>L.bulgaricus</u> <u>Str.láctis</u>

Materias primas para la fermentación láctica:(3,14,18,31,32,38)

- Glucosa
- Sacarosa
- Lactosa (suero de leche)
- Hidrolizado de almidón de maíz
- Hidrolizado de papa
- Xilosa
- Melazas
- Licores sulfúricos
- Trigo
- Cebada

### Requerimientos nutritivos:

Los requerimientos nutritivos de las bacterias del ácido láctico son algo complejas, se requieren varias vitaminas del complejo B y ciertos aminoácidos. (14, 18, 31, 38).

### Vitaminas y factores de crecimiento:

Acido para amino benzoico

Biotina

Acido fólico

Acido nicotínico

Acido pantoténico

Riboflavina

Tiamina

Vitamina B<sub>6</sub>

Vitamina B<sub>12</sub>

El extracto de levadura se puede utilizar como fuente de estas vitaminas y factores de crecimiento, además de fuente de aminoácidos. (14, 18, 31, 38).

### Sales minerales:

Fosfato-monobásico y dibásico

Cloruro de sodio

Cloruro de manganeso

Cloruro de potasio

Cloruro de magnesio

(3, 14, 18, 31, 32, 38)

### Temperatura de fermentación:

La fermentación del ácido láctico se lleva a cabo a temperaturas óptimas, reportadas en la literatura para cada microorganismo. El Lactobacillus delbrueckii de 45°C, Lactobacillus hulgaricus de 45 a 50°C, Lactobacillus pentosus, Lactoba

Lactobacillus casei y Lactobacillus lactis a 30°C; Lactobacillus ---  
plantarum a 37°C.

La temperatura óptima de trabajo debe ser determinada experimentalmente para cada tipo de fermentación.

#### Concentración de azúcares:

Se ajusta la concentración de azúcares entre 5 y 20%, dependiendo de la naturaleza de la materia prima y de las condiciones del proceso. (14, 31, 38).

#### Aporte de oxígeno:

Las bacterias utilizadas para producir ácido láctico, industrialmente son microaerófilas ó anaerobias. (14, 18, 31, - 32, 38).

#### "pH":

El pH, en el cual se realiza la fermentación láctica en condiciones óptimas, está en el valor de 5.0 a 6.0 (9). El  $\text{CaCO}_3$  que se agrega al medio de fermentación, actúa como amortiguador manteniendo al pH en el valor de 5.8 a 6.0, para un control continuo de pH se utiliza  $\text{NH}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  ó mezclas de carbonato de sodio, potasio y amonio. Las ventajas del control continuo del pH en la fermentación láctica, son la obtención de altos rendimientos y velocidades de producción incrementadas. (14, 18, 31, 38).

#### Duración de la fermentación:

La fermentación puede ser completa entre uno y seis ---- días, dependiendo del proceso utilizado.

#### Rendimientos:

Se obtienen rendimientos del 85 - 90% en procesos controlados. (31, 32, 38).

v

P A R T E   E X P E R I M E N T A L

## 5.1 MATERIAL

Agitador rotatorio  
Agitadores de vidrio  
Asa bacteriológica  
Asa micológica  
Autoclave  
Balanza analítica  
Balanza granataria  
Bureta de 500 ml.  
Cámara de cromatografía  
Campana de flujo laminar  
Cuchillo  
Espátula  
Estufa de 30°C a 40°C  
Gradilla  
Jarra de anaerobiosis estándar  
Licuadora  
Matraces Erlenmeyer de 25 ml.  
Matraces Erlenmeyer de 300 ml.  
Matraz aforado de 25 ml.  
Matraz aforado de 100 ml.  
Matraz aforado de 500 ml.  
Matraz aforado de 1000 ml.  
Matraz bola de fondo plano de 3 litros  
Mecheros  
Piedras de ebullición  
Pipetas de 0.1 ml.  
Pipetas de 1 ml.  
Pipetas de 5 ml.  
Pipetas de 10 ml.  
Pipetas de 50 ml.  
Probeta de 50 ml.  
Refrigerador  
Termómetro hasta 110°C

Tubos de cultivo Pyrex de 18 x 150

Tubos de cultivo Pyrex de 16 x 150

Tripié

Vidrio de reloj

## 5.2 REACTIVOS

Acido acético	Isopropanol
Acido benzoico	Nitrato de sodio
Acido clorhídrico	Molibdato de amonio
Acido fórmico	Para-hidroxidifenilo
Acido oxálico	Peptona
Acido sulfúrico	Reactivo de antrona
Acido tricloroacético	Reactivo de Orto-toluidina
Acetato de sodio	Rojo de metilo
Agar	Sílica gel "H"
Agua destilada	Sulfato de cobre penta- hidratado.
Anilina	Sulfato ferroso hepta- hidratado.
Azul bromofenol	Sulfato de magnesio hepta- hidratado.
Carbonato de calcio	Sulfato de manganeso tetra hidratado.
Citrato de amonio	Sulfato de zinc hepta- hidratado.
Cloruro de potasio	Solución estándar de ácido láctico 100 mg./100 ml. ó (lactato de litio seco)
Etanol absoluto	Tiourea
Eter	Tween 80
Eter dietílico	Vaselina
Extracto de levadura	
Extracto de carne	
Fosfato monopotásico	
Fosfato dipotásico	
Gaspak	
Glucosa	
Hidróxido de calcio	

### 5.3 METODOS

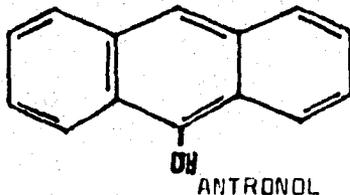
#### DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS TOTALES

Método de antrona: (28)

Fundamento:

- a) Hidrólisis de los polisacáridos a monosacáridos.
- b) Deshidratación y rearrreglo de los monosacáridos a la forma furfural, a partir de pentosas ó 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 calor en una solución de ácido sulfúrico. El color es debido a la condensación con antrona de los derivados de furfural formados de los azúcares en ácido caliente. La forma antronol es la que reacciona.



REACTIVOS:

- 1.- Solución estándar de glucosa (1.0 mg./ml. en una solución al 15% de ácido benzoico, es estable por largos períodos a 0°C.
- 2.- Solución stock 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 stock de ácido sulfúrico, se agita hasta disolver. Este reactivo se prepara cada día, el etanol sirve para estabilizar el color.

	BLANCO	PROBLEMA	ESTANDAR
AGUA	1.0 ml.	-----	-----
Suspensión de masa de papa con = 5% - de carbohidratos - totales. (Dilución 1:1000)	-----	1.0 ml.	-----
Estándar de glucosa 100 mg/100 ml. (Dilución 1:20)	-----	-----	1.0 ml.
Baño de Hielo			
Reactivo de antro- na agregar lenta- mente con agitación	5.0 ml.	5.0 ml.	5.0 ml.
Baño de agua en ebullición 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 las sustancias - interferentes:

Los disacáridos y polisacáridos dan cuantitativamente el mismo valor de color por mol de glucosa.

## CUANTIFICACION DE GLUCOSA

Fundamento: (28)

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

Reactivos:

- 1.- Acido tricloroacético al 3%
- 2.- Solución estándar de glucosa 100 mg./100 ml.
- 3.- Reactivo de color (reactivo orto-toluidina).  
 0.5 g. de tiourea.  
 9.0 ml. de orto-toluidina  
 100 ml. de ácido acético

TECNICA CON DESPROTEINIZACION			
	Problema	Solución estándar de glucosa 100mg/100 ml.	Blanco
Acido tricloroacético	1.0 ml.	1.0 ml.	1.0 ml.
Problema	0.1 ml.	----	----
Estándar	----	0.1 ml.	----
<b>Mezclar y Centrifugar</b>			
Sobrenadante	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.
Reactivo de color	2.0 ml.	2.0 ml.	2.0 ml.
<p>Mezclar y poner en baño de agua hirviendo 10 minutos,  en seguida pasar a agua fría.</p>			

La absorbancia se lee contra blanco de reactivos a 625 nm.

## CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Material: (28)

Cámara para cromatografía ascendente

Papel Whatman. Nº 1

Solvente desarrollador

Isopropanol: ácido acético: agua (3:1:1)

Reactivo revelador

Anilina-ácido-oxalato

Añadir 0.9 de ácido oxálico en 200 ml. de agua, más 1.8 ml. de anilina.

Se utilizó una solución estándar de glucosa al 1% como patrón de referencia, para comparar el  $R_f$  de este con la muestra problema.

### Método:

Se aplican aproximadamente 5  $\mu$ l. de la muestra problema y de la solución estándar de glucosa con una separación entre muestra y muestra de 2 cm.

Las muestras se aplican a los 3 cm. del fondo del recipiente, y deben estar separadas a 1 cm. del eluyente (fase móvil).

La cromatografía se suspende antes de que el frente del disolvente llegue a la parte final del papel. Se marca el --- frente del disolvente y se pone a secar el papel. Se rocía -- con el reactivo revelador, se seca al aire 10 - 15 minutos y después se coloca en la estufa a 100°C durante 10 minutos. Las hexosas dan un color café.

## CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL ACIDO LACTICO

Principio: Los ácidos orgánicos solubles en agua son separados e identificados por cromatografía en capa fina. El solvente usado es ácido fórmico-éter dietílico en relación 7 a 1 y la detección se hace, ya sea con un indicador de pH o con molibdato de amonio. (28)

### MATERIAL:

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

Solvente: Agua saturada con éter dietílico y ácido fórmico se mezclan en relación 7 a 1 por volumen en un embudo de separación.

Indicador: Azul de bromofenol al 0.3% y rojo de metilo al 0.1%, se disuelven en etanol al 9%.

### Procedimiento:

Solvente: A una profundidad de 1cm., la cámara se sella con una placa de vidrio con vaselina.

Muestras: 10  $\mu$ l conteniendo 30  $\mu$ g de ácido (o su sal) se aplican en solución etanólica a 2.5 cm. del fondo de la placa y 2-3 cm. de separación.

Después del desarrollo de las placas se secan al aire (evaporación del éter) y entonces se calientan a 80°C para evaporar el ácido fórmico.

Para prevenir la disminución de cetoácidos, las placas se pueden secar al aire por aproximadamente 4 horas hasta eliminar las trazas de ácido fórmico.

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

## CUANTIFICACION DEL ACIDO LACTICO

Método de Nanni y Baldini (1964) ... (28)

Principio: la muestra desproteínizada se trata con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para eliminar el piruvato interferente. Así el  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  se añade junto con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, el cual bajo la influencia del calor convierte el ácido láctico a acetaldehído. Este reacciona con Para-hidroxi-difenilo para producir un cromóforo violeta, teniendo un máximo de absorción a 568 nm.

### Reactivos:

Solución estándar de ácido láctico, 0.2133 g. de lactato de litio seco se disuelven en 100 ml. de agua destilada, junto con un ml. de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, se lleva a un volumen final de 1 litro con agua destilada, ésta solución se diluye al valor apropiado de calibración.

Solución de Para-hidroxi-difenilo: 150 mg. de Para-hidroxi-difenilo se disuelven en 10 ml. de etanol absoluto.

Soluciones de sulfato de cobre:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 20% (w/v) y al 15% (w/v). Hidróxido de calcio, ácido sulfúrico concentrado.

### Método:

Un ml. de solución libre de proteínas conteniendo 10 a 200  $\mu\text{g}$ . de ácido láctico, se colocan en un tubo de 15x110 mm. Se agrega un ml. de sulfato de cobre al 20% y se lleva a un volumen final de 10 ml. con agua destilada.

Se agrega un g. 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, se centrifugan los tubos.

Un ml. del sobrenadante se pipetea en un tubo de 15 x 180 mm., 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. Los tubos tapados se transfieren a un baño de agua a  $60 \pm 1^\circ C$  por 30 minutos, se enfrían a  $8-10^\circ C$  y se agrega -- 0.1 ml. de Para-hidroxidifenilo, y se agita vigorosamente.

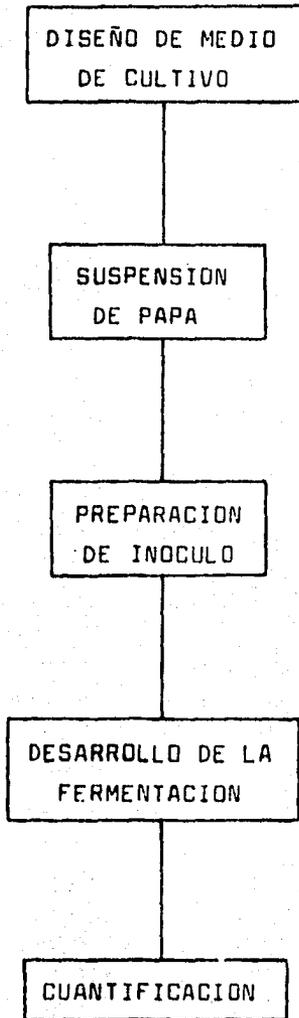
Los tubos se colocan en un baño de agua a  $29 \pm 1^\circ C$  por 30 minutos, seguido por 90 segundos de baño de agua en ebullición, con este tratamiento se elimina el exceso de Para-hidroxidifenilo.

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.

#### Inóculo de Lactobacilos:

En tubos de cultivo de 22x150, se adicionan 5 ml. de medio NR 3 más 0.25 ml. de cultivo de 48 horas de Lactobacilos, y se incuban a  $37^\circ C$  durante 48 horas.

# HIDROLISIS ENZIMATICA



## 5.4 HIDROLISIS ENZIMATICA

La hidrólisis enzimática se realizó en una suspensión de papa, utilizando el hongo Aspergillus niger. La cepa fué proporcionada por el ceperío de la Facultad de Química de la --- U.N.A.M., y se le hicieron las siguientes pruebas de identificación:

### Observación macroscópica:

En la superficie del medio desarrolla un micelio blanco, y sobre éste los conidióforos y conidios de color negro.

### Observación microscópica:

Hifas tabicadas hialinas muy ramificadas, micelio con -- abundantes conidióforos, en cuyo extremo se encuentra una vesícula ó (cabeza) rodeada de conidios de color negro.

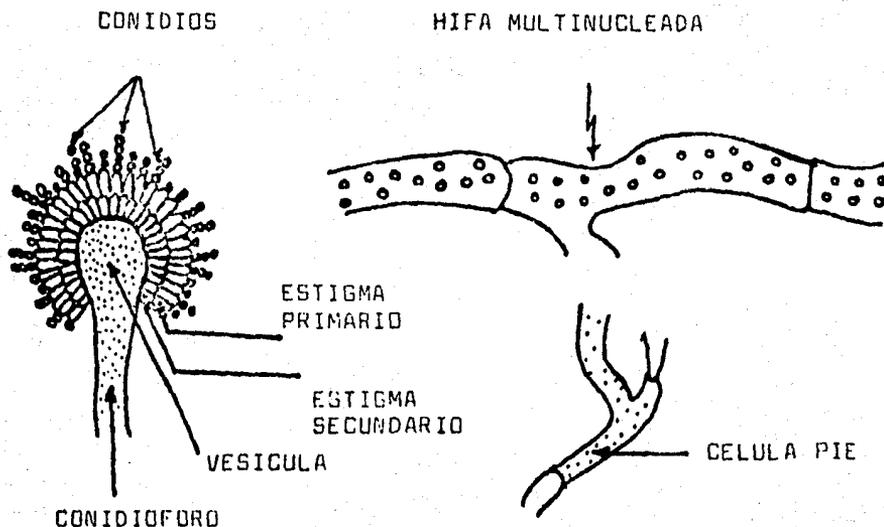


FIGURA Nº 1

Diseño del medio de cultivo:

Se diseñó un medio de cultivo para realizar la hidrólisis, basándose en la composición química del Aspergillus niger.

La composición química del Aspergillus niger en g./100 g. de células es la siguiente: (1)

C .....	48 g.
N .....	6.0 g.
P .....	2.5 g.
S-Mg .....	1.0 g.
K-Ca .....	0.1 a 0.5 g.
Na.-Fe .....	0.01 a 0.1 g.
Zn-Cu-Mn .....	0.001 a 0.01 g.

Para obtener un gramo de células de Aspergillus niger en 100 ml. de medio de cultivo, se requieren las siguientes sustancias.

(Suspensión de papa con 4-5% de carbohidratos totales) .....	100 ml.
NaNO <sub>3</sub> .....	0.364 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.109 g.
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0.1025 g.
KCl .....	0.0057 g.
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0.0027 g.
ZnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O .....	0.00024 g.
CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0.00021 g.
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	0.00019 g.

Se ajustó el pH a 5.5 y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos. (El medio diseñado se denominó MIP). La suspensión de papa contiene de 4 a 5% de carbohidratos totales, de los cuales el hongo utiliza 1.2% para nutrirse. (6, 33).

#### Suspensión de papa:

Se pesaron 250 g. de papa sin pelar, se cortaron en pequeños trozos, se pasaron a un matraz Erlenmeyer de 2 litros, y se agregaron 800 ml. de agua destilada, se mantuvo a ebullición con fuego lento una hora, se dejó enfriar y se sometió a una agitación intensa en la licuadora hasta tener una suspensión homogénea, y se llevó a un volumen de 1000 ml. A esta mezcla se le determinaron carbohidratos totales por el método de Antrona; y se le ajustó la concentración entre 4 y 5%. (6, 33).

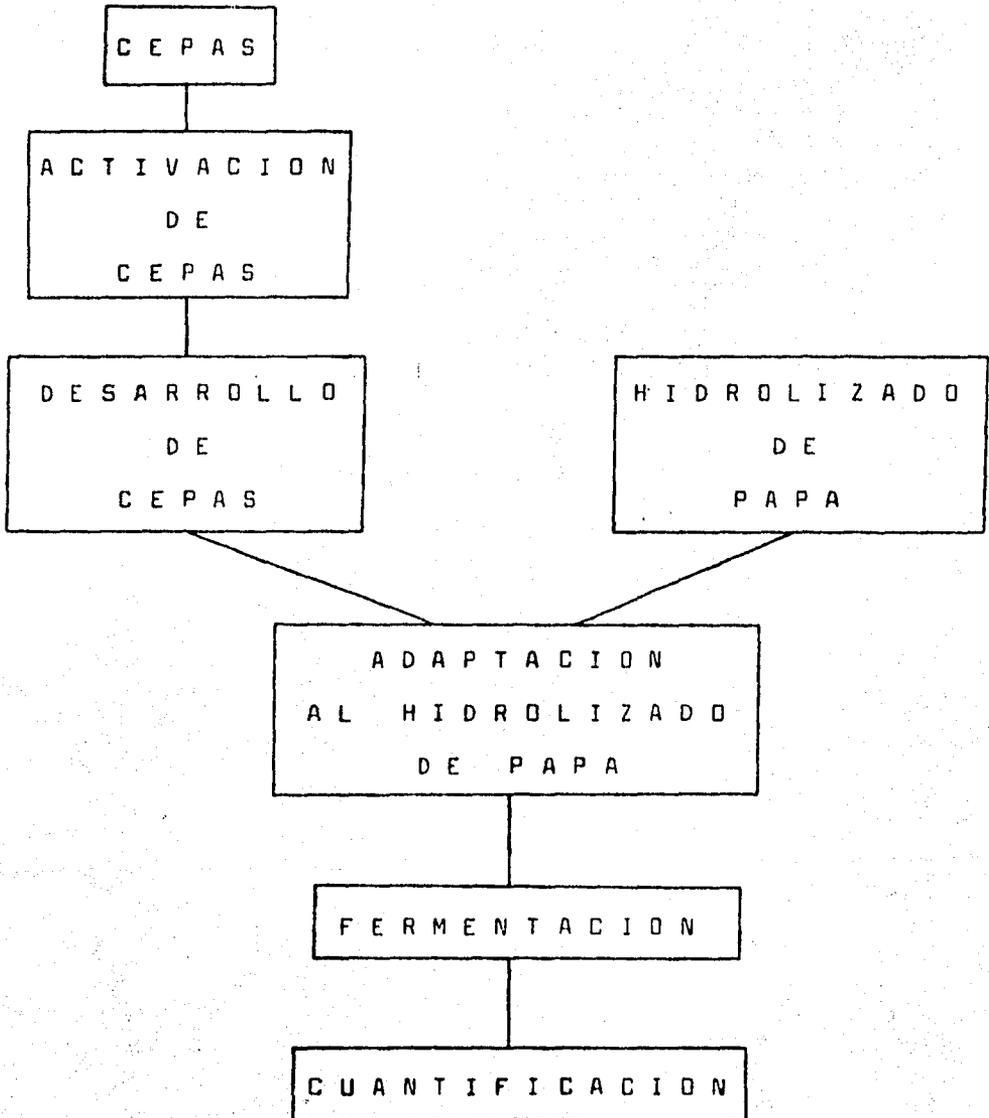
#### Preparación de inóculo:

Se sembraron las esporas de Aspergillus niger en cinco tubos de 22 x 150 con medio de cultivo MIP, se incubaron entre 28 y 30°C durante 7 a 8 días, observándose abundante desarrollo y esporulación. Del desarrollo obtenido de los tubos, se preparó una suspensión de esporas con una solución al 1% de tween 80, ajustándose aproximadamente 80 millones de esporas por mililitro.

En un matraz Erlenmeyer de 300 ml., conteniendo 100 ml. de medio de cultivo MIP, se adicionaron 4 ml. de la suspensión de esporas, se incubó a 30°C con agitación de 200 rpm. durante 24 horas. (26, 27, 33).

Al medio MIP, se le adicionó un 10% de inóculo, y se incubó a 30°C con agitación de 200 rpm., se cuantificó la glucosa cada 20 horas por el método de Orto-toluidina, y se hizo la cromatografía en papel del hidrolizado al final de la fermentación. (27, 29, 33)

# FERMENTACION LACTICA



## 5.5 FERMENTACION LACTICA

### Cepas:

Para el trabajo experimental, se utilizaron las cepas de Lactobacillus plantarum y Lactobacillus delbrueckii, las cuales fueron proporcionadas por el cepario de la Facultad de -- Química de la U.N.A.M.

### Activación de cepas:

Las cepas liofilizadas de Lactobacillus se hidrataron en solución salina estéril, y se sembraron en los siguientes medios de cultivo 2, 3, 4 y 5.

#### Medio Nº 2 M.P.S. (25)

Peptona .....	10 g.
Extracto de carne .....	10 g.
Extracto de levadura .....	5.0 g.
Glucosa .....	20 g.
Tween 80 .....	1.0 g.
$K_2HPO_4$ .....	2.0 g.
Acetato de sodio .....	5.0 g.
Citrato triamónico .....	2.0 g.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	0.2 g.
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ .....	0.2 g.
Agua destilada .....	1000 ml.

Se disuelven los ingredientes en agua y se ajusta el pH a --- 6.8, se esteriliza a 120°C durante 15 minutos.

#### Medio Nº 3 Sustrato nutritivo Nº 20 (17)

Extracto de levadura .....	2.0 g.
Glucosa .....	2.0 g.
Sol. "A" de sales minerales .....	0.88 g.

Sol. "B" de sales minerales ..... 0.74 ml.  
 Agua destilada ..... 100 ml.

Sol. "A" de sales minerales	Sol. "B" de sales minerales
MgSO <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 destilada ..... 50 ml.
H <sub>2</sub> O destilada ..... 50 ml.	

Medio Nº 4 "medio basal" (9)

Glucosa ..... 5.0 g.  
 Extracto de levadura ..... 3.0 g.  
 Sol. "A" de sales minerales 0.29 ml.  
 Sol. "B" de sales minerales 0.8 ml.  
 Agua destilada ..... 100 ml.

Medio Nº 5 "caldo para microinóculo": (7)

Extracto de levadura ..... 0.2 g.  
 Peptona ..... 0.5 g.  
 Glucosa ..... 1.0 g.  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0.2 g.  
 Tween 80 ..... 0.1 g.  
 Agua destilada ..... 100 ml.

En los medios de cultivo 2, 3, 4 y 5, los lactobacilos se desarrollaron en el fondo y en la pared de los tubos de ensaye - con los siguientes resultados:

Microorganismos	Medio Nº 2	Medio Nº 3	Medio Nº 4	Medio Nº 5
<u>L. plantarum</u>	++++	+++	+++	+
<u>L. delbrueckii</u>	++++	+++	+++	++

De acuerdo con los resultados del cuadro anterior, los medios en que hubo mayor desarrollo de los lactobacilos fueron los medios N° 2, 3 y 4. Se seleccionó el medio N° 3, ya que presenta los requerimientos mínimos necesarios para un buen desarrollo, y es de menor costo.

La conservación de cada una de las cepas, se llevó a cabo en el medio N° 3 por resiembras.

Para observar el comportamiento de Lactobacillus plantarum y Lactobacillus delbrueckii en cultivo estático y agitado, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 300 ml. con 45 ml. de medio de cultivo N° 3, adicionado de 5 ml. de inóculo de lactobacilos preparados según (Pag. 30), y se llevaron a 37°C durante 48 horas, obteniéndose los siguientes resultados de desarrollo (6, 9, 25, 31, 38).

Microorganismos	Cultivo agitado a 200 rpm.	Cultivo estático
<u>L. plantarum</u>	+ + + +	+ + + +
<u>L. delbrueckii</u>	+	+++

Estos experimentos fueron realizados por triplicado.

Los cultivos de Lactobacillus plantarum, dieron abundante desarrollo, tanto en el cultivo estático, como en el cultivo agitado, sin embargo, el Lactobacillus delbrueckii dió buen desarrollo en el cultivo estático, y poco desarrollo en el cultivo agitado

Adaptación al hidrolizado de papa:

El hidrolizado de la suspensión de papa (M1PH) se centrifugó y se utilizó el sobrenadante para la adaptación de Lactobacillus plantarum y Lactobacillus delbrueckii. La serie de matraces "A" se trabajó sólo con el medio M1PH, la serie "B" se trabajó con medio M1PH más extracto de levadura, como se observa en el siguiente cuadro:

Matraz	Medios	Inóculo
" A <sub>1</sub> "	M1PH	5% cultivo de 48 hrs. de <u>L. delbrueckii</u> .
" A <sub>2</sub> "	M1PH	5% cultivo de 48 hrs. de <u>L. plantarum</u> .
" B <sub>1</sub> "	M1PH más 0.2 g. de Ext. de levadura.	5% cultivo de 48 hrs. de <u>L. delbrueckii</u> .
" B <sub>2</sub> "	M1PH más 0.2 g. de Ext. de levadura.	5% cultivo de 48 hrs. de <u>L. plantarum</u> .
Incubados a 37°C durante 48 hrs.		

Observaciones del desarrollo del cuadro anterior:

Microorganismos	Matraz " A "	Matraz " B "
<u>L. delbrueckii</u>	+	+ + + +
<u>L. plantarum</u>	+	+ + + +

De acuerdo con los resultados anteriores en el experimento " B ", se observó mayor desarrollo comparado con el experimento " A ", lo cual demuestra que el medio M1PH no contiene los requerimientos nutricionales necesarios para un buen desarrollo, y además se observó que no hubo sustancias inhibitoras para dichos lactobacilos. (9, 25, 32, 38).

### Fermentación:

A matraces de 300 ml. se les agregó 100 ml. de medio --- M1PH, con una concentración de 3 a 4% de glucosa, y se les -- adicionó 2% de extracto de levadura y 5% de CaCO<sub>3</sub>, se ajustó el pH entre 5.8 y 6.1, y se esterilizaron a 120°C durante 15- minutos. A este medio se le denominó M1PHE.

El matraz "A" se inoculó con L. delbrueckii, y el matraz "B" con L. plantarum, y se sometieron a las siguientes condiciones:

Matraz	Inóculo	Cultivo
" A "	5% de cultivo de 48 horas de <u>L. delbrueckii</u>	Estático
" B "	5% de cultivo de 48 horas de <u>L. plantarum</u>	Agitado
Se incubaron a 37°C durante 96 hrs.		

Estos experimentos se realizaron por triplicado.

Se cuantificó la glucosa cada 24 horas por el método de la orto-toluidina, se consideró el final de la fermentación - cuando la concentración de glucosa llegó al orden de 50 a 150 mg./100 ml., finalmente, se corrió una cromatografía en capa- fina para comprobar si hubo producción de ácido láctico ú --- otros subproductos, posteriormente se cuantificó el ácido lác- tico por el método de Nanni y Baldini,

## R E S U L T A D O S

### Hidrólisis enzimática:

Quantificación de la glucosa por el método de la orto-toluidina.

Horas	Cero	19	24	48
mg. Glucosa por 100 ml.	200	3280	4060	2144

Esto corresponde al promedio de seis experimentos procesados por triplicado cada uno. (Ver gráfica Nº 1).

### Cromatografía del hidrolizado:

El Rf del hidrolizado de almidón fué de 0.33

El Rf del patrón de glucosa Q.P. fué de 0.33

### Producción de ácido láctico:

Se cuantificó el consumo de glucosa cada 24 horas por el método de la orto-toluidina.

Glucosa mg./100 ml.					
Matraz	Cero Hrs.	24 Hrs.	48 Hrs.	72 Hrs.	96 Hrs.
" A "	3700	3400	1500	200	55
" B "	3100	1400	365	110	105

Note: el matraz "A" (L. delbrueckii), el matraz "B" (L. plan-  
tarum). (Ver figura Nº 2).

Rendimiento de la producción de ácido láctico:

Matraz	Glucosa inicial mg/100ml	Glucosa final mg/100ml	Glucosa consumida mg/100ml	Acido láctico mg/100ml	Rendimiento en %
" A "	3700	55	3645	2811.5	76.46
" B "	3100	105	2995	2467.0	79.81

Nota: Matraz "A" es L. delbrueckii y Matraz "B" es L. plantarum.

Estos resultados corresponden a seis experimentos realizados por triplicado cada uno.

Cromatografía del ácido láctico:

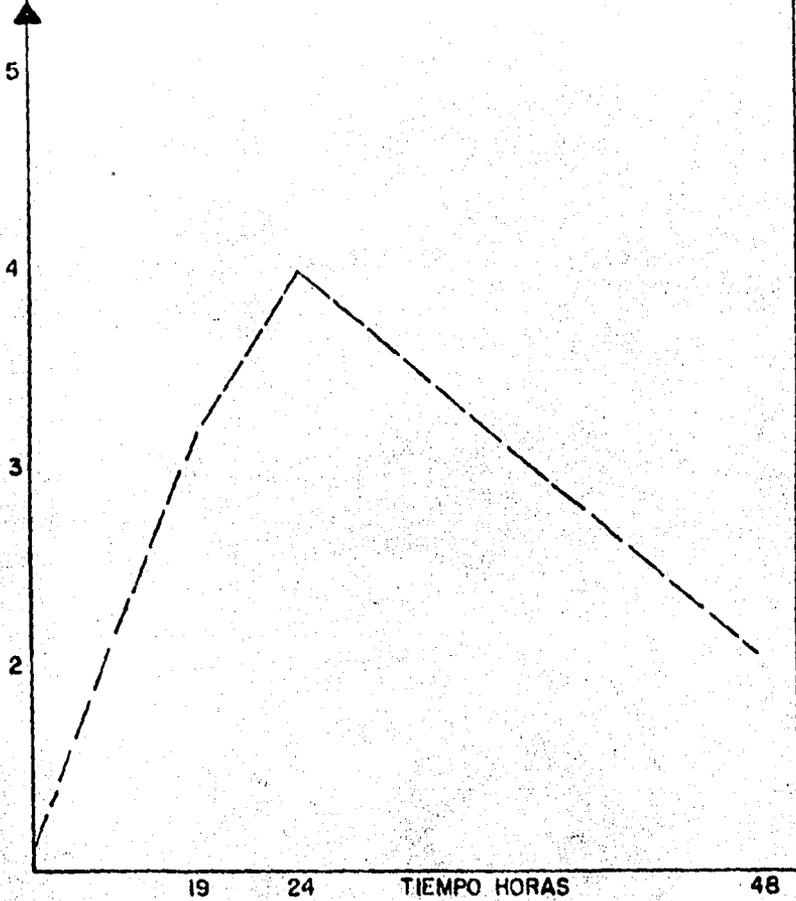
El Rf de la solución estándar de ácido láctico fué de 0.72

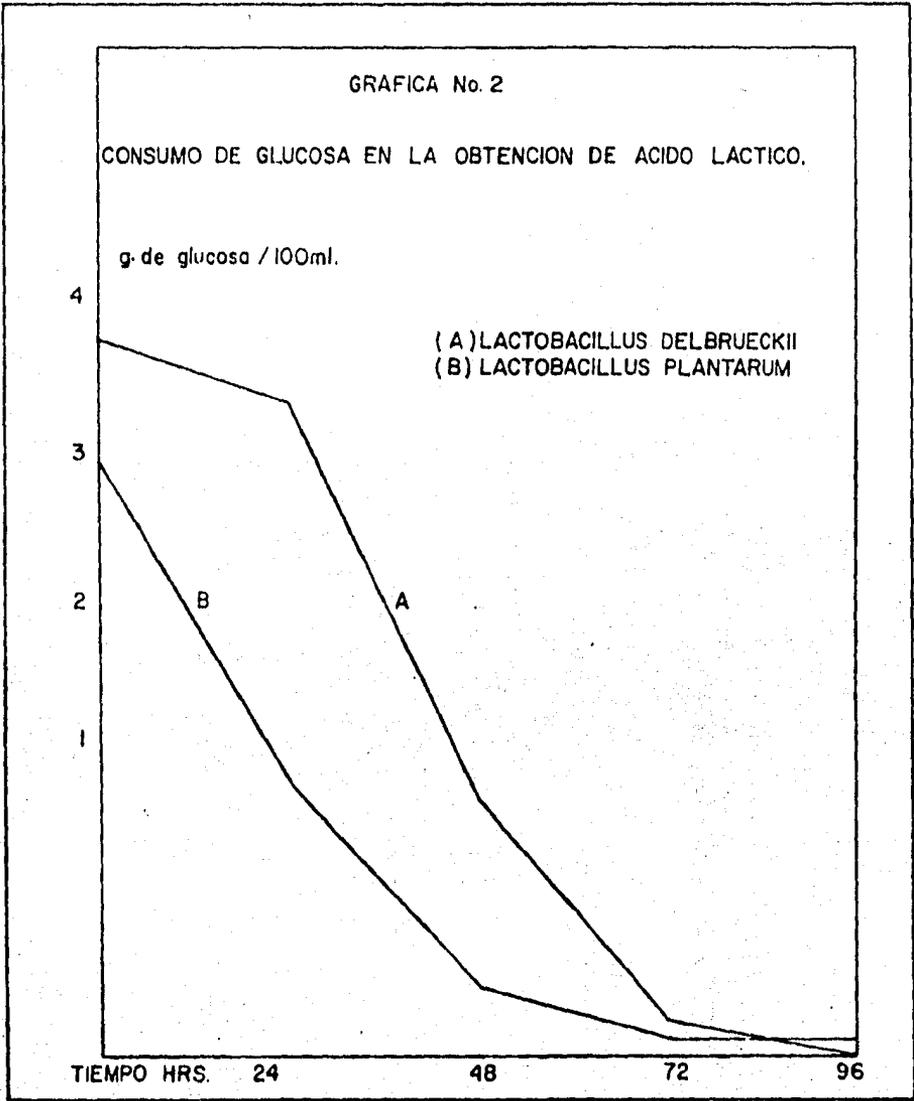
El Rf de la muestra problema fué de ..... 0.72

GRAFICA No. I

PRODUCCION DE GLUCOSA POR HIDROLISIS ENZIMATICA  
DEL ALMIDON DE PAPA

glucosa g /100 ml.





## CONCLUSIONES

### Hidrólisis enzimática:

- El Aspergillus niger se adaptó satisfactoriamente al medio de cultivo M1P.
- El inóculo de cultivo agitado de 24 horas del Aspergillus-niger, fué el adecuado para la hidrólisis enzimática.
- El pH de 5.5, la temperatura de 28 a 30°C, y la agitación de 200 r.p.m., fueron las condiciones utilizadas para llevar a cabo la hidrólisis del almidón.
- La máxima producción de azúcares se llevó a cabo en un intervalo de 22 a 26 horas.

### Fermentación láctica:

- Después de analizar los resultados obtenidos, se seleccionó el medio NP 3, ya que al menor tiempo que se obtienen resultados favorables, el costo de este medio es menor.
- El Lactobacillus plantarum se desarrolló satisfactoriamente en cultivo agitado y estático, y fermenta la glucosa -- más rápidamente que el Lactobacillus delbrueckii, éste último se desarrolla adecuadamente solo en cultivo estático.
- El hidrolizado de papa no cumple con los requerimientos nutricionales para los lactobacilos, ya que estos microorganismos son muy exigentes; fué necesario agregar extracto de levadura.
- El rendimiento obtenido, alcanzó cantidades ligeramente inferiores a los valores promedio reportados en la literatura. Los resultados obtenidos indican la necesidad de efectuar otros estudios para afinar las condiciones establecidas; y hacer un estudio socio-económico muy cuidadoso para evaluar que tan conveniente puede resultar el uso del hidrolizado de papa como fuente de carbono.

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

- 1.- Aiba S.; H., Arthur E.; Millis, N. y F.  
"Biochemical Engineering", Second Edition  
Academic Press, New York 1973.
- 2.- Bull, M.J.  
"Progress in Industrial Microbiology", Vol. 15  
"Starch-Degrading Enzymes of Microbial Origin"  
Edited by M.S. Bull, Elsevier Scientific Publishing Com  
pany, New York 1979.
- 3.- Casida, L.E. Jr.  
"Industrial Microbiology"  
John Wiley & Sons; New York, U.S.A. 1968
- 4.- Cifonelli, J.A. and Smith, F.  
"Detection of Glycosides and other Carbohydrate on Com-  
pounds on Paper Chromatograms", Analytical Chemistry  
Vol. 26 Nº 7, Page 1132-1134, July 1954.
- 5.- Clark, John M.C. Jr.  
"Bioquímica Experimental"  
Editorial Acribia, Zaragoza España 1966.
- 6.- Cordon, T.C.; Tredway, R.H.; Walsh, M.D. and Osborne, M.F.  
"Lactic Acid from Potatoes"  
Ind. Eng. Chem.; 42:1833-1836 (1950).
- 7.- DIFCO, "Manual of Dehydrated Culture"  
Manual Media and Regents for Microbiological and Clini-  
cal Laboratory Procedures; Ninth Edition  
Detroit Michigan, U.S.A. 1953.

- 8.- DIFCO, "Supplementary Literature"  
DIFCO Laboratories, Ninth Edition, Detroit Michigan  
1966.
- 9.- Finn, R.K.; Halvorson, H.O. and Piret, L.E.  
"Lactic Acid Fermentation Rate"  
Ind. Eng. Chem. 42:1857-1861 (1950).
- 10.- Garret, J.F.  
"Lactic Acid"  
Ind. Eng. Chem., 22:1153-1154 (1930).
- 11.- Geo, T. Peckham Jr.  
"The Commercial Manufacture of Lactic Acid"  
Chem. Eng. News. Vol. 22 Nº 26  
Marzo 25 1944.
- 12.- Giral, Fco.  
"Productos Químicos y Farmacéuticos"  
México, D.F. Ed. Atlante, S.A. Vol. 1, 1946
- 13.- Harper, Harold A.  
"Manual de Química Fisiológica", 8a. Edición  
México, Ed. Manual Moderno, 1980.
- 14.- Hockenfull, D.J.D.; M.A.; Ph. D.; M. I. Biol.  
"Progress in Industrial Microbiology", Vol. 2  
"The Lactobacilli"; London Heywood & Company  
L.T.D. 1960.
- 15.- Inskeep, G.C.; Taylor, C. G. and Breitzke, W.C.  
"Lactic Acid from Corn Sugar"  
Ind. Eng. Chem., 44:1955-1966 (1952)

- 16.- Jansz, E.R.; Nirmala, P.; Jeyaraj, E.E. and Nimali, D.S.  
 "Cultivation, Isolation, Purification and Some Properties of the Enzyme Glucoamylase from *Aspergillus niger*"  
 Industrial Microbiology Section, Ceylon Institute of --  
 Scientific and Industrial Research. Colombo 7 Sri Lanka.  
 5 (1): 59-74, 1977.
- 17.- Jorgensen, A.; Hansen, A.  
 "Microbiología de las Fermentaciones Industriales"  
 Editorial Acribia, 7a. Edición, 1980  
 Zaragoza España.
- 18.- Kirk, - Othmer  
 Encyclopedia of Chemical Technology, Third Edition  
 Vol. 13, John Wiley & Sons. 1981, pag. 80-90
- 19.- Kundu, A.K.; Das, S. and Gupta, T.K.  
 "Influence of Culture and Nutritional Conditions on the  
 Production of Amylase by the Submerged Culture of *Aspergillus oryzae*".  
 Journal Ferment. Technol., Vol. 51, Nº 2, Pag. 142-150
- 20.- Lee, T.; Smith and H.V. Claborn  
 "Lactic Esters", preparation and properties  
 Ind. Eng. Chem. Vol. 32, NO 5 692-694 (1940)
- 21.- Lehninger, Albert  
 "Bioquímica"  
 2a. Edición, Editorial Omega, S.A.  
 Barcelona España 1980.
- 22.- Matz, S.A.  
 "The Chemistry and Technology of Cereals as Food and --  
 Feed", Ed. Wetsport Conn, The AVI Publishing Company, -  
 Inc. 1959.

- 23.- Maynard, A. Joslyn  
"Starch and Dextrin"  
Methods in Food Analysis (Physical, Chemical and Instrumental Methods of Analysis), Second Edition  
Academic Press, New York, London 1970.
- 24.- Miller, M.B., Ph. D.; Warren, L. Ph. D.  
"Industrial Microbiology"  
Mc. Graw Hill Book Company, 1976.
- 25.- Norris, J.R.; Ribbons, D.W. Vol. 3A  
"Methods in Microbiology", Edited C. Booth  
Academic Press, London, New York.
- 26.- Norris, J.R.; Ribbons, D.W., Vol. 4  
"Methods in Microbiology", Edited C. Booth  
Academic Press, London, New York.
- 27.- Norris, J.R.; Ribbons, D.W. Vol. 5B  
"Methods in Microbiology", Edited C. Booth  
Academic Press, London, New York.
- 28.- Norris, J.R.; Ribbons, D.W., Vol. 6A  
"Methods in Microbiology", Edited C. Booth  
Academic Press, London, New York.
- 29.- Norris, J.R.; Ribbons, D.W. Vol. 7B  
"Methods in Microbiology", Edited C. Booth  
Academic Press, London, New York.
- 30.- Norris, J.R.; Richmond, M.H.  
"Essays in Applied Microbiology"  
John Wiley & Sons  
Pag. 515, 1981.

- 31.- Prescott, C.S.; Gordon, C.D.  
"Industrial Microbiology"  
Third Edition, Ed. Mc. Graw Hill, 1959.
- 32.- Rose, Anthony H. Ph. D.  
"Industrial Microbiology"  
London Eutherworths, 1961.
- 33.- Sheiki, N.M.; Majid, A. and (Mrs.) Haroon, S.N.  
"Glucoamylase of Aspergillus niger", Microbiological and  
Fermentation B.C.S.I.R. Laboratories Dacca  
7 (4) 165-174, 1970.
- 34.- Smith, L.T. and Claborn, H.V.  
"Utilization of Lactic Acid"  
Ind. Eng. Chem. 17:370 (1939)
- 35.- Snell, E.  
"Lactic Acid and Derivatives"  
Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis  
Vol. 15, Pag. 125-147  
Interscience Publishers, 1972.
- 36.- Sterling, Chayking  
"Biochemistry Laboratory Technichs"  
John Wiley & Sons, Inc. 1966
- 37.- Stohmann, F.; Bruno, B.; Neuhmen, B.; Bainz, A.; Hay---  
duck, F.  
Vol. 1 parte 2  
"Gran Enciclopedia de Química Industrial"  
Editor Fco. Seix Barcelona, Pag. 398-403

- 38.- Tittsler, R.P.; Pederson, C.S.; Snell, E.E.; Hendlin, D.  
and Niven, C.F. Jr.  
"Symposium on the Lactic Acid Bacteria"  
Bact. Revs., 16 (4):227-260 (1952).
- 39.- Underkofler, L.A.  
"Production of Microbial Amylolytic Enzymes"  
Starch Production Technology, Pag. 295-309, 1976.
- 40.- Whittier, E.O. and Rogers, L.A.  
"Continuous Fermentation in the Production of Lactic Acid"  
Ind. Eng. Chem. 23:532-534 (1931).