



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

55
2y

“OBTENCION DE ACIDO LACTICO POR FERMENTACION
SIMULTANEA CON Aspergillus niger Y
Lactobacillus delbrueckii A PARTIR DE PAPA”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
ADELA SAKUNTALA GONZARA ANDRADE

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA :

PRESIDENTE : PROF. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
V O C A L : PROF. ROSA MARIA RAMIREZ GAMA
SECRETARIO : PROF. BEATRIZ LUNA MILLAN
1r SUPLENTE : PROF. MARIA GUADALUPE TSUZUKI REYES
2o SUPLENTE : PROF. ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA EXPERIMENTAL,
Facultad de Química, C.U., U.N.A.M.



QFB. BEATRIZ LUNA M.
Asesor del tema



QFB. MARIA GUADALUPE TSUZUKI R.
Supervisor técnico



ADELA SAKUNTALA GONZARA ANDRADE
Sustentante

Envié mi alma al Cielo,
el Misterio de la Vida
a descifrar,
y, lentamente,
ella a mí retornar,
murmuró:
"Soy por igual,
Infierno y Cielo".

"Rubaiyat" de
Abd-el-Omar Khayyam,
el genio de Nishapur.

Mis manos se abrieron
y ya no hubo oscuridad.
El vacío se llenó,
el silencio calló
y fui Dios.

Khayyam Gonzara.

A mi Padre muy amado.

El color de la rosa
es blanco pero
el aroma es de rosa.
Si el color de la rosa
es blanco,
dime tú
¿de qué color es la
espina?

Rodolfo Gonzara.

A mi mamá: Gloria.

Y un buen día dejó su cruz que llevó al hombro
y se fue...
Despuntando el día se liberó y nos dejó
para siempre... para siempre...

Rodolfo Gonzara.

A la memoria de mi hermanito: Khayyan, que es
"verso, perla,
pluma y flor".

Un ángel
quiso ser hombre,
y bajó del Cielo.
Sufrió y amó,
rió y lloró.
Y al morir
Dios lo atrajo
hacia sí
y le dijo:
"Has visto todo,
has sentido todo,
serás todo".
Y lo besó.

Khayyam Gonzara.

A mi dulce ido, que está vestido de canario y plata,
grana y oro:
Mi papá: Rodolfo.

MI agradecimiento sincero para las siguientes personas:

QFB Beatriz Luna, por su asesoría y apoyo.

QFB Lupita Tsuzuki, por haber soportado estoicamente innumera-
merables tempestades de preguntas.

MC Rosa María Ramírez, por las facilidades otorgadas para -
la realización del proyecto.

QBP Jorge Soto Soria, por sus amenas y constructivas conver-
saciones, ya que gracias a una de ellas, surgió la idea del --
proceso de fermentación simultánea para el presente trabajo.

MC Alfredo Echeagaray, por su interés hacia el presente pro-
yecto.

QFB Adriana Mojía, por su desinteresada ayuda.

A todos ellos, gracias por su amistad.

A todos mis amigos y maestros.

A la Facultad de Química.

A la más antigua Universidad de América.

Mes vers fulgents, doux et fraies,
Vers votre jardin si beau,
Si mes vers avaient des ailes
Comme l'oiseau.

Ils voleraient, étincelles
Vers votre foyer qui rit,
Si mes vers avaient des ailes
Comme l'esprit.

Pres de vous, purs et fideles,
Ils accouraient, nuit et jour,
Si mes vers avaient des ailes
Comme l'amour.

Victor Hugo.

Palabras perfumadas para un Médico
Humano: Dr. René de la Torre.

A su memoria.

Malgré Tout.

PIEDRA AVENTURERA .

Así es mi vida, piedra,
como tú, piedra pequeña,
como tú, piedra ligera,
como tú, canto que ruedas
por las calzadas y por las veredas,
como tú, guijarro humilde de las carreteras,
como tú, que no has servido para ser ni piedra
de una lonja ni piedra
de una audiencia,
ni piedra de un palacio ni piedra de una iglesia...
como tú, piedra aventurera,
como tú -que tal vez estás hecha
sólo para una honda,
piedra
 pequeña
 y ligera.

León Felipe
(Madrid, 1920).

I N D I C E

CAPITULO	PAGINA
I.- Introducción	4
II.- Antecedentes	6
III.- Generalidades	10
IV.- Parte experimental:	20
4.1. Comprobación de pureza y conservación de los cultivos	23
4.2. Selección de la metodología para la preparación del medio de papa y determinación de glucosa	24
4.3. Obtención de ácido láctico en un proceso fermentativo de dos fases	26
4.4. Obtención de ácido láctico en un proceso de fermentación simultánea en el que se inoculó a <u>Aspergillus niger</u> y <u>Lactobacillus delbrueckii</u> -ATCC-9649	34
4.5. Extracción del ácido láctico como lactato de calcio	38
V.- Resultados	41
VI.- Discusión de resultados	61
VII.- Conclusiones y recomendaciones	67
VIII.- Resumen	70
IX.- Apéndice	73
X.- Bibliografía	97

CAPITULO I.

INTRODUCCION.

El ácido láctico es de gran importancia por la amplia variedad de usos que tiene en la industria.

Es un producto que se importa en su totalidad por no producirse en México, lo que genera una considerable salida de divisas.

La posibilidad de que se produzca en el país es amplia ya que se cuenta con disponibilidad continua de las materias primas que se utilizan en su producción.

El ácido láctico se puede obtener a partir de la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos como melazas, maíz, papa, trigo, sorgo, etc. De estos productos, la papa es el sustrato con mayor posibilidad por lo siguiente: el cultivo de la papa se realiza en varios Estados de la República Mexicana en todas las épocas del año. Su producción actual anual es de 960,000 toneladas, de las cuales el 12% se considera papa de desecho por no cumplir con las características que el mercado solicita para ser empleada como alimento. Es factible utilizar esta papa como sustrato en la obtención de ácido láctico, porque tiene un bajo valor comercial (5,6,9,18,23,30,34).

CAPTULO II.

A N T E C E D E N T E S .

La obtención de ácido láctico utilizando papa como sustrato se ha estudiado desde tiempo atrás. En 1950, Cordon et al (6), Maldonado y Garduño en 1984 (23), Páez y Ramírez en 1988 (30), utilizaron la acción enzimática de Aspergillus niger para la conversión del almidón de la papa en azúcares y la posterior fermentación de éstos a ácido láctico por bacterias lácticas.

A partir de 1981, para obtener compuestos de bajo costo, se han diseñado fermentaciones en las que se utilizan productos amiláceos como sustrato; en estos procesos el almidón se hidroliza y fermenta simultáneamente, proceso que se define como sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). Estos procesos han sido utilizados para obtener etanol con el fin de emplearlo como energético (24).

En 1981, Ueda et al (45) reportaron la producción de etanol en un proceso que realizaron en una sola etapa, para ello utilizaron como materia prima raíz de mandioca; glucoamilasa producida por A. niger y A. awamori y fermentaron con Saccharomyces cereviceae.

Lee et al (20), en 1983, describieron un proceso continuo de sacarificación y fermentación simultáneas de almidón utilizando una cepa de Zymomonas mobilis para producir etanol.

También en 1983, Saha y Ueda (36) reportaron la efectividad de la fermentación alcohólica del camote, sin cocimiento previo, usando una preparación de glucoamilasa de Endomycoopsis fibuligera, y la fermentación alcohólica la realizaron con ---

Saccharomyces cerevisiae.

En 1986, Lee et al (19) llevaron a cabo una SSF alcohólica utilizando almidón de sago y células inmovilizadas de Zymomonas mobilis.

Matsumura e Hirata (24) diseñaron una SSF para producir alcohol mediante un modelo cinético en el que usaron glucoamilasa de Rhizopus niveus y fermentaron con Saccharomyces uvarum.

Basándose en los estudios antes mencionados:

EL OBJETIVO PRINCIPAL del presente trabajo es la obtención de ácido láctico a partir de papa de desecho mediante una fermentación simultánea utilizando Aspergillus niger y Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649, y como OBJETIVOS ESPECIFICOS los siguientes:

- 1.- Preparar la suspensión de papa a partir del sustrato -- crudo.
- 2.- Establecer el tiempo óptimo de esterilización del medio de papa.
- 3.- Establecer la concentración óptima de papa en el medio de cultivo.
- 4.- Optimizar la metodología para efectuar la fermentación láctica.
- 5.- Sustituir el extracto de levadura por agua de levadura en la fermentación láctica.
- 6.- Probar el proceso para una fermentación simultánea con Aspergillus niger y Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649 para --

la producción de ácido láctico, adecuando las condiciones de -
experimentación en un rango intermedio para ambos microorganismos.

7.- Realizar la extracción y purificación del lactato de --
calcio.

CAPITULO III.

GENERALIDADES .

El ácido láctico o ácido 2-hidroxi propiónico, $C_3H_6O_3$, de peso molecular 90.08, es un líquido incoloro o amarillento, transparente, viscoso, inodoro, de sabor ácido, muy higroscópico, - soluble en agua, alcohol o éter en todas proporciones. El ácido láctico es el hidroxiaácido más simple con un átomo de carbono asimétrico. Es el constituyente ácido primario de la leche-agria y un compuesto normal en la sangre y tejido muscular de los animales (12,26,30).

Los usos del ácido láctico se dividen en 2 categorías principales: comestible e industrial (30,33).

En el mercado existen 4 grados de pureza de ácido láctico:- 1) crudo (22%); 2) comestible (44-50%), 3) plástico (más del - 50%) y 4) USP (85%) (38). Según los grados de pureza, los usos del ácido láctico son:

1.- Grado crudo: teñido de sedas y lanas, preparación de -- cueros, desecado de pieles, encurtido de vegetales, pastas de soldar, adhesivos, limpiadores y pulidores, electrodeposición, reveladores litográficos, tintas especiales, disolventes.

2.- Grado comestible: acidulante, confitería, inhibidor de bacterias en la fermentación, manufactura de cerveza y bebidas efervescentes, fabricación de levadura, ajustar el pH en aguas duras, saborizante, productos de panadería, conservador.

3.- Grado plástico: industria de plásticos.

4.- Grado USP: farmacia, comestibles, plastificante, catalizador de resinas fenol-aldehídicas.

Derivados del ácido láctico:

- Lactato de calcio: calcioterapia.
- Lactato de fierro: tratamiento de las anemias.
- Lactato de aluminio: antiperspirante.
- Lactato de cobre: electrodeposición.
- Lactato de antimonio: tintorerías.
- Lactato de sodio: plastificantes y disolventes.
- Lactatos de etilo y n-butilo: lubricantes y disolventes - (11,16,18,30,33).

La producción de ácido láctico se lleva a cabo por 2 métodos: químico y microbiológico.

- METODOS QUIMICOS.-

a) Reacción entre acetaldehído y monóxido de carbono, a una temperatura de 200°C y 900 atm de presión.

b) Por hidrólisis de la cianohidrina del acetaldehído preparada a partir de acetaldehído y ácido cianhídrico.

c) Por hidrólisis del ácido 2-cloropropiónico, obtenido por la cloración del ácido propiónico.

d) Por reacción del hidróxido de plata con ácido 2-bromopropiónico (30).

- METODOS MICROBIOLOGICOS.-

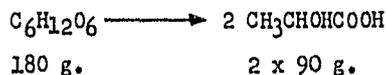
En la obtención por métodos microbiológicos se utilizan una gran variedad de sustratos ricos en carbohidratos, entre ellos los productos amiláceos (6).

El almidón es un excelente sustrato; para ser utilizado es-

necesaria una etapa de pretratamiento para convertirlo a azúcares fermentables. Esta conversión se lleva a cabo mediante el efecto combinado de molienda, calentamiento y el uso de enzimas microbianas (14).

Para liberar los carbohidratos de los almidones, se realiza una hidrólisis con las enzimas amilolíticas de Aspergillus niger. Los azúcares así obtenidos son fermentados por bacterias lácticas (Lactobacillus delbrueckii) en condiciones microaerófilas y a una temperatura de 45-50°C; el ácido láctico se obtiene como lactato de calcio (5,11,14,16,30,33).

Una vez efectuada la fermentación de los azúcares hasta ácido láctico, se observa que a partir de una molécula de glucosa se obtienen 2 moléculas de ácido láctico, por lo que, al fermentar 180 gramos de glucosa se producirán 180 gramos del ácido de acuerdo con la siguiente reacción:



Sin embargo, en la práctica nunca se obtiene el 100% de rendimiento, ya que una parte de los carbohidratos los utilizan los microorganismos en su metabolismo. Para la industria, un rendimiento aceptable es del 85% (18,30).

- METODOS DE EXTRACCION.-

Las técnicas para extraer el ácido láctico varían según la calidad que de éste se desea obtener, de tal forma que las extracciones más frecuentes son (18):

a) Recristalización del lactato de calcio.- Al terminar la fermentación, el mosto se filtra para eliminar residuos sólidos y biomasa (30). Al líquido se le añade CaCO_3 hasta pH 10, se calienta y filtra. A la solución caliente se le agrega carbón-activado para eliminar color e impurezas (5). Posteriormente se concentra hasta el 32% del volumen original y se permite la cristalización del lactato de calcio a temperatura de 4-5°C -- (16,18,30,33). Por este método se obtiene ácido láctico en sus grados comestible, plástico y USP (38).

b) Recristalización del lactato de zinc.- Algunas veces es conveniente preparar lactato de zinc, debido a su baja solubilidad (5).

En un método, al fermentado se le agrega ZnO , se deja reposar durante 8 días y después se calienta a ebullición, se filtra, decolora, se concentra la solución y se cristaliza la sal en agua caliente (12,30).

Un segundo método consiste en transformar el lactato de calcio a la sal de zinc mediante el uso de ZnSO_4 o ZnCO_3 (33,38).

c) Preparación de lactato de metilo.- La solución acuosa de ácido láctico se concentra (10,30). Luego se añade metanol al ácido, se adiciona H_2SO_4 que cataliza la esterificación cuando la mezcla se calienta a 100°C (30,33). El producto se separa de la mezcla de alcohol y agua por arrastre de vapor (10).

El lactato de metilo se fracciona a presión atmosférica en una columna resistente a la corrosión. La solución acuosa resi

dual procedente de este tratamiento es el ácido láctico de calidad USP (5,16,30).

d) Oxidación de impurezas orgánicas.- Al oxidar los licores crudos de los lactatos o al ácido libre con NaOCl , KMnO_4 , ---- $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, K_2CrO_4 , HNO_3 , $\text{Cl}_2(\text{gas})$, $\text{O}_3(\text{gas})$, se obtiene una purificación parcial del ácido láctico. Por este proceso se obtiene ácido de grado comestible (33,38).

e) Extracción con éter isopropílico.- El ácido láctico se extrae del líquido de fermentación con éter isopropílico, pero el proceso es ineficiente y peligroso porque el disolvente es inflamable y forma peróxidos explosivos (30,33,38).

f) Destilación fraccionada.- Cuando se calienta el ácido láctico a su punto de ebullición, se ocasiona la autoesterificación con formación de poliésteres volátiles, lo que industrialmente hace impracticable al método (30,33,38).

CARACTERÍSTICAS DE Aspergillus niger.--

Los aspergilos son hongos filamentosos saprófitos (21), capaces de desarrollar en muchos sustratos (32), por lo que constituyen la principal fuente de contaminación de los diversos medios de cultivo (46).

Aspergillus niger y algunas otras especies, se pueden adaptar a la vida parasitaria causando otomicosis, infecciones en piel, nariz, orbitales, cardiovasculares, asma y aspergilosis pulmonar (21,30,46).

Las colonias jóvenes de Aspergillus niger son blancas, ligeramente amarillentas, sobre las que van apareciendo puntos negros que son las cabezas aspergilares, típicamente radiadas y globosas, que alcanzan hasta 1 mm de diámetro, presentando conidióforos de tamaño variable y vesículas globosas de paredes delgadas, de 20 a 50 micras de diámetro, con esterigmas en una serie (23,30).

- IMPORTANCIA.- El ascomiceto A. niger y otros del mismo género, se utilizan en la producción comercial de glucoamilasa, enzima que digiere los almidones y los transforma en azúcares simples, los que son fermentados por otros microorganismos para obtener diferentes productos (1).

- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.- La acción hidrolítica de A. niger sobre el almidón se debe a la α -amilasa y a la glucoamilasa. Muchos microorganismos producen glucoamilasa, pero al mismo tiempo tienen una considerable producción de transglucosidasa,

enzima cuya importancia estriba en que reduce los rendimientos de glucosa obtenida a partir del almidón, pues produce glicosa cáridos no fermentables con enlaces α -1,6 (23,30,32,37).

CARACTERISTICAS DE Lactobacillus delbrueckii.-

- MORFOLOGIA.- Los lactobacilos son bacterias Gram positivas, en forma de bacilos regulares, no esporulados, aislados o formando cadenas cortas. En la especie delbrueckii, los bacilos miden 0.5-0.8 micras de ancho por 2-9 micras de largo, con extremos redondeados y revelan granulaciones internas cuando se tiñen con azul de metileno (2,30). No son móviles y las colonias normalmente son rugosas y no pigmentadas. El desarrollo en medio sólido se aumenta por anaerobiosis y presencia de CO₂ en concentraciones del 5 al 10%. En medio líquido, el microorganismo desarrolla en todo el caldo y las células se sedimentan después de que el crecimiento cesa. El sedimento es terso y homogéneo; nunca se forman películas (2,3).

- CONDICIONES DE NUTRICION Y DESARROLLO.- Los lactobacilos son microorganismos extremadamente exigentes y delicados, pues no sólo requieren carbohidratos como fuente de energía y carbono, sino también peptona, extractos de carne y levadura y suplementos como jugo de jitomate, manganeso, acetato y ésteres de ácido oleico, especialmente Tween 80, que son esenciales para la mayoría de las especies.

Los lactobacilos desarrollan mejor en un medio ligeramente ácido de pH 5.5-6.2, en condiciones microaerófilas o anaerobias y en un rango de temperatura de mesófilo a ligeramente termófilo (30-40°C como óptimo) (2,3,7,30,42).

-CAPACIDAD DE FERMENTACION.- Las cepas de Lactobacillus ---

delbrueckii forman ácido sin gas a partir de glucosa y otros -
carbohidratos; son típicamente homofermentativos, producen ---
D(-)ácido láctico como principal producto carbonado final del-
metabolismo de los carbohidratos (2,3).

- PROCEDIMIENTOS DE CONSERVACION.- Para la conservación du-
rante un periodo de tiempo corto, los cultivos se desarrollan-
en medio MRS, el cual se incuba hasta que el desarrollo sea vi-
sible, se refrigera a 4-5°C y se transfiere mensualmente.

El método de elección para la conservación por un periodo -
largo de tiempo es la liofilización (3,8).

CAPITULO IV.

PARTE
EXPERIMENTAL.

Los microorganismos empleados fueron:

1.- Una cepa de Aspergillus niger proveniente del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, - UNAM, a la cual se le comprobó, en una tesis anterior, su capacidad amilolítica.

2.- Una cepa de Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649, proveniente del Cepario de la Facultad de Química, UNAM, caracterizada como productora de ácido láctico.

Este trabajo se dividió en 5 etapas que corresponden a:

I.- Comprobación de la pureza de las cepas a emplear y conservación de las mismas.

II.- Selección de la metodología para la preparación del medio de papa y determinación de glucosa.

III.- Obtención de ácido láctico en un proceso fermentativo de 2 fases:

3.1. FASE I.- Fermentación amilolítica (FA):

Durante ésta se efectúa la hidrólisis del almidón de papa - hasta glucosa, mediante la acción de la glucoamilasa que sintetiza Aspergillus niger.

3.2. FASE II.- Fermentación láctica (FL):

La glucosa libre obtenida en la fase I se fermenta con un cultivo de Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649 hasta ácido láctico.

IV.- Obtención de ácido láctico en un proceso de fermentación simultánea en el que se inoculó a Aspergillus niger y Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649.

V.- Extracción del ácido láctico como lactato de calcio.

I.- COMPROBACION DE PUREZA Y CONSERVACION DE LOS CULTIVOS.

1.1.- Aspergillus niger:

La cepa de Aspergillus niger se sembró en tubos inclinados con medio de agar Dextrosa-Sabouraud (apéndice 9.2.1.1), se incubaron durante 7 días a 28°C, se verificó la pureza mediante microcultivo en el que se observaron las características microscópicas del hongo.

Para conservar la cepa, los cultivos se mantuvieron en refrigeración a 4-5°C y se resembraron cada 3 meses en el medio antes indicado.

1.2.- Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649:

La cepa de Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649 proveniente del Cepario de la Facultad de Química, se recibió sembrada en un tubo inclinado que contenía agar AOAC, el cual se había incubado 8 días a 45°C. A ese cultivo se le agregaron 5 ml de -- caldo AOAC estéril (apéndice 9.2.2.2) y se incubó a 40-45°C durante 48 horas para propagar el cultivo. Una vez efectuado lo anterior, la cepa se resembró en tubos de 13x100 con tapón de resca conteniendo unos caldo AOAC y otros caldo MRS (apéndice 9.2.2.3), se incubaron 48 horas a 40-42°C, se mantuvieron en refrigeración, se resembraban mensualmente en los 2 caldos indicados y se verificaba la pureza mediante tinción de Gram y tinción con azul de metileno, observándose las características propias del microorganismo.

I.- COMPROBACION DE PUREZA Y CONSERVACION DE LOS CULTIVOS.

1.1.- Aspergillus niger:

La cepa de Aspergillus niger se sembró en tubos inclinados con medio de agar Dextrosa-Sabouraud (apéndice 9.2.1.1), se incubaron durante 7 días a 28°C, se verificó la pureza mediante microcultivo en el que se observaron las características microscópicas del hongo.

Para conservar la cepa, los cultivos se mantuvieron en refrigeración a 4-5°C y se resembraron cada 3 meses en el medio antes indicado.

1.2.- Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649:

La cepa de Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649 proveniente del Cepario de la Facultad de Química, se recibió sembrada en un tubo inclinado que contenía agar AOAC, el cual se había incubado 8 días a 45°C. A ese cultivo se le agregaron 5 ml de -- caldo AOAC estéril (apéndice 9.2.2.2) y se incubó a 40-45°C durante 48 horas para propagar el cultivo. Una vez efectuado lo anterior, la cepa se resembró en tubos de 13x100 con tapón de rosca conteniendo unos caldo AOAC y otros caldo MRS (apéndice 9.2.2.3), se incubaron 48 horas a 40-42°C, se mantuvieron en refrigeración, se resembraban mensualmente en los 2 caldos indicados y se verificaba la pureza mediante tinción de Gram y tinción con azul de metileno, observándose las características propias del microorganismo.

II.- SELECCION DE LA METODOLOGIA PARA LA PREPARACION DEL --
MEDIO DE PAPA Y DETERMINACION DE GLUCOSA.

2.1.- Preparación del medio de papa:

En trabajos anteriores (23,30) la preparación del medio de cultivo se efectuó sometiendo a la papa a un cocimiento durante 2 horas, previo a la esterilización. En éste trabajo se determinó la factibilidad de omitir el cocimiento de la papa y obtener una concentración de carbohidratos totales similar a la obtenida con este pretratamiento del sustrato. Con tal fin se pesaron 250 g de papa cruda y sin pelar, estos se homogenizaron con agua para obtener 1 litro de suspensión a la que se añadieron sales (apéndice 9.2.3.2).

La suspensión se dividió en 4 lotes; 3 de ellos fueron sometidos a esterilización a una temperatura de 118°C y tiempos de calentamiento de 15, 30 y 45 minutos, procediéndose a determinar en los 4 lotes los carbohidratos totales por el método de antrona (apéndice 9.3.2).

Con base en los resultados obtenidos (tabla 1) se seleccionó el tiempo de 30 minutos de esterilización, mismo que fue aplicado en la preparación del medio de cultivo empleado en las siguientes etapas del estudio.

2.2.- Evaluación de 2 métodos para la determinación de glucosa:

Se compararon 2 métodos para la cuantificación de glucosa considerando el menor costo de reactivos, menor grado de contg

minación, seguridad personal y confiabilidad.

Los métodos valorados fueron:

a.- Método de orto-toluidina (apéndice 9.3.3.1).

b.- Método de Nelson-Somogyi (apéndice 9.3.3.2).

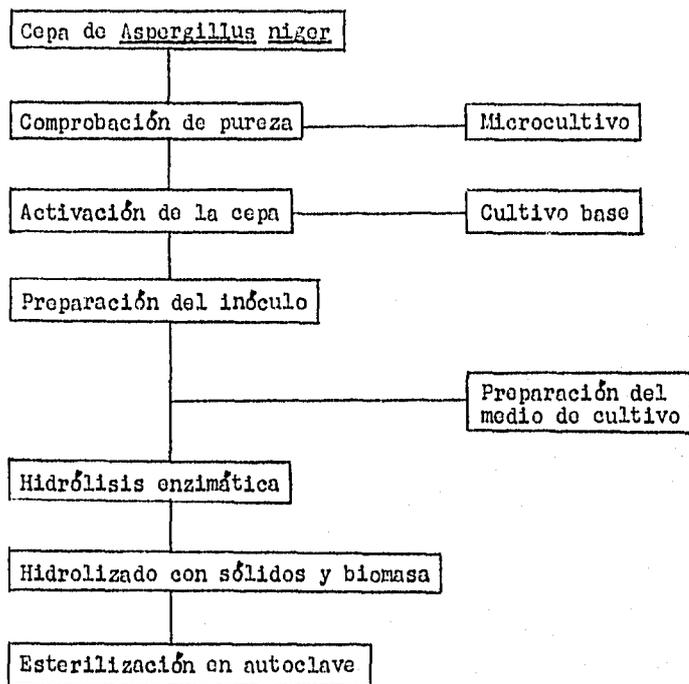
Las pruebas se realizaron en medio MPC/S (apéndice 9.2.3.2) inoculado con Aspergillus niger bajo las siguientes condiciones experimentales:

- Papa: 350 g/litro
- Inóculo de A. niger: 10% v/v
- Incubación: 24 horas a 28°C y 200 rpm. NOTA: Se conservó un testigo SIN inocular (ver tabla 2).

III.- OBTENCION DE ACIDO LACTICO EN UN PROCESO FERMENTATIVO DE DOS FASES.

3.1.- FASE I: FERMENTACION AMILOLITICA (FA).

DIAGRAMA DE TRABAJO.



3.1.1.- Preparación del inóculo de Aspergillus niger y adaptación al medio de cultivo a base de papa.

La copa de A. niger se sembró en un matraz Erlenmeyer de -- 300 ml conteniendo 50 ml de agar Dextrosa-Sabouraud (apéndice 9.2.1.1), el cual se incubó a 28°C durante 7 días; al término de este tiempo se le adicionó la cantidad necesaria de solución de Tween 80 al 0.2% para preparar una suspensión de esporas -- con un número aproximado de 80×10^6 /ml (técnica de conteo en la cámara de Neubauer, apéndice 9.3.1). Se adicionaron 4 ml de ésta suspensión a un matraz Erlenmeyer de 300 ml que contenía -- 100 ml de medio estéril de papa MPc/S de 350 g papa/litro (apéndice 9.2.3.2), se incubó a 28°C y 200 rpm durante 24 horas (tabla 3 y gráfica 1) tiempo que tarda en iniciarse la hidrólisis del almidón. El cultivo así obtenido se marcó como "inóculo de Aspergillus niger".

3.1.2.- Hidrólisis enzimática del almidón.

Del matraz marcado como "inóculo de A. niger" se tomaron volúmenes de 10 ml que se transfirieron a cada uno de los matraces Erlenmeyer de 300 ml que contenían 100 ml de medio estéril MPc/S (inóculo de 10% v/v); después de esta operación, los matraces sembrados se incubaron a 28°C, 200 rpm y se determinó el tiempo en el cual se obtiene la mayor concentración de glucosa, la cual se cuantificó cada 24 horas por el método de orto-toluidina (apéndice 9.3.3.1), observándose que la mayor concentración de glucosa se obtiene a las 48 horas de incubación-

(tabla 4 y gráfica 2).

3.1.3.- Hidrólisis enzimática del almidón de papa.

Una vez establecidas las variables experimentales para la fermentación amilolítica (FA) se procedió a comprobar el tiempo de hidrólisis del almidón; para ello se corrieron 4 fermentaciones, cada una por quintuplicado. En éstas se mantuvieron las condiciones iniciales que corresponden a matraces Erlenmeyer de 300 ml conteniendo 100 ml de MPC/S de 350 g papa/litro (apéndice 9.2.3.2) y esterilizados a 118°C durante 30 minutos; pH 5.5-6.0, temperatura de 28°C; agitación de 200 rpm; inóculo de A. niger de 10% v/v y tiempo de fermentación de 48 horas -- (tabla 5).

Los métodos utilizados en las determinaciones fueron:

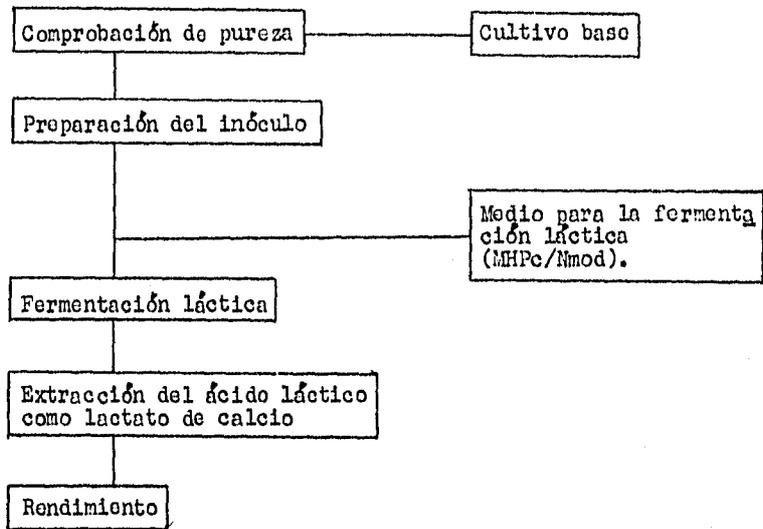
- Carbohidratos totales: antrona (apéndice 9.3.2).
- Glucosa: Nelson-Somogyi (apéndice 9.3.3.2).

Al finalizar las fermentaciones amilolíticas se esterilizó el hidrolizado a 118°C durante 15 minutos, con lo que se obtuvo el medio base para la fermentación láctica.

3.2.- FASE II: FERMENTACION LACTICA (FL).

DIAGRAMA DE TRABAJO.

Cepa de Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649



3.2.1.- Fermentación láctica (FL).

La segunda fase consistió en la fermentación de la glucosa-obtonida en la fase I mediante la acción metabólica de Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649 para obtener ácido láctico.

Para el desarrollo de los lactobacilos el hidrolizado de papa, que contenía sólidos y biomasa, se complementó con nutrientes esenciales y se le agregó CaCO_3 (medio MHPc/Nmod, apéndice 9.2.3.3).

3.2.2.- Preparación del inóculo de Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649.

Con el fin de favorecer el metabolismo microaerofílico de los lactobacilos, en tubos de 13x100 con tapón de rosca, se colocaron 5 ml de medio #3 (MPLac, apéndice 9.2.2.3) y se esterilizaron durante 15 minutos a 121°C. Posteriormente se sembraron con 0.25 ml de un cultivo de 48 horas de L. delbrueckii -- ATCC-9649 obtenido en medio AOAC o medio MRS (apéndice 9.2.2.1 y 9.2.2.2, respectivamente). Los tubos así preparados se incubaron durante 48 horas a 40-42°C.

3.2.3.- Condiciones para la fermentación láctica.

En trabajos anteriores (23,30) se establecieron condiciones experimentales para la fermentación láctica, las cuales se presentan a continuación:

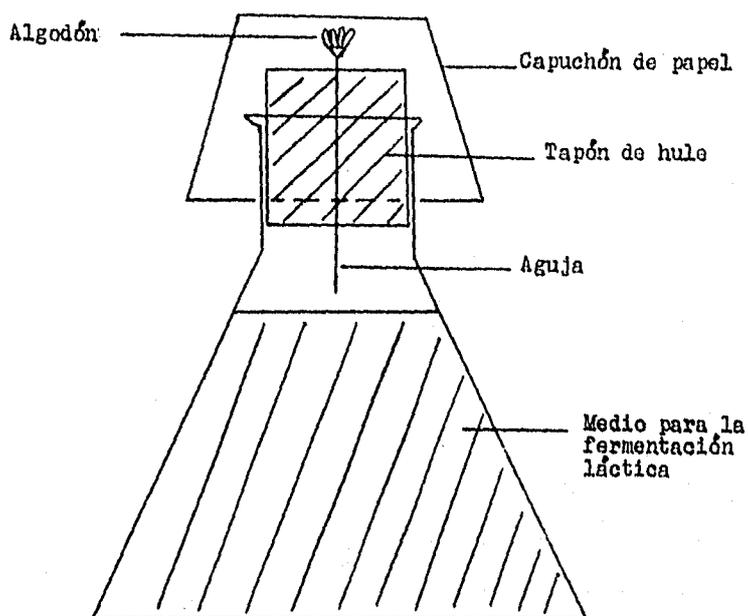
- Matraz utilizado: Erlenmeyer de 125 ml con tapón de algodón.
- Aereación: condiciones microaerofílicas.

- Agitación: SIN agitación.
- Extracto de levadura: 1.5%
- CaCO_3 : 2%
- pH inicial: 6.0
- Temperatura: 45°C
- Inóculo de L. delbrueckii ATCC-9649: 5% v/v.
- pH proceso: 4.5
- Tiempo de fermentación: 168 horas.

Para éste trabajo, se modificaron algunas de estas condiciones y fueron las siguientes:

- Matraz utilizado: Erlenmeyer de 125 ml con tapón de hule (figura 1).
- Agua de levadura al 20% (utilizada en lugar del extracto de levadura): 15 ml/100 ml de medio.

FIGURA 1.- Esquema del matraz para la fermentación láctica.



3.2.4.- Fermentación láctica (FL).

Con el fin de determinar la cantidad de papa para obtener el máximo rendimiento de ácido láctico, el contenido de papa/litro de medio se varió en la siguiente forma:

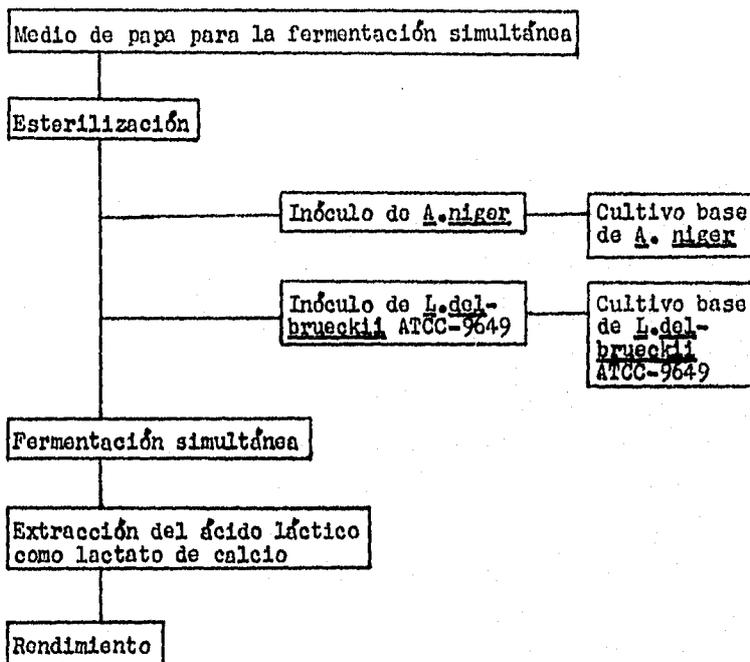
- Lote 1: 150 g papa/litro.
- Lote 2: 200 g papa/litro.
- Lote 3: 350 g papa/litro.

Cada fermentación se llevó a cabo por triplicado o quintuplicado, en matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 100 ml de medio MHPc/Nmod (apéndice 9.2.3.3).

IV.- OBTENCION DE ACIDO LACTICO EN UN PROCESO DE FERMENTACION SIMULTANEA EN EL QUE SE INOCULO A *Aspergillus niger* y *Lactobacillus delbrueckii* ATCC-9649.

4.1.- FERMENTACION SIMULTANEA (FS).

DIAGRAMA DE TRABAJO.



4.2.- Fermentación simultánea (FS).

En esta parte del proyecto se llevó a cabo la fermentación láctica en una sola etapa, desde almidón de papa hasta ácido láctico, para lo cual, y con base en los experimentos anteriores, se mezclaron los 2 medios de cultivo empleados anteriormente, resultando el que se denominó como "medio de papa para la fermentación simultánea, MP/FS" (apéndice 9.2.3.4), manteniéndose la esterilización durante 30 minutos.

4.3.- Preparación de los inóculos microbianos.

Los inóculos de Aspergillus niger y Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649 se obtuvieron en la forma antes mencionada para la fermentación amilolítica y fermentación láctica, respectivamente.

4.4.- Condiciones para la fermentación simultánea.

Para elegir las condiciones experimentales, se tuvieron en cuenta las condiciones óptimas de desarrollo de los microorganismos empleados, así como la actividad óptima de las enzimas purificadas involucradas reportadas en la bibliografía (1,2,3, 14):

	MICROORGANISMOS		ENZIMAS	
	<u>A. niger</u>	<u>L. delbrueckii</u>	α -amilasa	Glucosa amilasa
Temperatura óptima (°C)	28-37	40-45	55	65
pH óptimo	5.0-6.0	5.5-6.2	5.0 Se activa en presen- cia de iones de calcio	3.0- 5.0

Basándose en lo anterior, las condiciones se ubicaron en un rango que favoreciera ligeramente a Lactobacillus delbrueckii-ATCC-9649 debido a su sensibilidad a los cambios ambientales.

Se establecieron las siguientes condiciones experimentales para la fermentación simultánea:

- Contenido de papa/litro en el MP/FS: 350 g.
- a) Matraz: Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón.
Volumen de MP/FS: 100 ml.
- b) Frasco: 800 ml con tapón de hule-espuma.
Volumen de MP/FS: 500 ml.
- Carbohidratos iniciales: los contenidos en la papa.
- pH inicial: 5.5-5.7 y una vez iniciado el proceso fermentativo, el pH se reajustaba a un valor de 5.4 mediante la adición de CaCO_3 cada 24 horas.
- Inóculo de A. niger: 10% v/v.
- Inóculo de L. delbrueckii ATCC-9649: 5% v/v.
- Temperatura de fermentación: 38-40°C.
- Agitación: 50 rpm con el objeto de mantener homogéneo el medio y favorecer el desarrollo de A. niger en la superficie y crear condiciones microaerofílicas para L. delbrueckii ATCC-9649.

4.5.- Determinaciones realizadas.

- pH.
- Carbohidratos totales (método de antrona, apéndice 9.3.2).
- Ácido láctico (método de Nanni-Baldini, apéndice 9.3.4).

- Azúcares residuales (método de Nelson-Somogyi, apéndice --
9.3.3.2).

Se realizaron cada 24 horas durante 10 días, tiempo al que se alcanzó 0.05-0.09 g de azúcares residuales/100 ml de MP/FS.

Con las condiciones indicadas se corrieron 3 fermentaciones con volúmenes de 100 ml y 2 fermentaciones con volúmenes de -- 500 ml. (tablas 7 a 12 y gráficas 3 a 6).

V.- EXTRACCION DEL ACIDO LACTICO COMO LACTATO DE CALCIO.

DIAGRAMA DE FLUJO.

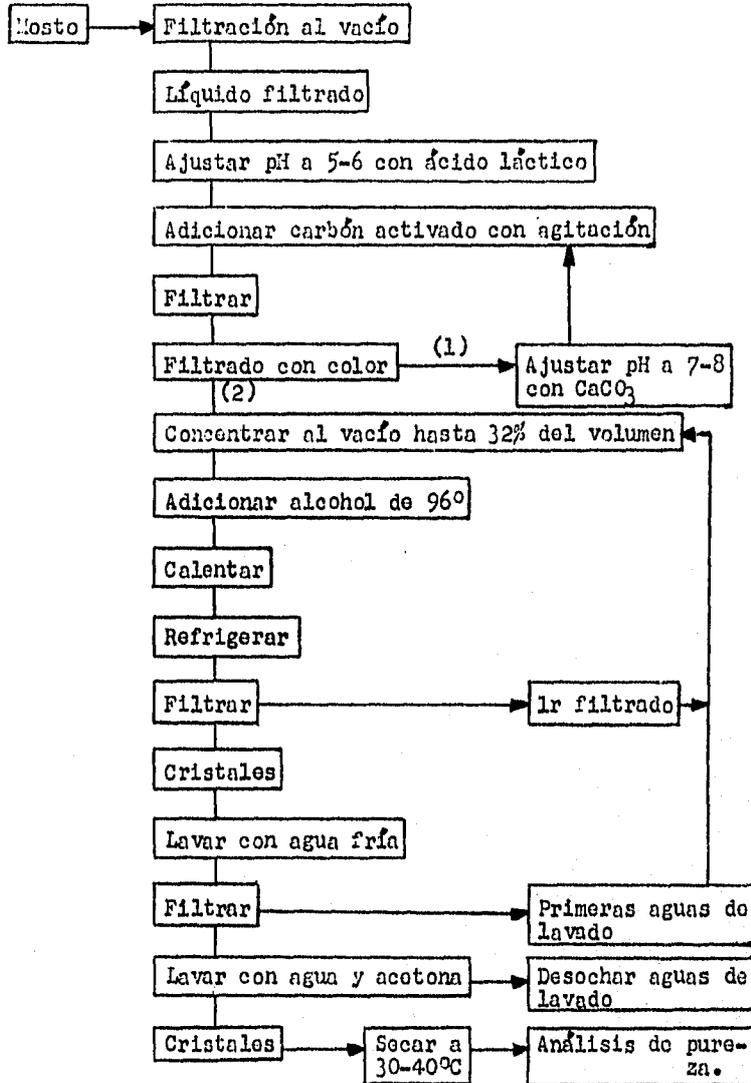
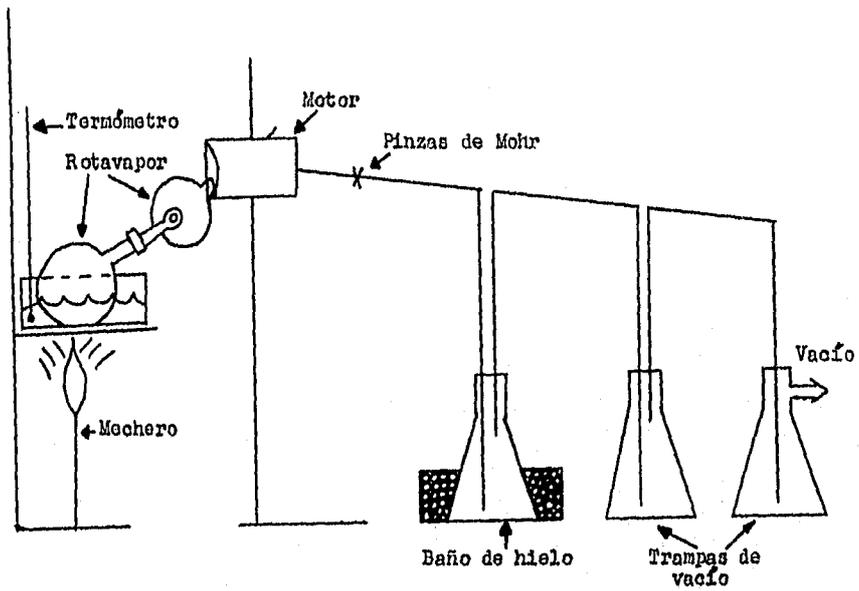


FIGURA 2.- Esquema del sistema de concentración al vacío --
(30).



5.1.- Extracción del ácido láctico como lactato de calcio -
(5,11,14,16,18,30,33).

Para la extracción del lactato de calcio, el mosto se calentó a 60°C en baño maría y se filtró al vacío a través de algodón. Antes de desochar los sólidos, estos se lavaron con pequeñas porciones de agua caliente, que se unieron al líquido filtrado, luego de lo cual se ajustó el pH a 5-6 con unas gotas de ácido láctico QP.

Manteniendo caliente la solución y con el fin de decolorarla, se añadieron porciones de carbón activado, agitando después de cada adición; al final se filtró para eliminar el carbón.

Si el filtrado presentaba color, se ajustaba el pH a 7-8 -- con CaCO_3 y se adicionaba carbón activado agitando constantemente la solución. Una vez filtrada y decolorada ésta, se concentró al vacío hasta el 32% del volumen y aún caliente se adicionó alcohol de 96°, se calentó a 45-50°C y se refrigeró para permitir la cristalización del lactato de calcio.

Una vez separados del líquido, los cristales de lactato de calcio se lavaron 2-3 veces con agua helada, guardando el agua de lavado para una segunda concentración al vacío. Efectuada ésta, los cristales se unieron a los primeros y se lavaron con porciones mínimas de agua destilada y acetona, lavados que se desecharon. Los cristales de lactato de calcio se secaron a -- 30-40°C y se sometieron a los ensayos según las especificaciones de la USP XV (46). También se determinó el punto de fusión.

CAPITULO V

RESULTADOS .

TABLA 1.- Carbohidratos totales en el medio de papa sin esterilizar y esterilizado a diferentes tiempos (método de antrona, apéndice 9.3.2).

Tiempo de esterilización (minutos)	Carbohidratos totales				Media g/100 ml
	g/100 ml				
0	1.97	1.80	1.64	1.81	1.80
15	2.67	2.55	2.64	2.30	2.54
30	4.68	5.25	4.52	5.18	4.91
45	3.24	3.50	3.34	3.40	3.37

Cada valor corresponde al valor promedio de determinaciones hechas por triplicado.

NOTA: El aspecto físico del medio MPC/S estéril fue:

Gris con un ligero tinte café, denso, viscoso, opaco.

TABLA 2.- Evaluación de 2 métodos para la determinación de glucosa.

Clave del lote analizado	G L U C O S A (mg/100 ml)	
	Orto-toluidina	Nelson-Somogyi
Testigo	19	27
1	164	221
2	102	111
3	205	210
4	153	128
5	215	207
Media	168	175

Los resultados son el promedio de determinaciones efectuadas por triplicado.

TABLA 3.- Tiempo de adaptación de Aspergillus niger al medio de papa MPC/S.

Horas	Glucosa (mg/100 ml)
0	196
24	28
48	600
72	1,150
96	1,300

Las determinaciones se hicieron por triplicado utilizando el método de cuantificación de glucosa de Nelson-Somogyi (apéndice 9.3.3.2).

GRAFICA 1.- Tiempo de adaptación de Aspergillus niger al medio de papa MPe/S.

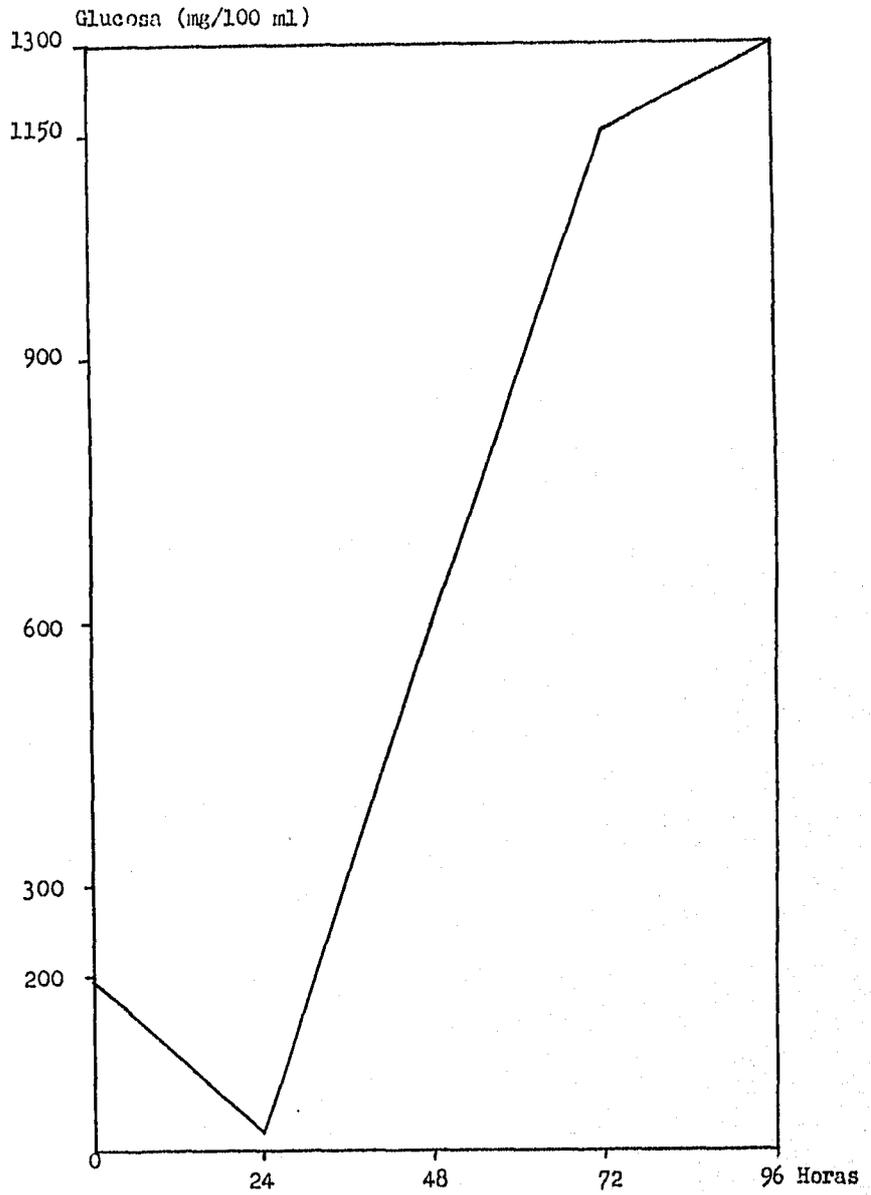


TABLA 4.- Determinación del tiempo de hidrólisis enzimática del almidón.

Horas	mg glucosa/100 ml
0	300
24	780
48	1,670
72	820
96	700

Las determinaciones se realizaron por triplicado (método de orto-toluidina, apéndice 9.3.3.1).

GRÁFICA 2.- Determinación del tiempo de hidrólisis enzimática del almidón.

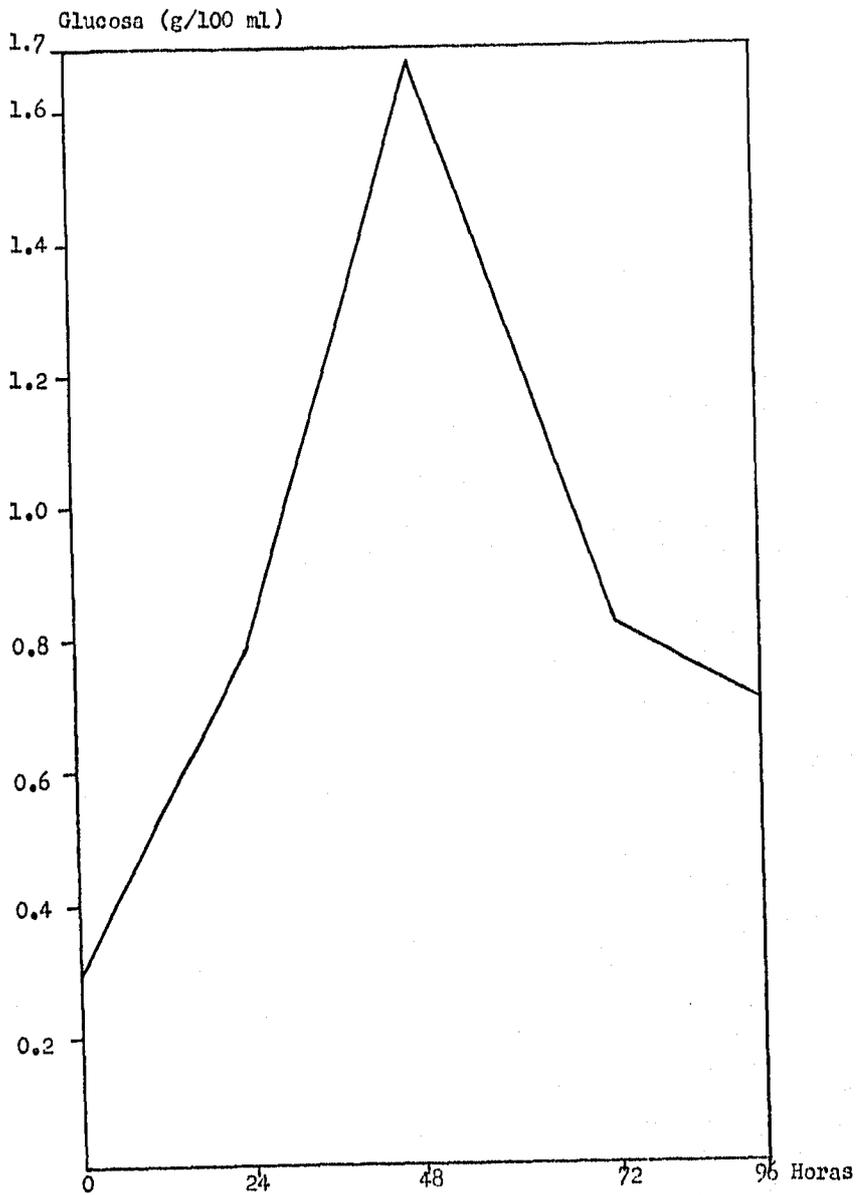


TABLA 5.- Hidrólisis enzimática del almidón de papa (fermentación amilolítica, FA).

FERMENTACION	CHO's mg/100 ml	GLUCOSA mg/100 ml
1	6,550	1,990
2	6,300	1,930
3	6,000	1,610
4	7,740	2,270
Media	6,650	1,950

Los métodos utilizados en las determinaciones fueron:

- Carbohidratos totales: antrona (apéndice 9.3.2).
- Glucosa: Nelson-Somogyi (apéndice 9.3.3.2).

Al finalizar las fermentaciones amilolíticas se esterilizó el hidrolizado a 118°C durante 15 minutos, con lo que se obtuvo el medio base para la fermentación láctica (FL).

TABLA 6.- Comparación del rendimiento de ácido láctico en - medios MHPc/Nmod en los que se varió la concentración del sustrato inicial (fermentación láctica, FL).

g papa/ litro	Fermen tación	Gluc.in. mg/100 ml	Ac.láct. mg/100 ml	Rend. %	Rend.medio %
150	1	440	215	54.35	54.76
	2	460	227	54.88	
	3	410	203	55.06	
200	1	717	430	66.70	67.37
	2	774	476	68.39	
	3	647	390	67.03	
350	1	1,800	1,421	87.80	88.31
	2	1,510	1,206	88.82	
	3	1,290	1,040	89.66	
	4	1,660	1,300	87.09	
	5	1,450	1,150	88.20	

Los resultados son el promedio de fermentaciones efectuadas cada una, por quintuplicado.

Los métodos empleados en las determinaciones fueron:

- Glucosa: orto-toluidina (apéndice 9.3.3.1).
- Acido láctico: Nanni-Baldini (apéndice 9.3.4).

NOTA: El rendimiento de ácido láctico está calculado a partir de la glucosa inicial.

TABLA 7.- Valores de pH a diferentes periodos de incubación en la fermentación de papa inoculada con Aspergillus niger y Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649 (fermentación simultánea, -FS).

Horas	F E R M E N T A C I O N			
	1	2	3	4
0	5.7	5.65	5.6	5.5
24	6.0	4.8	5.1	5.4
48	5.4	4.8	4.8	5.1
72	5.1	4.5	4.8	4.8
96	5.1	4.5	4.5	4.5
120	4.8	4.5	4.5	4.8
144	4.5	4.5	4.5	4.8
168	4.8	5.1	4.8	5.1
192	5.1	5.1	5.1	5.1
216	5.4	5.4	5.4	5.4
240	5.4	5.4	5.4	5.4

NOTA: Resultados de experimentos realizados por triplicado.

GRAFICA 3.- Fermentación simultánea: pH.

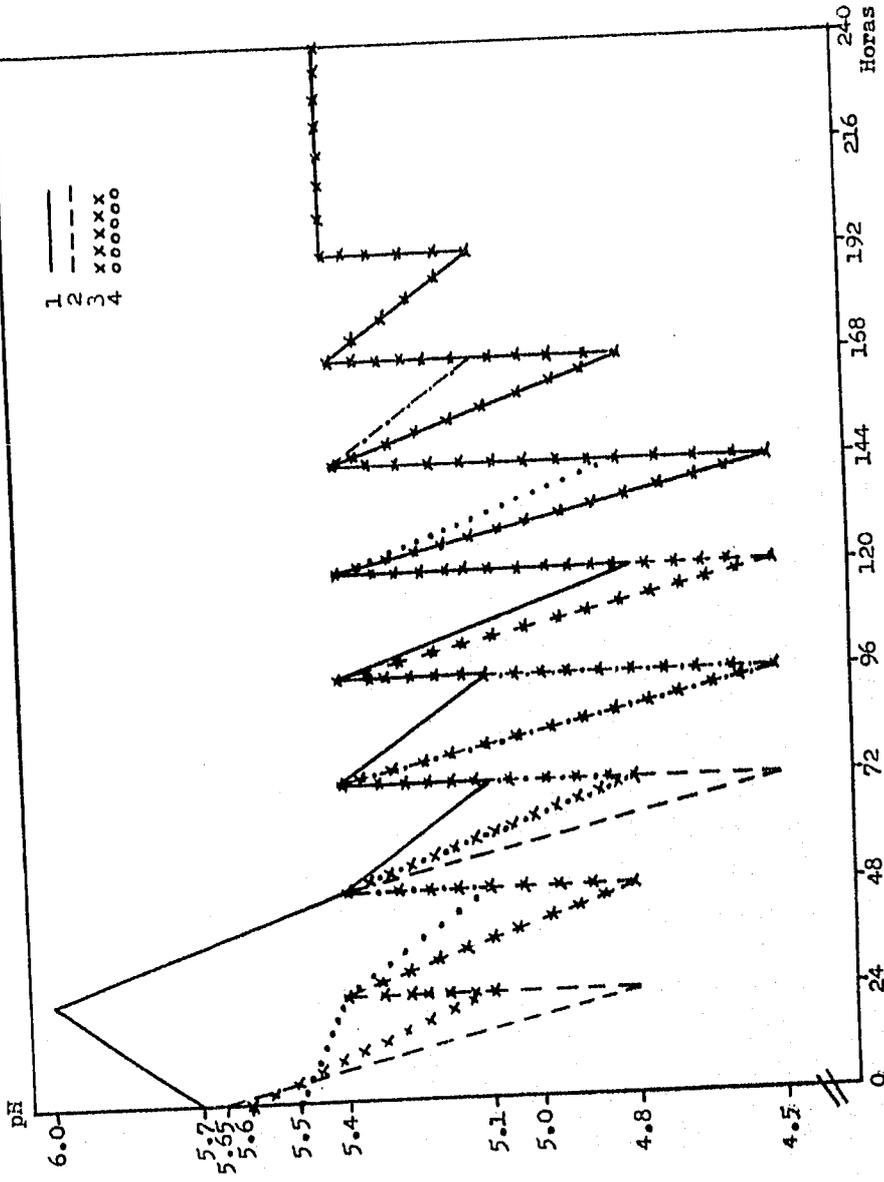


TABLA 8.- Resultados del contenido de carbohidratos durante el proceso de fermentación simultánea (FS) de la papa inoculada con Aspergillus niger y Lactobacillus delbrueckii ATCC- --- 9649.

Tiempo de incubación	Carbohidratos totales (g/100 ml)				
Horas	F E R M E N T A C I O N				
	1	2	3	4	5
0	11.78	10.00	9.36	10.50	9.55
24	8.26	7.47	8.10	7.20	7.80
48	6.40	6.60	6.44	6.23	6.85
72	5.24	5.90	5.70	5.60	5.75
96	4.37	5.20	4.04	5.00	4.70
120	3.90	4.40	3.50	3.75	4.15
144	2.40	2.10	2.20	1.80	2.00
168	1.40	1.00	1.20	1.35	0.90
192	1.15	0.80	0.70	0.96	0.75
216	0.90	0.70	0.55	0.80	0.60
240	0.80	0.70	0.53	0.80	0.60

Los valores reportados son el resultado de experimentos hechos por quintuplicado a pH inicial de 5.6-5.65 .

El método utilizado en las determinaciones fue el de antrona (apéndice 9.3.2).

GRAFICA 4.- Fermentación simultánea: contenido de carbohidratos totales.

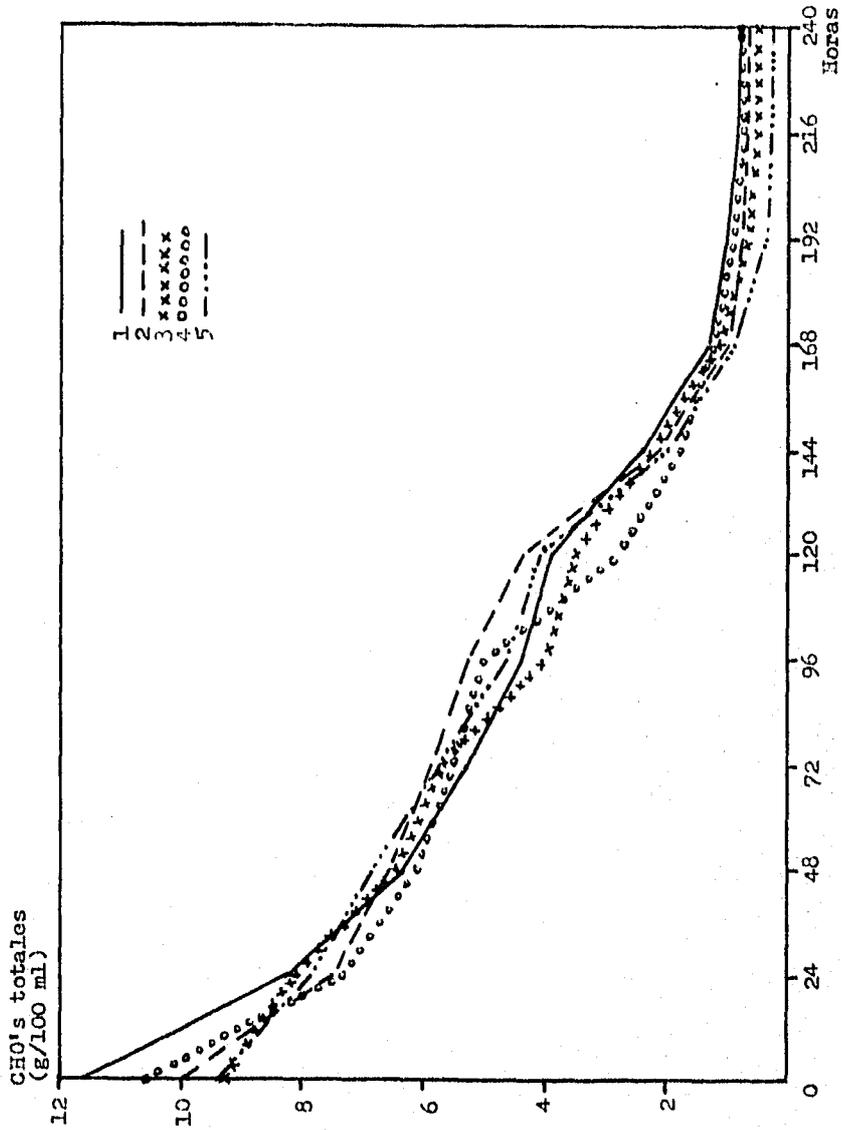


TABLA 9.- Resultados del contenido de ácido láctico durante el proceso de fermentación simultánea (FS) de la papa inoculada con Aspergillus niger y Lactobacillus delbrueckii ATCC- --- 9649.

Tiempo de incubación	Acido láctico (g/100 ml)				
	F E R M E N T A C I O N				
	1	2	3	4	5
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24	2.8	2.0	1.7	2.1	1.9
48	4.0	3.3	3.0	3.4	3.1
72	5.2	4.1	3.8	4.3	3.9
96	6.0	5.4	4.8	5.6	5.0
120	6.9	5.9	5.4	6.1	5.6
144	8.0	6.7	6.1	7.2	6.4
168	8.9	7.9	7.2	8.0	7.3
192	9.0	8.0	7.4	8.2	7.4
216	9.1	8.0	7.4	8.2	7.6
240	9.1	8.0	7.4	8.3	7.6

NOTA: Fermentaciones 1, 2 y 3 se efectuaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de medio MP/FS. Las fermentaciones 4 y 5 se efectuaron en frascos de 800 ml conteniendo 500 ml de medio MP/FS. El ácido láctico se cuantificó por el método de Nanni-Baldini (apéndice 9.3.4).

GRAFICA 5.- Fermentación simultánea: contenido de ácido láctico.

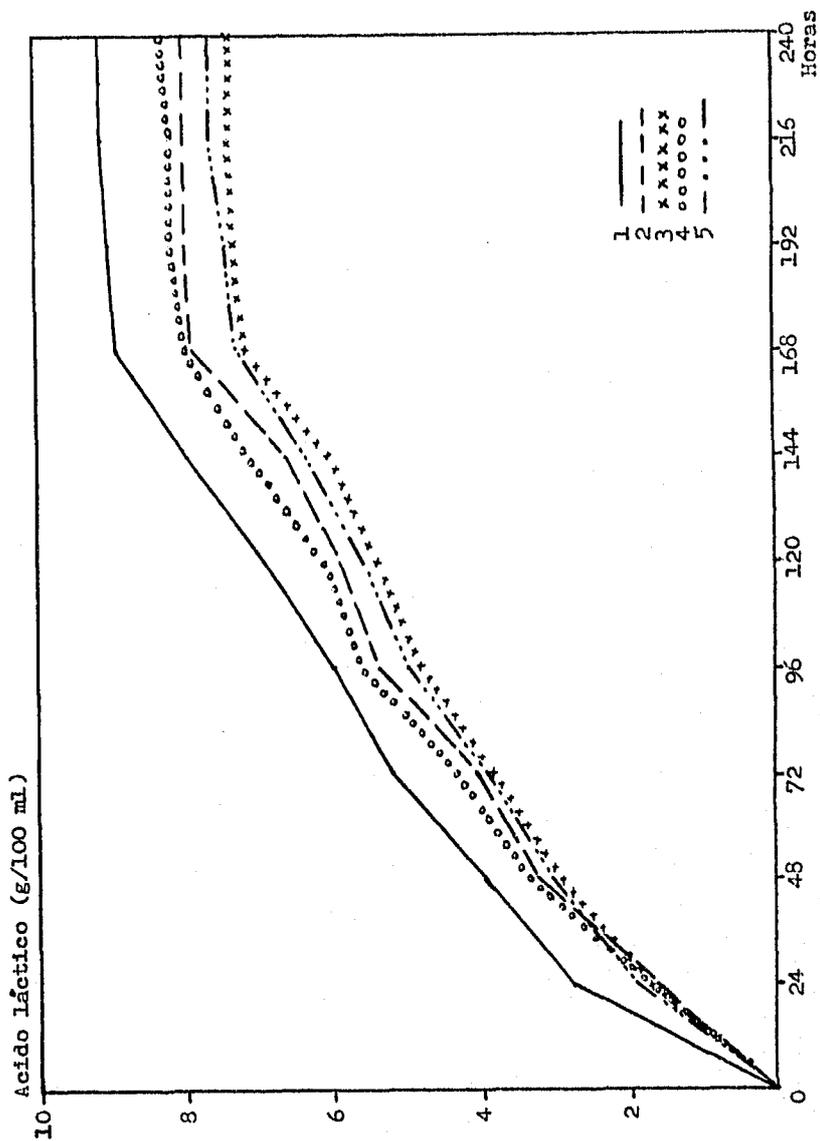


TABLA 10.- Rendimiento de ácido láctico en el proceso de -
fermentación simultánea (FS).

DETERMINACIONES	F E R M E N T A C I O N				
	1	2	3	4	5
Carbohidratos iniciales g/100 ml de MP/FS	11.78	10.00	9.36	10.50	9.55
Glucosa residual g/100 ml de MP/FS	0.06	0.09	0.05	0.08	0.09
Acido láctico g/100 ml de MP/FS	9.1	8.0	7.4	8.3	7.6
Rendimiento %	52.94	54.80	54.18	54.17	54.53

TABLA 11.- Proceso de fermentación simultánea (FS).

Día	Horas	pH	CHO's g/100 ml	Acido láctico g/100 ml	Glucosa residual g/100 ml
0	0	5.65	10.00	0.0	
1	24	4.8	7.47	2.0	
2	48	4.8	6.6	3.3	
3	72	4.5	5.9	4.1	
4	96	4.5	5.2	5.4	
5	120	4.5	4.4	5.9	0.095
6	144	4.5	2.1	6.7	
7	168	5.1	1.0	7.9	
8	192	5.1	0.8	8.0	
9	216	5.4	0.7	8.0	
10	240	5.4	0.7	8.0	

GRAFICA 6.1 Proceso de fermentación simultánea.

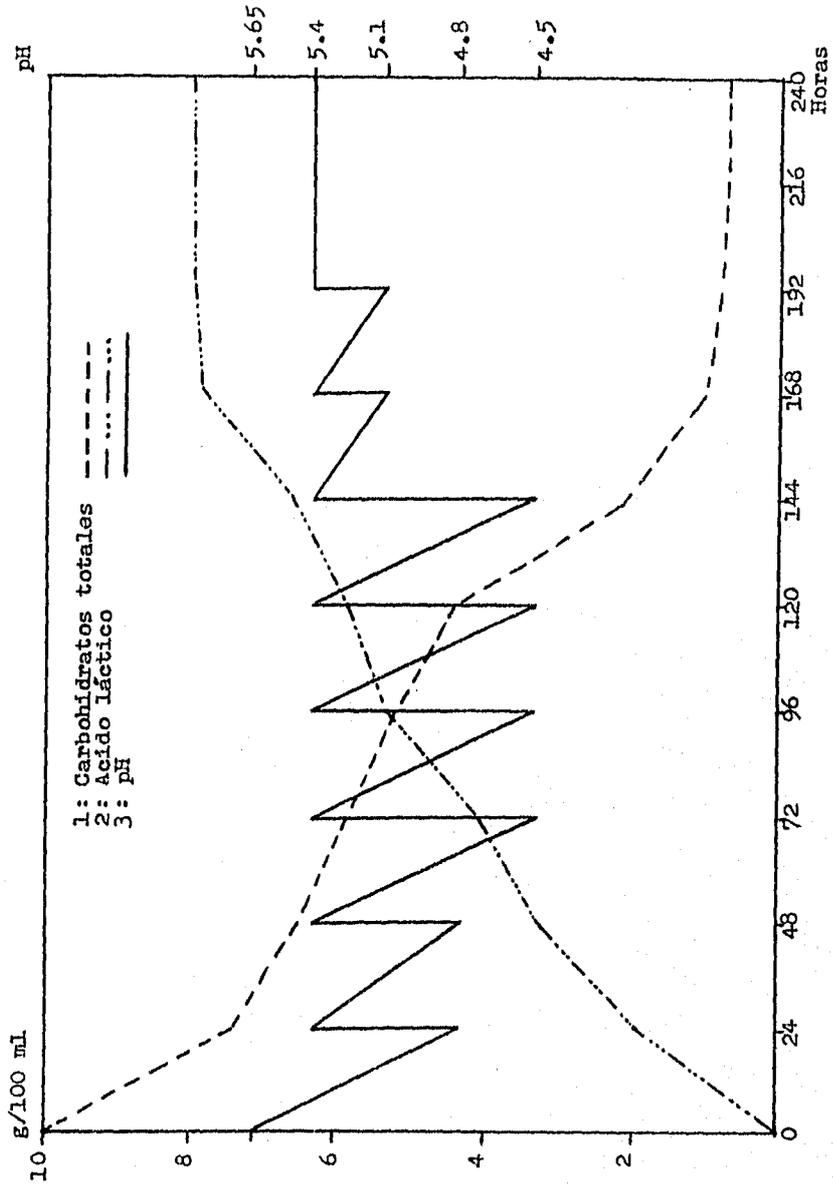


TABLA 12.- Comparación entre los procesos de amilólisis-fermentación Láctica (FA-FL) y fermentación simultánea (FS)

DETERMINACIONES	TIPO DE FERMENTACION	
	FA-FL	FS
CHO's iniciales (g/100 ml)	6.65	10.00
Glucosa inicial (g/100 ml)	1.80	-----
Acido láctico (g/100 ml)	1.42	8.0
Rendimiento de ácido láctico a partir de glucosa inicial	87.80	-----
Rendimiento de ácido láctico a partir de CHO's iniciales	14.65	54.80

PRUEBA	ENSAYOS DEL LACTATO DE CALCIO. ESPECIFICACION USP	RESULTADOS DE LA MUESTRA
1. Apariencia	Polvo blanco, cristalino	Polvo cristalino blanco ligeramente amarillo
2. Solubilidad en agua fría (20%)	Foco soluble	Poco soluble
3. Solubilidad en agua caliente (20%)	Soluble	Soluble
4. Solubilidad en alcohol frío	Foco soluble	Poco soluble
5. Solubilidad en alcohol caliente	Algo soluble	Algo soluble
6. Solución acuosa 20% ligeramente caliente	Solución transparente	Solución transparente
7. Solución acuosa 20% más FF	Solución transparente	Solución transparente
8. Metales pesados:		
Sol. acuosa 20%+Ac. acético dil.	No hay alteración	No hay alteración
Sol. acuosa 20%+Na ₂ S	No hay alteración	No hay alteración
9. Sol. acuosa 20%+H ₂ SO ₄ /Ba(NO ₃) ₂	No hay alteración	No hay alteración
10. Sol. acuosa 20%+ferricianuro de potasio	La solución permanece transparente	La solución permanece transparente
11. Acidez. Titulación sol. acuosa 20%+ FF	Se necesitan 0.5 ml de NaOH 0.1N para enrojecer la solución	Se necesitan 0.5 ml de NaOH 0.1N para enrojecer la solución
12. Sol. acuosa 20%+HNO ₃ +AgNO ₃ (solución)	La solución no se enturbia	La solución no se enturbia
13. Arsénico. 1 g de lactato + 3 ml hipofosfito de sodio 15 min. a baño maría	La solución no se enturbia 100°C	La solución no se enturbia 106-108°C
14. Punto de fusión		

NOTA.- Los resultados reportados son el promedio de 3 determinaciones.

CAPITULO VI.

DISCUSION DE
RESULTADOS.

I.- COMPROBACION DE LA PUREZA DE LAS CEPAS.

1.1.- Aspergillus niger.

1.1.a.- Observación macroscópica.- En la superficie del medio de agar Dextrosa-Sabouraud desarrolla un micelio algodonoso blanco a ligeramente amarillento sobre el cual aparecen puntos negros que corresponden a las conidias.

1.1.b.- Observación microscópica.- Tinción directa con azul de lactofenol: Se observó el micelio septado, los conidióforos terminados en una vesícula cubierta de esterigmas y cadenas de conidias esféricas lisas y algunas ligeramente rugosas de color negro.

Microcultivo: Se observaron las mismas características microscópicas que con la tinción directa.

1.2.- Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649.

1.2.a.- Observación microscópica.- Tinción de Gram: Se observaron bacilos regulares Gram positivos, de extremos redondeados, aislados o en cadenas de 3-4 bacterias.

Tinción con azul de metileno: Los bacilos revelan granulaciones internas de color azul intenso.

II.- SELECCION DE LA METODOLOGIA PARA LA PREPARACION DEL MEDIO DE PAPA Y DETERMINACION DE GLUCOSA.

2.1.- Esterilización del medio de papa.

En la tabla 1 se observa que la cantidad de carbohidratos totales en el medio de papa aumenta cuando éste es sometido a esterilización. Se comprobó que con la esterilización directa-

del sustrato crudo aplicada por mayor tiempo se obtiene una -- concentración de carbohidratos totales similar a la obtenida -- en estudios previos (23,30) en los que la papa se cocía antes de la esterilización, lo que indica que este pretratamiento no es necesario. Se observa que con la esterilización de 30 minutos se obtiene la concentración máxima de carbohidratos, lo -- que indica que es el tiempo óptimo para esterilizar el medio -- de papa, por lo que se utilizó en todas las fermentaciones.

2.2.- Determinación de glucosa.

Al comparar los resultados de la determinación de glucosa -- efectuada por los métodos de orto-toluidina y Nelson-Somogyi -- se tiene que los valores obtenidos por los 2 métodos son muy -- semejantes (ver tabla 2), lo que indica que se puede usar cual -- quiera de ellos, pero se prefiere el de Nelson-Somogyi porque -- representa menos riesgo para el usuario y es de menor costo.

III.- OBTENCION DE ACIDO LACTICO EN UN PROCESO FERMENTATIVO DE 2 FASES.

3.1.- FASE I.- Fermentación amilolítica (FA).

Durante la fermentación amilolítica, las determinaciones de glucosa permitieron:

3.1.a.- Establecer el tiempo de adaptación de Aspergillus niger al medio de papa, el que corresponde al tiempo en que se inicia la hidrólisis del almidón y al inicio de la fase logarítmica del microorganismo. Los resultados de la tabla 3 y gráfica 1 permiten deducir que durante las primeras 24 horas, el --

hongo consume los azúcares presentes en el medio original, lo que se representa como un descenso en la cantidad de glucosa, seguido por el aumento de ésta debido a la actividad de las enzimas amilolíticas de Aspergillus niger, por lo que se seleccionó este tiempo de incubación para la preparación del inóculo.

3.1.b.- Establecer el tiempo de fermentación en el que se obtiene el mayor rendimiento de glucosa y que corresponde a la condición óptima para iniciar la segunda fermentación (FL). -- Los resultados de la tabla 4 y gráfica 2 indican que a las 48 horas de incubación se obtiene la máxima concentración de glucosa y que con periodos de incubación mayores ésta disminuye, lo que probablemente se debe a que ésta es utilizada por el hongo.

3.1.c.- Comprobar que durante las fermentaciones amilolíticas para la preparación del medio base para la fermentación láctica se obtuvieron concentraciones de glucosa similares a las establecidas a las 48 horas de fermentación (ver tabla 5).

3.2.- FASE II.- Fermentación láctica (FL).

En la tabla 6 se observa que los valores más altos de ácido láctico se obtuvieron cuando se emplearon 350 g de papa/litro de medio de cultivo.

En estas fermentaciones se utilizó agua de levadura en lugar del extracto de levadura, ya que la primera es más económica y dió buenos resultados, lo que la hace un importante sustituto del extracto de levadura.

IV.- OBTENCION DE ACIDO LACTICO EN UN PROCESO DE FERMENTACION SIMULTANEA EN EL QUE SE INOCULO A Aspergillus niger Y Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649.

En esta se efectúan simultáneamente la amilólisis con Aspergillus niger y la fermentación láctica con Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649 en un medio de papa que contiene agua de levadura, CaCO_3 y sales.

Tomando en cuenta la temperatura a la cual desarrollan los microorganismos involucrados y actúan las enzimas α -amilasa y glucoamilasa (purificadas) de A. niger, se eligieron condiciones experimentales que se ubicaron dentro de rangos de valores que resultaron apropiados para todos ellos, aunque se favoreció ligeramente a L. delbrueckii ATCC-9649.

Para éste tipo de fermentación se controló el pH para evitar que descendiera demasiado e inhibiera la fermentación.

Según los resultados obtenidos de rendimiento de ácido láctico, el pH óptimo para el inicio de la fermentación simultánea se ubicó entre 5.6-5.65 .

En cuanto a la relación entre pH, consumo de carbohidratos y producción de ácido láctico, ésta es directa, ya que, mientras se produjo ácido láctico a partir de la glucosa que se liberaba en el medio, el pH descendía. Una vez que el pH se mantenía sin variación indicaba el final del proceso de fermentación, situación que se alcanzó a las 192 horas de incubación (ver tablas 7 a 11 y gráficas 3 a 6).

Los resultados de la tabla 12 indican que el proceso de fermentación simultánea demostró ser más eficiente que el proceso fermentativo de 2 fases, ya que se lleva a cabo una utilización más completa del sustrato en un menor tiempo de fermentación, se efectúan menos manipulaciones y el rendimiento de ácido láctico a partir de carbohidratos iniciales del medio es mucho mayor que en el proceso de 2 fases.

V.- EXTRACCION DEL ACIDO LACTICO COMO LACTATO DE CALCIO.

Respecto a la extracción del ácido láctico como lactato de calcio, se observó que la cristalización del lactato se ve favorecida al adicionar etanol.

En la tabla 13 se observa que las pruebas practicadas al lactato de calcio obtenido estuvieron acordes a las especificaciones de la bibliografía, aunque en cuanto al punto de fusión de la sal, éste estuvo ligeramente elevado, lo que se atribuye a una purificación incompleta.

CAPITULO VII.

CONCLUSIONES
Y
RECOMENDACIONES .

C O N C L U S I O N E S .

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

1.- Es factible omitir la cocción de la papa antes de la esterilización.

2.- En el proceso de fermentación simultánea, el aprovechamiento del sustrato es total.

3.- En éste proceso se obtiene un rendimiento mayor de ácido láctico.

Las condiciones para efectuar la fermentación simultánea son:

- Inóculo de Aspergillus niger: 10% v/v.
 - Inóculo de Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649: 5% v/v.
 - Agua de levadura al 20%: 15 ml/100 ml de MP/FS.
 - CaCO_3 : 2%.
 - Condiciones microaerofílicas.
 - Agitación: 50 rpm.
 - Carbohidratos iniciales: los contenidos en la papa (7 a 12 g/100 ml).
 - Glucosa residual: 0.05-0.09 g/100 ml.
 - Temperatura: 38-40°C.
 - pH inicial: 5.6-5.65
 - pH proceso: 4.5
- La extracción del lactato de calcio es adecuada y sencilla.

RECOMENDACIONES .

1.- Para la fermentación simultánea se recomienda un control continuo de pH con el fin de obtener la máxima producción de ácido láctico.

2.- Variar las condiciones de temperatura desde 40° hasta 45°C para optimizar la temperatura a la que se debe de realizar el proceso.

3.- Optimizar el método de extracción de la sal de calcio del ácido láctico.

4.- Se recomienda escalar el proceso a volúmenes mayores y hacer pruebas en cultivo continuo.

CAPIULO VIII.

R E S U M E N .

El presente trabajo se divide en 2 partes:

PARTE I.- En ésta, el proceso de obtención de ácido láctico se llevó a cabo en 2 fases:

Fase 1.- Partiendo de papa sin cocimiento previo, se preparó un medio de cultivo al que se le determinó el tiempo óptimo de esterilización en autoclave, después de lo cual el almidón de la papa se hidrolizó mediante la acción enzimática de Aspergillus niger, para obtener glucosa.

Fase 2.- El hidrolizado estéril se suplementó con agua de levadura en lugar del extracto de levadura, se le adicionó CaCO_3 y se inoculó con Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649 para efectuar la fermentación de la glucosa hasta ácido láctico, el cual fue cuantificado según el método propuesto por Nanni-Baldini y separado del mosto como lactato de calcio.

El rendimiento de ácido láctico a partir de la glucosa obtenida en la fase 1 fue de 88.30%, y calculado a partir de carbohidratos iniciales fue de 14.65%.

PARTE II.- Esta se realizó por un proceso en una sola etapa, conocido como fermentación simultánea. Para esto, el medio de papa con sales se enriquece con agua de levadura y se adiciona CaCO_3 y se fermenta simultáneamente con inóculos de Aspergillus niger y Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649. Durante la fermentación se evalúan, cada 24 horas, el consumo de carbohidratos, la presencia de ácido láctico y se controla el pH, que demostró ser la variable crítica para la producción de

ácido láctico.

El ácido láctico obtenido al final de éste proceso tuvo un rendimiento de 54.80% calculado a partir de carbohidratos iniciales.

CAPITULO IX.

A P E N D I C E .

9.1. SOLUCIONES Y SUSPENSIONES.

9.1.1. Solución "A" de sales minerales (17,23,30).

MgSO₄·7H₂O _____ 10 g.
FeSO₄·7H₂O _____ 0.5 g.
MnSO₄·4H₂O _____ 0.5 g.
Agua dest. _____ 50 ml.

9.1.2. Solución "B" de sales minerales (17,23,30).

CH₃COONa _____ 12.5 g.
Tween 80 _____ 0.6 g.
Agua dest. _____ 50 ml

Preparar las soluciones por separado y guardarlas en frascos ámbar.

9.1.3. Agua de levadura al 20% (48).

Levadura comprimida _____ 200 g.
Agua destilada cbp _____ 1,000 ml
pH 6.8 ± 0.2

Esterilizar en autoclave durante 60 minutos a 121°C. Dejar sedimentar.

9.2. MEDIOS DE CULTIVO.

9.2.1. Medios para Aspergillus niger.

9.2.1.1. Agar Dextrosa-Sabouraud (4).

Para preparar 1,000 ml:

Peptona _____ 10 g.

Glucosa _____ 40 g.

Agar _____ 15 g.

Agua dest. ____ 1,000 ml

pH 5.6 ± 0.2

Disolver los ingredientes en el agua y calentar agitando --
frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar en auto-
clave durante 15 minutos a 118°C.

9.2.2. Medios para Lactobacillus delbrueckii ATCC-9649.

9.2.2.1. Caldo AOAC (4).

Para preparar 1,000 ml:

Leche peptonizada ____ 15 g.

Extracto de levadura_ 5 g.

Dextrosa _____ 10 g.

Jugo de jitomate ____ 5 g.

KH₂PO₄ _____ 2 g.

Tween 80 _____ 1 g.

Agua destilada _____ 1,000 ml

pH 6.8 ± 0.2

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

NOTA: En el caldo AOAC las resiembras de L. delbrueckii ---
ATCC-9649 se hacen mensualmente, incubando 24-48 horas a 40 --
42°C.

9.2.2.2. Caldo MRS (3).

Para preparar 1,000 ml:

Leche peptonizada _____	10 g.
Extracto de carne _____	10 g.
Extracto de levadura _____	5 g.
Glucosa _____	20 g.
K ₂ HPO ₄ _____	5 g.
Citrato diamónico _____	2 g.
CH ₃ COONa _____	5 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O _____	0.5 g.
MnSO ₄ ·4H ₂ O _____	0.2 g.
Tween 80 _____	1 g.
Agua destilada _____	1,000 ml

pH 6.2 - 6.4

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

NOTA: Las resiembras de L. delbrueckii ATCC-9649 se hacen -
mensualmente en éste medio.

9.2.2.3. Medio #3 (MPLac) (23,30).

Para preparar 100 ml:

Extracto de levadura _____ 2 g.
Glucosa _____ 2 g.
Sol."A" sales miner. _____ 0.88 ml.
Sol."B" sales miner. _____ 0.74 ml.
Agua destilada _____ 100 ml

pH 5.5-6.0

Disolver los ingredientes en agua y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

9.2.3. Medios de fermentación.

9.2.3.1. Preparación de la suspensión de papa (25,40,44).

Para preparar 1,000 ml:

Papa _____ 350 g.
Agua dest. cbp _____ 1,000 ml.

Se pesa la papa cruda y sin pelar, se corta en trozos pequeños y se licúa durante 1-2 minutos.

MEDIO PARA LA FERMENTACION AMILOLITICA.-

9.2.3.2. Medio de papa con sales (MPc/S) (23,28,30).

Para preparar 1,000 ml:

Suspensión de papa	_____	1,000 ml
NaNO ₃	_____	3.64 g.
KH ₂ PO ₄	_____	1.09 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	_____	1.025 g.
KCl	_____	0.057 g.
FeSO ₄ ·7H ₂ O	_____	0.027 g.
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	_____	0.0024 g.
CuSO ₄ ·5H ₂ O	_____	0.0021 g.
MnCl ₂ ·4H ₂ O	_____	0.0019 g.

pH 5.0-6.0

Esterilizar en autoclave durante 30 minutos a 118°C.

MEDIO PARA LA FERMENTACION LACTICA.-

9.2.3.3. Medio hidrolizado de papa con nutrientes, modificado (MHPC/Nmod).

Para preparar 100 ml:

Hidrolizado de papa con sólidos	_____	100 ml
Agua de levadura al 20%	_____	15 ml
CaCO ₃	_____	2 g.
Solución "A" de sales minerales	_____	0.88 ml
Solución "B" de sales minerales	_____	0.74 ml

pH 6.0 ± 0.2

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 118°C.

MEDIO PARA LA FERMENTACION SIMULTANEA.-

9.2.3.4. Medio de papa para la fermentación simultánea -
(MP/FS).

Para preparar 1,000 ml:

Suspensión de papa _____	1,000 ml
NaNO ₃ _____	3.64 g.
KH ₂ PO ₄ _____	1.09 g.
MgSO ₄ •7H ₂ O _____	1.025 g.
KCl _____	0.062 g.
FeSO ₄ •7H ₂ O _____	0.027 g.
ZnSO ₄ •7H ₂ O _____	0.0024 g.
CuSO ₄ •5H ₂ O _____	0.0021 g.
MnCl ₂ •4H ₂ O _____	0.0019 g.
Agua de levadura al 20% _____	150 ml
CaCO ₃ _____	20 g.
Solución "A" sales minerales _____	8.8 ml
Solución "B" sales minerales _____	7.4 ml

pH 5.6 - 5.65

Esterilizar en autoclave durante 30 minutos a 118°C.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

9.3. MÉTODOS.

9.3.1. CUENTA DE ESPORAS DE Aspergillus niger (27,30).

Método: Cuenta en 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.- Con una muestra homogénea se llena la pipeta de Thoma - hasta la marca de 0.5
- 2.- Limpiar la parte externa de la pipeta con una gasa.
- 3.- Diluir con solución de Tween 80 al 0.2%.
- 4.- Agitar durante 3 minutos para mezclar.
- 5.- Colocar el cubrehematímetro sobre la cámara de Neubauer.
- 6.- Descartar las primeras 4-5 gotas de la pipeta y llenar la cámara.
- 7.- Dejar que el líquido penetre lentamente entre la cuadrícula y el cubrehematímetro hasta que la plataforma de recuento esté cubierta.
- 8.- Dejar reposar 3 a 5 minutos sobre la platina del microscopio.
- 9.- Con el objetivo de 40x se cuentan las esporas contenidas

en toda la cuadrícula. El resultado se multiplica por un factor de 10,000.

Cálculos:

$N \times 10,000 =$ número de esporas/ml.

$N =$ Número de esporas contadas.

$10,000 =$ Factor de multiplicación.

9.3.2. DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS TOTALES (13,22,23, 28,30,31).

Método: Antrona.

Fundamento:

Los carbohidratos dan un color verde característico cuando se calientan con antrona en presencia de H_2SO_4 . El color se debe a la condensación de la antrona con los derivados del furfural. El tautómero enólico de la antrona, el 9-antronol, es el que reacciona:



El reactivo de antrona produce una reacción débil con pentosas y heptosas, pero se observa una fuerte reacción de color con las hexosas.

Reactivos:

1.- Solución patrón de glucosa:

Solución de ácido benzoico al 0.15% que contiene 1 mg glucosa/ml. Es estable por largos periodos de tiempo si se mantiene a $0^{\circ}C$.

2.- Solución diluida de H_2SO_4 (75% v/v):

Se añaden 750 ml de H_2SO_4 concentrado a 250 ml de agua destilada.

3.- Reactivo de antrona:

Se pipetea 5 ml de etanol en un matraz, se agregan 200 mg-

de antrona y se completa el volumen a 100 ml con la solución -
diluida de H_2SO_4 . Se agita hasta disolver. El reactivo se pre-
para diario; el etanol sirve para estabilizar el color.

Procedimiento:

REACTIVOS	BLANCO	PATRON	PROBLEMA
Agua destilada	1 ml	---	---
Sol. patrón de glucosa 1:20	---	1 ml	---
Suspensión de papa 1:1,000	---	---	1 ml
B A Ñ O D E H I E L O			
Reactivo de antrona (agregando lentamente y agitando)	5 ml	5 ml	5 ml
BAÑO DE AGUA EN EBULLICION DURANTE 10 MINUTOS			
ENFRIAR EN BAÑO DE HIELO			
LEER EN ESPECTROFOTOMETRO A 625 nm.			

Cálculos:

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

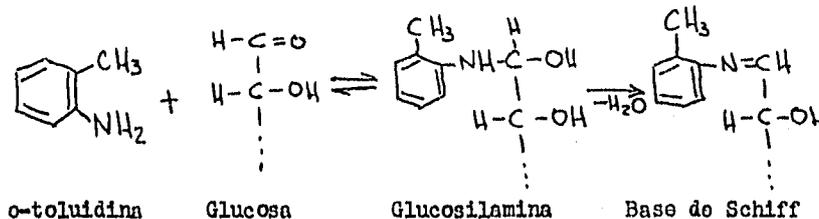
9.3.3. METODOS DE CUANTIFICACION DE GLUCOSA.

9.3.3.1. Cuantificación de glucosa.

Método: Orto-toluidina (23,30,41,43).

Fundamento:

Varias aminas aromáticas reaccionan con glucosa en solución de CH_3COOH caliente y producen derivados coloreados. La orto-toluidina se condensa con el grupo aldehído de la glucosa y forma una mezcla en equilibrio de una glucosilamina y la correspondiente base de Schiff. El producto final, de color verde, tiene un máximo de absorción a 625 nm.



Reactivos:

1.- Acido tricloroacético (TCA) al 3% (p/v): Es la sustancia desproteinizante.

2.- Solución patrón de glucosa 1 mg/ml.

3.- Reactivo de orto-toluidina:

Emplear las siguientes sustancias:

a) 0.5 g. de tiourea. Funciona como conservador.

b) 9 ml de orto-toluidina. Es la formadora del color.

c) 100 ml de ácido acético glacial. Desproteinizador y estabilizador del complejo colorido.

Preparación del reactivo:

Disolver la tiourea en un poco de ácido; calentando muy ligeramente, adicionar la orto-toluidina y mezclar con cuidado, posteriormente se adiciona ácido acético glacial hasta la marca del matraz aforado. Guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente. Deberá evitarse el contacto de la solución con la piel. El reactivo es estable por 2 meses.

Procedimiento:

Técnica con desproteínización:

REACTIVOS	BLANCO	PATRON	PROBLEMA
TCA	1 ml	1 ml	1 ml
Agua destilada	0.1 ml	---	---
Sol.patrn de glucosa	---	0.1 ml	---
Problema 1:20	---	---	0.1 ml
MEZCLAR Y CENTRIFUGAR DURANTE 3 MINUTOS A 3,000 rpm.			
Sobrenadante	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Reactivo de o-toluidina	2 ml	2 ml	2 ml
MEZCLAR Y PONER EN BAÑO DE AGUA A EBU LLIION DURANTE 10 MINUTOS.			
PASAR A UN BAÑO DE AGUA FRIA.			
LEER EN ESPECTROFOTOMETRO A 625 nm.			

Cálculos:

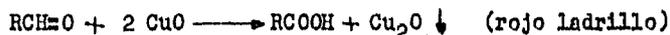
$\frac{D.O. Problema}{D.O. Patrón} \times \text{conc. patrón} = \text{mg glucosa/100 ml de muestra.}$

9.3.3.2. Cuantificación de glucosa.

Método: Nelson-Somogyi (reducción de cobre) --
(41,43).

Fundamento:

En solución alcalina caliente, la glucosa reduce fácilmente el ión cúprico a ión cuproso con formación, principalmente, de óxido cuproso:



El siguiente paso es agregar ácido fosfomolibdico o arsenomolibdico, el cual es reducido por el ión cuproso con formación de óxidos inferiores de molibdeno, los cuales producen un color azul adecuado para mediciones fotométricas.

En el método de Nelson-Somogyi, se precipitan las proteínas por adición de $Ba(OH)_2$ y $ZnSO_4$. Las proteínas se separan como proteínatos de zinc, los compuestos de sulfhidrilo como sales de zinc y los iones remanentes de zinc y bario de la siguiente forma:



Reactivos:

1.- Reactivo alcalino de cobre: Deberá prepararse en el momento de hacerse la determinación, por mezcla de las soluciones A y B.

Solución A:

Na_2CO_3 anhidro _____ 50 g.
Tartrato de Na y K _____ 50 g.
 NaHCO_3 _____ 40 g.
 Na_2SO_4 anhidro _____ 400 g.
Agua destilada cbp _____ 2,000 ml.

Disolver las sales en el orden indicado en aproximadamente-
1 litro de agua y aforar al volumen final. Se filtra si es ne-
cesario y se guarda en frasco ámbar entre 15-20°C.

Solución B:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ _____ 150 g.
Agua dest. cbp _____ 1,000 ml.
 H_2SO_4 conc. _____ 0.5 ml.

Disolver en el orden indicado en un poco de agua y aforar -
al volumen final. Adicionar el H_2SO_4 . Guardar en frasco ámbar-
a temperatura ambiente.

Solución reactivo de trabajo:

Solución "A" _____ 96 ml.
Solución "B" _____ 4 ml.

Se mezcla por inversión en el momento de la prueba.

2.- Reactivo arsenomolibdico:

Molibdato de amonio _____ 100 g.
Agua destilada _____ 1,800 ml.
 H_2SO_4 concentrado _____ 84 ml.
o-arseniato de sodio _____ 12 g.
Agua destilada cbp _____ 2,000 ml.

Disolver el molibdato en un poco de agua y agregar el H_2SO_4 .
Por separado, disolver el o-arseniato en otra parte de agua. -
Mezclar por agitación cuidadosa. Dejar en reposo durante 48 ho-
ras a $37^{\circ}C$. Guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

3.- Hidróxido de bario 0.3N:

$Ba(OH)_2$ _____ 50 g.

Agua destilada cbp ___ 1,000 ml.

Disolver el $Ba(OH)_2$ en el volumen indicado, dejar reposar -
24 horas y posteriormente filtrar.

4.- Sulfato de zinc al 5%:

$ZnSO_4$ _____ 50 g.

Agua destilada cbp_ 1,000 ml.

Disolver y guardar en frasco ámbar. Un volumen de $Ba(OH)_2$ -
debe neutralizar a un volumen de $ZnSO_4$.

5.- Solución patrón de glucosa 2 mg/ml.

- Filtrado libre de proteínas:

Muestra problema _____ 0.5 ml.

Agua destilada _____ 7.5 ml.

$Ba(OH)_2$ 0.3 N _____ 1 ml.

$ZnSO_4$ 5% _____ 1 ml.

Centrifugar durante 2-3 minutos a 3,000 rpm.

Procedimiento:

REACTIVOS	BLANCO	PATRON	PROBLEMA
Agua destilada	1 ml	---	---
Sol.patrn de glucosa 120	---	1 ml	---
Filtrado libre de proteínas	---	---	1 ml
Reactivo alcalino de cobre	1 ml	1 ml	1 ml
MEZCLAR Y CALENTAR EN BAÑO DE AGUA EN EBULLICION DURANTE 20 MINUTOS.			
ENFRIAR EN BAÑO DE HIELO			
Reactivo arsenomolibdico	1 ml	1 ml	1 ml
AGITAR HASTA DESALOJAR EL GAS.			
Agua destilada	22 ml	22 ml	22 ml
LEER EN ESPECTROFOTOMETRO A 520 nm.			

Cálculos:

$D.O. problema \times 200 = mg \text{ glucosa}/100 \text{ ml de muestra.}$
 $D.O.patrn$

9.3.4. CUANTIFICACION DE ACIDO LACTICO.

Método: Colorimétrico según Nanni-Baldini (23,29, 30).

Fundamento:

La muestra desproteinizada se trata con CuSO_4 al 20% y ----- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para remover el piruvato interferente. La posterior adición de CuSO_4 al 15% junto con H_2SO_4 concentrado bajo la influencia de calor, convierte el ácido láctico a acetaldehído que reacciona con el para-hidroxidifenilo para producir un cromóforo violeta que tiene una absorción máxima a 568 nm.

Reactivos:

1.- Solución patrón de ácido láctico:

Se disuelven 0.2133 g de lactato de litio seco en 100 ml de agua destilada y se agrega 1 ml de H_2SO_4 concentrado. El volumen final se lleva a 1 litro usando agua destilada, quedando una -- concentración final de 20 mg/100 ml.

2.- Solución de para-hidroxidifenilo:

Se disuelven 150 mg de p-hidroxidifenilo en 10 ml de alcohol etílico absoluto.

3.- Solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 20% (p/v).

4.- Solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 15% (p/v).

5.- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ QP.

6.- H_2SO_4 concentrado.

Desproteinización de la muestra:

Se puede emplear cualquiera de los métodos comunes en los -- que se utiliza TCA, ácido tungstico o $\text{Zn}(\text{OH})_2$.

Procedimiento:

REACTIVOS	BLANCO	PATRON	PROBLEMA
Sol. libre de proteínas	----	----	1 ml.
Sol. patrón de ácido láctico	----	1 ml.	----
Agua destilada	1 ml.	----	----
CuSO ₄ 20%	1 ml.	1 ml.	1 ml.
Agua destilada	8 ml.	8 ml.	8 ml.
Ca(OH) ₂ (s)	1 g.	1 g.	1 g.
	AGITAR POR PERIODOS DE 30 SEGUNDOS A INTERVALOS DE 5 MINUTOS DURANTE 30 MINUTOS.		
	CENTRIFUGAR DURANTE 2-3 MINUTOS A 3,000 rpm.		
Sobrenadante	1 ml.	1 ml.	1 ml.
	B A Ñ O D E H I E L O		
CuSO ₄ 15%	0.05 ml.	0.05 ml.	0.05 ml.
H ₂ SO ₄ conc.	6 ml.	6 ml.	6 ml.
	AGITAR VIGOROSAMENTE.		
	BAÑO DE AGUA A 60±1°C DURANTE 30 MINUTOS.		
	ENFRIAR A 8-10°C.		
p-OH-difenilo	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.
	AGITAR VIGOROSAMENTE.		
	BAÑO DE AGUA A 29±1°C DURANTE 30 MINUTOS		
	BAÑO DE AGUA A EBULLICION POR 90 SEGUNDOS		
	ENFRIAR EN HIELO.		
	LEER EN ESPECTROFOTOMETRO A 568 nm.		

Cálculos:

$$\frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. patrón}} \times 400 = \text{mg ácido láctico/100 ml de muestra.}$$

9.3.5. CROMATOGRAFIA DEL ACIDO LACTICO.

Método: Cromatografía en capa fina (15,23,29,30,-
35,39).

Fundamento:

Los ácidos orgánicos solubles en agua se separan e identifican mediante la cromatografía en capa fina. El ácido láctico se separa de una mezcla utilizando como eluyente éter dietílico-ácido fórmico en relación 7:1 y la detección se realiza con indicadores ácido-base o con molibdato de amonio.

Material:

- Placas: placas Merck para cromatografía en capa fina, de 20x20 cm. Se activan durante 1 hora a 120°C.

- Eluyente:

Formulación: éter dietílico-ácido fórmico en relación 7:1.

Preparación: En un embudo de separación se mezclan éter dietílico saturado con agua y ácido fórmico al 88%, en proporción de 7:1 por volumen. Se agregan pequeñas cantidades de agua destilada con agitación hasta que se sature. La capa acuosa inferior se desecha.

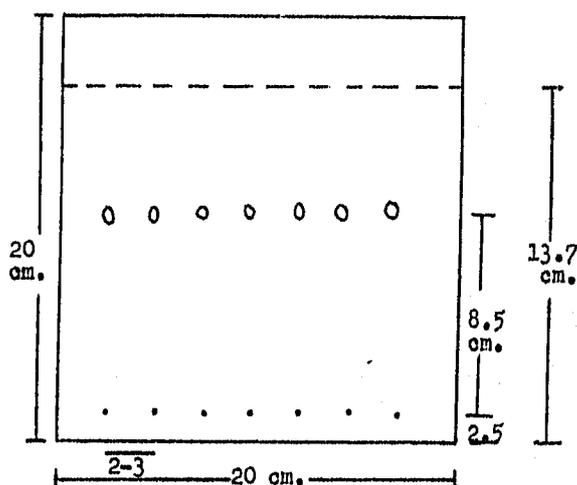
- Indicador: En etanol al 96% se disuelven azul de bromofenol (0.3%) y rojo de metilo (0.1%).

Procedimiento:

Eluyente: Con éste se llena 1 cm de profundidad en la cámara de cromatografía, la que se tapa con una placa de vidrio y se sella con vaselina. La cámara se deja saturar durante 24 horas.

Muestras: A 2.5 cm del extremo inferior de la placa, mediante un capilar, se coloca una muestra de ácido láctico diluido con etanol (aproximadamente 30 μ g de ácido láctico). Si se ponen varias muestras en la placa, éstas se colocarán a una distancia de 2-3 cm entre sí (figura 3):

FIGURA 3.- Cromatografía del ácido láctico:



Después del desarrollo del cromatograma, y para prevenir la disminución de cetodcidos, las placas se secan al aire durante 4 horas hasta la evaporación del ácido fórmico y el éter.

Revelado:

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

Rf:

El ácido láctico tiene un Rf de 0.6

CAPITULO X.

BIBLIOGRAFIA .

1. Alexopoulos, C.J. (1979).
"Introductory Mycology". 3rd edition. John Wiley & Sons. ---
USA.
2. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". (1975).
8th edition. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
3. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". (1986).
Vol.2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
4. "Bioxon. Manual de peptonas e ingredientes para medios de -
cultivo". (1980). México.
5. Casida Jr., L.E. (1968).
"Industrial Microbiology". John Wiley & Sons, Inc., USA.
6. Cordon, T.C. (1950).
"Lactic acid from potatoes". Ind. & Eng. Chem. 42(9):1833-1836
7. Davis, J.G. (1960).
"The Lactobacilli" in "Progress in Industrial Microbiology"
Vol.2. Edited by D.J.D.Hockenfull. Interscience Publishers,
Inc., Great Britain.
8. Dietz, A. (1982).
"Culture preservation & instability" in "Bioactive Microbial
Products: Search & discovery". Edited by J.D.Bu'lock; L.J.-
Nisbet; D.J.Winstanley. Published for the Society for Gene-
ral Microbiology by Academic Press, Great Britain.
9. Echegaray, A. (1951).
"Fermentación de las mieles incristalizables por un lactoba-
cilo del pulque". Tesis de Licenciatura, IPN, México.
10. Filachione, E.W. (1946).
"Purification of lactic acid, production of methyl lactate-
from aqueous solution of crude acid". Ind. & Eng. Chem. ----
38(2):228-232.
11. Garrett, J.F. (1930).
"Lactic acid". Ind. & Eng. Chem. 22:1153-1154.
12. Giral, F. (1946).
"Productos químicos y farmacéuticos". Vol.1. Ed. Atlante, Mé-
xico.
13. Glick, D. (1955).
"Methods of Biochemical Analysis". Vol.2. Interscience Pu-
blishers Inc., USA.

14. Godfrey, T.; Reichelt, J. (1983).
"Industrial Enzymology. The application of enzymes in Industry". The Nature Press, Hong Kong.
15. Holten, C.H.; Müller, A.; Reh binder, D. (1971).
"Lactic acid. Properties & Chemistry of lactic acid & derivatives". Verlag Chemie, Germany.
16. Inskoop, G. (1952).
"Lactic acid from corn sugar". Ind. & Eng. Chem. 44(9):1955--1966.
17. Kompe, L.; Halvorson, H.; Piret, E. (1950).
"Effect of continuously controlled pH on lactic acid fermentation. Yield & conversion". Ind. & Eng. Chem. 42(9):1852-1861.
18. Kirk, R.; Othmer, D. (1952).
"Encyclopedia of Chemical Technology". Vol. 8. The Interscience Encyclopedia, Inc., USA.
19. Lee, G.M.; Kim, C.H.; Lee, K.J.; Abidin Mohd Yusof, Z.; Han, M.; Rhee, S.K. (1986).
"Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of sago starch using immobilized *Zymomonas mobilis*". J. Ferm. - Tech. 64(4):293-297.
20. Lee, J.H.; Pagan, R.J.; Rogers, P.L. (1983).
"Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *Zymomonas mobilis*". Biotech. & Bioeng. 25(3):659-669.
21. Lennette, E.; Spaulding, E.; Truant, J. (1981).
"Manual de Microbiología Clínica". Salvat Editores, España.
22. Loewus, F.A. (1952).
"Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates". Analytical Chem. 24:219.
23. Maldonado, A.; Garduño, L. (1984).
"Biosíntesis microbiana del ácido láctico a partir de papa"
Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
24. Matsumura, M.; Hirata, J. (1989).
"Continuous simultaneous saccharification and fermentation of raw starch in a membrane reactor". J. Chem. Tech. & Biotech. 46:313-326.
25. Matsuoka, H.; Koba, Y.; Ueda, S. (1982).
"Alcoholic fermentation of sweet potato without cooking". J. Ferment. Tech. 60(6):599-602.

26. The Merck Index. (1983).
10th edition, USA.
27. Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (1971).
"Methods in Microbiology". Vol.4. Academic Press, Great Britain.
28. Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (1970).
"Methods in Microbiology". Vol.5-B. Academic Press, Great Britain.
29. Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (1970).
"Methods in Microbiology". Vol.6-A. Academic Press, Great Britain.
30. Pérez, S.; Ramírez, J.G. (1988).
"Producción de ácido láctico a partir de un hidrolizado enzimático de papa". Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
31. Pigman, W. (1977).
"The Carbohydrates. Chemistry, Biochemistry and Physiology" Academic Press, Inc., USA.
32. Práve, P.; Faust, U.; Sittig, W.; Sukatsch, D.A. (1987).
"Fundamentals of Biotechnology". Verlagsgesellschaft Weinheim, Federal Republic of Germany.
33. Prescott, S.C.; Gordon, C. (1959).
"Industrial Microbiology". 3rd edition. International Student Edition. McGraw Hill Co., Inc., Kogakusha Co., LTD, Japan.
34. Producción, Anuario FAO de. (1989).
FAO, ONU, Vol.42, 1988. Roma, Italia.
35. Randerath, K. (1965).
"Thin-layer Chromatography". Verlag Chemie, Germany.
36. Saha, B.C.; Ueda, S. (1983).
"Alcoholic fermentation of raw sweet potato by a nonconventional method using Endomyces fibuliger glucoamilase -- preparation". Biotech. & Bioeng. 25(4):1181-1186.
37. Schmidell, W. (1983).
"Produção de amiloglucosidade por Aspergillus" en "Biotecnología de Enzimas" editado por C. Huitrón. Depto. de Biotecnología del IIBM, UNAM, México.
38. Smith, L.T. (1939-II).
"The production of pure lactic acid". Ind. & Eng. Chem. 17:641

39. Stahl, E. (1969).
"Thin-layer Chromatography. A Laboratory handbook". Verlag-Chemie. Printed in Singapore.
40. Svendsby, G.; Kakutani, K.; Matsumura, Y.; Iizuka, M.; Yamamoto, T. (1981).
"Ethanol fermentation of uncooked sweet potato with the application of enzymes". J.Ferment.Tech. 59(6):485-487.
41. Tietz, N. (1972).
"Química Clínica Moderna". Nueva Editorial Interamericana, México.
42. Tittsler, R.P.; Pederson, C.S.; Snell, E.E.; Hondlin, D.; Niven, C.F. Jr. (1952).
"Symposium on the Lactic acid Bacteria". Bact.Rev. 16(4): 227-260.
43. Toro, G.; Ackermann, P. (1975).
"Practical Clinical Chemistry". 1st edition. Little, Brown, Co., USA.
44. Ueda, S.; Koba, Y. (1980).
"Alcoholic fermentation of raw starch without cooking by using black-koji amylase". J.Ferment.Tech. 58(3):237-242.
45. Ueda, S.; Zenin, C.; Monteiro, D.A.; Park, Y.K. (1981).
"Production of ethanol from raw cassava starch by a nonconventional fermentation method". Biotech.& Bioeng. 23(2): 291-299.
46. USP.
United States Pharmacopeia. XV revisión, USA.
47. Velasco, O.; Tay, J. (1978).
"Nociones de Micología". Francisco Méndez C., editor, México
48. Vincent, J.M. (1970).
"A Manual for the practical study of the root-nodule Bacteria". International Biological Programme. Blackwell Scientific Publications. Oxford & Edinburgh. 1st edition. Great Britain.