

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

Casa abierta al tiempo

IZTAPALAPA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

D.C.B.S.

128424

ORIENTACION DE LAS FERMENTACIONES
LACTICA Y ALCOHOLICA EN CULTIVOS
MIXTOS POR CAMBIOS AMBIENTALES

TESIS QUE PRESENTA:

GREGORIO JORGE GOMEZ HERNANDEZ

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO

EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

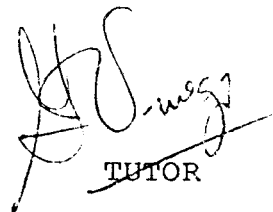
AREA DE CONCENTRACION:

BIOQUIMICA

MEXICO, D.F., 1983

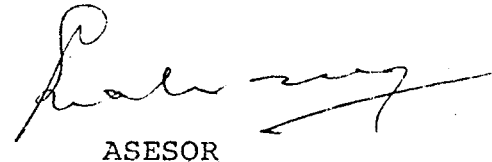
EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO
DE MICROBIOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
DE LA UAM - IZTAPALAPA.

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ
Depto. Biotecnología
U A M - I



TUTOR

DR. S. LAKSHMINARAYANA
Depto. Biotecnología
U A M - I



ASESOR

DR. HERMILO LEAL LARA
Depto. de Alimentos
Fac. Química, UNAM



ASESOR

MI MAYOR AGRADECIMIENTO AL DR. GUSTAVO VINIEGRA
GONZALEZ POR SU VALIOSA AYUDA Y CRITICA DURANTE
LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO. ASIMISMO, EX-
TIENDO MI AGRADECIMIENTO A LA Q.F.B. BLANCA E.
CORONADO V. Y A LA SRITA, ANGELICA VALENCIA V.

INDICE GENERAL

	PAG.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
MATERIAL Y METODOS	23
RESULTADOS	26
DISCUSION	30
CONCLUSIONES	43

RESUMEN

El empleo de metabolitos primarios como el ácido acético, láctico o etanol ha aumentado cada vez más, lo que hace necesario encontrar nuevas formas de producirlos. Una forma adicional de obtenerlos, diferente a la extrativa del petróleo, es vía fermentación, sin embargo, resultan procedimientos caros y en algunos casos el procedimiento es muy elaborado. Un proceso común de obtención es a través del uso de microorganismos bien identificados y en medios de cultivo bien definido. Ambos son sujetos a control de calidad periódicos que redundan en un aumento en los costos de producción.

Existen, por otro lado, diversos procesos microbianos en los que hay la participación de más de un microorganismo para la obtención de un producto único, a saber, la producción de metano, algunos alimentos tradicionales y hasta procesos industriales. En algunos de estos procesos se logra observar que mediante la acción conjunta (cultivos mixtos) se simplifica todo el proceso, pero pueden ser poco eficientes en la producción de metabolitos si no se tiene control ambiental. Existen varias hipótesis que tratan de explicar el porqué durante una fermentación con inóculos mixtos, no dan lugar a una gran variedad de productos metabolitos. Algunos señalan que lo que determina los patrones fermentativos es el tipo de fuente nitrogenada, otros que es la fuente carbonada. También se plantea que son los factores físico-químicos tales como el pH, temperatura, la concentración del sustrato, etc.

En este trabajo se evaluarán, en condiciones sépticas, el efecto del pH (inicial y constante), temperatura, tipo de fuente nitrogenada y los factores de crecimiento usando un inóculo heterogéneo complejo (estiércol de bovino productor de leche). El perfil de pH estudiado fue des-

de ácido hasta el alcalino; el perfil de temperatura evaluado comprendió desde temperaturas ambientales hasta termofílicas. Los factores de crecimiento (vitaminas) estudiados fueron de tipo comercial. Las fuentes de nitrogenadas empleadas fueron peptona (como proteína) y sulfatos de amonio (como nitrógeno inorgánico). Se midieron mediante cromatografía de gases, etanol, ácidos grasos volátiles (ácido acético, propiónico y butírico) y ácido láctico esterificado. Se encontró que a pH altos se produce preferentemente ácido láctico y en tanto que a pH bajo el producto predominante fue etanol. Fue determinante el control del pH. A través de todo el trabajo se vió como uno de los factores que limitan más la fermentación. Se observó que la fermentación láctica puede ser termotolerante solo en presencia de proteína. Se evidenció una fuerte influencia de las vitaminas en la fermentación láctica.

La fermentación alcohólica se favorece en medios de composición simple a pH ácido; se encuentra que la fermentación láctica a pH constante alcalino o amortiguado es independiente del tipo de fuente nitrogenada; la temperatura tiene un efecto negativo en presencia de sulfato de amonio; los factores de crecimiento aceleran la fermentación láctica además de que los niveles de producción del metabolito varían dependiendo del tipo de fuente nitrogenada en combinación con los factores de crecimiento.

INTRODUCCION

Una de las fermentaciones tradicionales mas comunmente usada, junto con la fermentación alcohólica, es la fermentación láctica. El estudio de esta fermentación se remonta a fines del siglo pasado. Sin embargo, los estudios sistematizados (como las condiciones óptimas de crecimiento y fermentación) se iniciaron en el primer tercio de este siglo.

Los usos del ácido láctico se encuentran principalmente en la conservación y producción de alimentos. Por ejemplo, el ácido láctico se emplea como conservador en diversos tipos de alimentos en donde su función básica es la de evitar la putrefacción; suele usarse en la industria confitera como acidificante, dandosele un uso similar en la elaboración de jugos. También es utilizado en la producción de bebidas efervecientes y en la industria cervecera es utilizado el ácido láctico. El proceso industrial para la producción de proteína unicelular utiliza al ácido láctico para inhibir el crecimiento de bacterias butíricas (Prescott, Caseda). y Dunn, 1962, (asida, 1968).

Siguiendo en este mismo renglón de aplicaciones se puede citar la producción del yoghourt, que se considera como un derivado láctico de invaluable valor biológico. La elaboración de este producto se ha venido haciendo en Europa desde hace siglos mediante procedimientos empíricos consistentes en dejar que la leche se contaminara a temperaturas entre 40-50°C. Los estudios básicos para hacer de este proceso empírico un proceso industrial se iniciaron en la primera parte de nuestro siglo por el trabajo de Metchnikoff (1907) quien identificó a Lactobacillus bulgaricus con métodos algo rudimentarios. Tiempo después se vió que el proceso mediante el cual se formaba el yoghourt era una fermentación

tación láctica pero en la que están involucradas dos cepas microbianas, a saber: L. bulgaricus y Streptococcus thermophilus. Los trabajos de Pette y Lolkema (1951) demuestran que el proceso se puede llevar a cabo a 45°C, como temperatura óptima. Así mismo señalan que la función de S. thermophilus es la de promover una acidez suave que permita el ulterior desarrollo de L. bulgaricus quien hidroliza la lactosa y la caseína a pH de 5.5. En la actualidad se han establecido procesos de fermentación continua para la producción de yoghurt (Mac Bean, 1974, Driessen, 1977, a,b).

Dentro del renglón de los lácteos se encuentra otro que, dentro de los procesos de fermentación láctica es muy importante, a saber, la manufactura de quesos. Este proceso se lleva a cabo mediante la participación de una microflora heterogénea y compleja, que aún no es del todo identificada. Sin embargo se sabe que abundan especies de Propionibacterium y Butyrobacterium. Así mismo, se sabe que en quesos del tipo cheddar juegan un papel muy importante especies de bacterias lácticas como S. cremoris y S. lactis, quienes son insustituibles para proporcionar el sabor y olor característico a este queso (Reiter, 1965).

Existen otros alimentos que son previamente sometidos a la fermentación. Por ejemplo, en el Medio Oriente y en África del Sur se elaboran "cervezas" de color opaco semisólidas que se obtienen de fermentar maíz o sorgo; la fermentación es láctica con el posterior establecimiento de levaduras. En el Sur de la India existe el idli que se prepara mezclando arroz y un tipo especial de frijol. Steinkraus et al. (1967), reporta que de la actividad microbiana sobresalen los géneros Leuconostoc, Streptococcus y Pediococcus. Reportan que la elaboración de este producto no se lleva más de 22 hrs. Se podrían citar otros procesos como el ogi y el Kishk, originarios del África y en donde se

consumen cotidianamente, pues forman parte de la dieta (Helsseltine, - 1979). En general, los granos y en particular la harina de maíz se fermenta fácilmente y el proceso es acelerado a temperaturas de 37°C. Así mismo, frecuentemente se encuentran dentro del proceso de fermentación, bacterias coliformes y levaduras. Sin embargo, la participación de las bacterias lácticas es relevante. Fields, et al, (1981), encuentra que durante la fermentación del maíz las bacterias que se encuentran predominando son Lactobacillus fermentum L.cellobiosus y Pediococcus acidolactici, pues los otros grupos microbianos desaparecen durante la fermentación microbiana. El valor biológico del maíz mejora notoriamente.

En México existen numerosas bebidas tradicionales de fermentación - pero existen dos que han llamado la atención y han merecido algunos estudios. Los dos productos de fermentación heteroláctica son el pulque y el pozol. El pulque es una bebida de moderación y producida por participación de una microflora parcialmente identificada. Se han identificado varias especies de Leuconostoc, Streptococcus y Lactobacillus - que tienen patrones de fermentación tanto homoláctica y heteroláctica. Se han identificado también ciliados y protozoarios al inicio del proceso fermentativo pero que desaparecen al final de la fermentación, en donde el pH es ácido lo cual permite el desarrollo de levaduras entre ellas Saccharomyces y Candida (Sánchez-Marroquin y Hope, 1953). Los productos metabólicos principales son el ácido láctico y el etanol. La consideración más importante que se debe hacer de este producto es que crecen sobre un sustrato de bajo valor biológico (conocido como aguamiel y se forma en una especie del género Agave) pasando a un producto de mayor valor biológico.

El pozol es el producto de maíz macerado y luego fermentado por una microflora compleja. Al final del proceso fermentativo (consecuente - mente anaerobio) se contamina con algunas cepas de Aspergillus (Ulloa y Herrera, 1970). Al final del proceso es también común encontrar mas nitrógeno que el principio de la fermentación (Cravioto et al., 1955). Herrera y Ulloa (1970) identificaron la presencia de bacterias del género Lactobacillus, que son los que le confieren el olor y sabor que ca^o carteriza al pozol y suponen que la fermentación es del tipo láctico - siendo este producto el metabolito principal.

La fermentación láctica es un proceso de marcada importancia en la preparación de alimentos forrajeros pues aumentan la palatabilidad y - mejora el olor de este tipo de alimentos. Por otra parte, las investi^o gaciones en esta línea de producción de alimentos, por fermentación, - mediante los aportes de Anthony (1968), (1971), Preston (1972), Marty y Demeyer (1973), han sido relevantes. Por ejemplo los trabajos de Pé^o rez-Gavilán et al., (1976) y Alvarez et al., (1979) se han encaminado a encontrar las condiciones de fermentación láctica, partiendo de mela^o za y urea, como fuente de carbono y nitrógeno, empleando inóculos com^o plexos heterogéneos (líquido ruminal o estiércol) pues se ha visto que empleando este tipo de sustratos, a niveles elevados, los productos de fermentación son los ácidos butírico y acético, que resultan tóxicos - para los rumiantes. Encuentran que mediante la sustitución del nitró^o geno proveniente de la urea por nitrógeno protéico, cambian los patro^o nes de fermentación. La fermentación se hace láctica. En general se procura que, en los alimentos forrajeros para la alimentación de rumian^o tes la fermentación sea láctica pues este metabolito puede ser utiliza^o do por los animales como fuente de carbono y es aquí en donde reside la

importancia de que la fermentación, durante el mezclado de forrajes, sea principalmente láctica, además de que actúa como conservador del forraje mismo.

Por lo visto hasta ahora, se tendrá la impresión de que las fermentaciones solo son aplicables a la producción o conservación de alimentos, ya sea mediante la participación de cultivos puros o mezclados, o mediante los cultivos heterogéneos. Sin embargo, existen usos industriales. En este sentido, se pueden mencionar los siguientes usos. Se pueden emplear derivados del ácido láctico, como el lactato de n-butilo que se utiliza en la fabricación de pinturas; el lactato de n-etilo es a menudo utilizado como agente lubricante (Prescott y Dunn, 1962). Las sales del ácido láctico tienen usos importantes en la pastelería, sin embargo su uso crece cada día más en la industria farmacéutica. Por ejemplo, es frecuentemente usada para aumentar la solubilidad de la penicilina. En general, los usos del ácido láctico o sus derivados, sales o ésteres, están encontrando nuevos usos. Por ejemplo, la formación de acrilato. Este producto puede tener como precursor al ácido láctico (pueden ser también el acetileno, propileno y etileno). El acrilato, y por ende el lactato, se pueden polimerizar para formar patas transparentes que pueden ser usadas en la fabricación de lentes, joyería de fantasía, etc. El acrilato puede ser el precursor del acrilitrilo que a su vez tiene una gran demanda para la fabricación de fibras sintéticas que se emplean en la manufactura de ropa (Es oportuno señalar que el acrilato mismo es un producto de fermentación o en algunos casos es el intermediario en vías metabólicas (Cardón 1947, Johns, — 1952, Ladd, 1965, Wegner, 1967)).

Las bacterias formadoras de ácido láctico presentan dos formas anatómicas, a saber, cocoide y de bastón. En la Tabla 1 se describen las

bacterias lácticas tanto de valor comercial como biológico siendo el ácido láctico el producto metabólico principal.

Las características generales de las bacterias lácticas se describen con amplitud en el manual de Bergey (Buchanan y Gibbon, 1974), sin embargo, se pueden hacer algunas consideraciones. Las bacterias lácticas, tanto las formas esféricas como las de baston son bacterias gram positivas, no formadoras de endosporas. Algunas de las especies descritas pueden ser microaerofilicas o facultativas. El pH para el cultivo de estas bacterias se encuentra entre 5 y 9. Por ejemplo, las especies del género Streptococcus crecen en valores de pH ligeramente ácido hasta valores de pH francamente alcalinos.

Por otra parte, las formas esféricas del género Leuconostoc puede desarrollarse en el intervalo de pH que va de 4 a 6.5. En este género se encuentran especies que pueden formar polimeros de glucosa a partir de disacáridos con diferentes grados de ramificación y peso molecular. L. bovis forma dextrana en presencia de sacarosa pero de peso molecular diferente a L. destranicum. En general, este género de heterofermentativo. El pH de crecimiento de las formas de baston, se encuentran en el ácido, siendo éste de 5 a 6.

La temperatura de crecimiento de las bacterias lácticas se desarrollan en rango muy amplio de temperatura, de modo que se pueden encontrar bacterias lácticas psicrófilicas, mesófilicas y termófilicas. Leuconostoc crece generalmente entre 20-30°C, sin embargo, las otras formas esféricas lácticas, Streptococcus, y las formas bacilares se desarrollan desde 30 a 55°C. Con frecuencia el crecimiento bajo condiciones óptimas de pH y temperatura no corresponde con la máxima formación de metabolitos. La acumulación de metabolitos primarios se da usualmente cuando es elevada la energía de mantenimiento.

Tabla 1. Bacterias lácticas y sus productos metabólicos.

Microorganismo	Acético	Ac. Láctico	Etanol
<u>Streptococcus bovis</u>	+	+	-
<u>S. thermophilus</u>	-	+	-
<u>S. lactis</u>	-	+	-
<u>S. diacetylactis</u>	-	+	-
<u>S. cremoris</u>	+	+	-
<u>Leuconostoc mesenteroides</u>	+	+	+
<u>L. detranicum</u>	+	+	+
<u>L. paramesnteroides</u>	+	+	+
<u>L. lactis</u>	-	+	+
<u>L. cremoris</u>	-	+	+
<u>Lactobacillus lactis</u>	-	+	-
<u>L. bulgaricus</u>	-	+	-
<u>L. jensenii</u>	-	+	-
<u>L. dulbrueckii</u>	-	+	-
<u>L. acidophilus</u>	-	+	-
<u>L. casei</u>	+	+	-
<u>L. xylosus</u>	+	+	-
<u>L. plantarum</u>	+	+	-
<u>L. brevis</u>	+	+	+
<u>L. celobiosus</u>	+	+	+
<u>L. fermentum</u>	+	+	+
<u>L. brevis</u>	+	+	+

En la Tabla 2 se da una relación entre el tipo de microorganismo y su fuente de carbono.

Tabla 2. Diferentes fuentes de carbono de las bacterias lácticas.

Microorganismo	Dextrosa	Lactosa	Sacarosa	Almidón	Celobiosa	Xilosa
<u>L. casei</u>	+	+	+	-	+	-
<u>S. lactis</u>	+	+	-	-	-	-
<u>L. delbrueckii</u>	+	-	+	-	-	-
<u>Leuc. mesenteroides</u>	+	+	+	-	+	+
<u>Leuc. dextranicum</u>	+	+	+	-	+	+
<u>S. thermophilus</u>	+	+	+	+	-	-
<u>L. xylosus</u>	+	-	+	-	-	+
<u>L. plantarum</u>	+	+	+	-	+	-
<u>S. cremoris</u>	+	+	-	-	-	-
<u>S. bovis</u>	+	+	+	+	-	+
<u>L. brevis</u>	+	-			-	+
<u>L. celobiosus</u>	+	-	+	-	+	+

Los azúcares enunciadas en la Tabla 2 son los normalmente usados (Inskeep, et al, 1956), en los procesos industriales para la producción de ácido láctico, pero, la gama de fuentes de carbono es muy amplia. Esta capacidad de las bacterias lácticas nos permite vislumbrar que es tos microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza.

El cultivo de las bacterias lácticas en forma pura, requiere de la preparación de medios de cultivos complejos que deben de ser adicionados de nitrógeno protéico. De hecho, solo se conoce una especie con requerimientos nutricionales simples, a saber, S. bovis, que puede cre cer en sales de amonio (Niven et al. 1948, Walen et al. 1959), pero

las demás bacterias lácticas necesitan de la presencia de amino ácidos. Además de necesitar de la presencia de amino ácidos en el medio de cultivo, es necesario adicionar factores de crecimiento, dentro de los cuales se pueden citar las bases puricas, pirimidicas y ácidos grasos de cadena larga. Se ha demostrado la fundamental influencia del ácido nicotínico (Kitahara y Obayashi, 1955; de la riboflavina (Orla-Jensen, et al., 1936, Wood et al., 1937); el ácido pantoténico (Snell et al., 1938, 1939). Por ejemplo se demostró que Lactobacillus pentosus necesita en su medio de cultivo la presencia de biotina, ácido pantoténico y ácido nicotínico (Krueger y Peterson, 1943).

La formación del ácido láctico depende de las condiciones de cultivo. Evidentemente los parámetros físico químicos que deben de ser establecidos para que la formación de ácido láctico se optimice son pH y temperatura. Por otra parte, existen evidencias recientes de que la concentración de oxígeno presente, puede dar lugar a la formación de otros productos (Brown y Collins 1977, Thomas et al., 1979, Dirar y Collins, 1973). Así mismo, la reducción (o desaparición del ácido láctico durante una fermentación) de la formación del ácido láctico puede deberse a compuestos como el citrato que desvía la fermentación láctica en cepas homolácticas y da lugar a la formación de diacitilo o acetoina (Logan, 1975, Logan et al., 1981).

Por otro lado, concentraciones elevadas de azúcar pueden cambiar la concentración de ácido láctico aumentando, por ejemplo, el ácido acético o el etanol (Christensen, 1958).

La familia Lactobacillaceae en términos generales, pueden ser clasificados en bacterias lácticas heterofermentativas y homofermentativas. Esta clasificación subjetiva se da en función de la aparición de otros productos diferentes al ácido láctico, principalmente por la aparición

del etanol y del ácido acético. Se dice que es homofermentativa cuando el ácido láctico se encuentra, en relación a los otros, en 80% - - (Doelle, 1975).

La formación de ácido láctico por microorganismos homofermentativos sigue la vía de Embden-Merhoff-Parnas (EMP) aunque existen excepciones (Gibbs et al, 1970).

La vía de la fermentación homoláctica se muestra en la Figura 1 en donde, en forma esquematizada se muestran los pasos más importantes. Cabe señalar que se forman 1.3 moles de ácido láctico por mol de glucosa, lo que sugiere que son formados otros productos diferentes al ácido - láctico. Algunos autores encuentran que un factor determinante que puede influir en el mantenimiento, de la relación de productos, en la que el ácido láctico sea el metabolito predominante, es la concentración - de FDP pues se ha visto que es factor positivo en la activación de la deshidrogenasa láctica. Niveles bajos de esta enzima favorecen la formación del ácido acético (Wittenberger y Angelo, 1970) y negativamente sobre la oxidación del ácido láctico (London, 1968). En la Figura 1 - se señala otra enzima que tiene un papel importante en la definición de vía láctica homofermentativa, a saber, la fructosa difosfato aldolasa (Buyze et al., (1957).

El ácido láctico presenta propiedades ópticas, es decir, se puede encontrar en el caldo de fermentación en la forma D, en la forma L o formando un racemato (Kopeloff et al., 1937). Las deshidrogenasas localizadas en estas bacterias se pueden encontrar enlazadas a acarreadores de electrones diferentes, NAD o flavin nucleotidos. Cada enzima se puede encontrar en la forma D o L. Por otra parte, los valores de pH óptimos son diferentes. Por ejemplo, la deshidrogenasa de las -

Sustratos diferentes a la glucosa

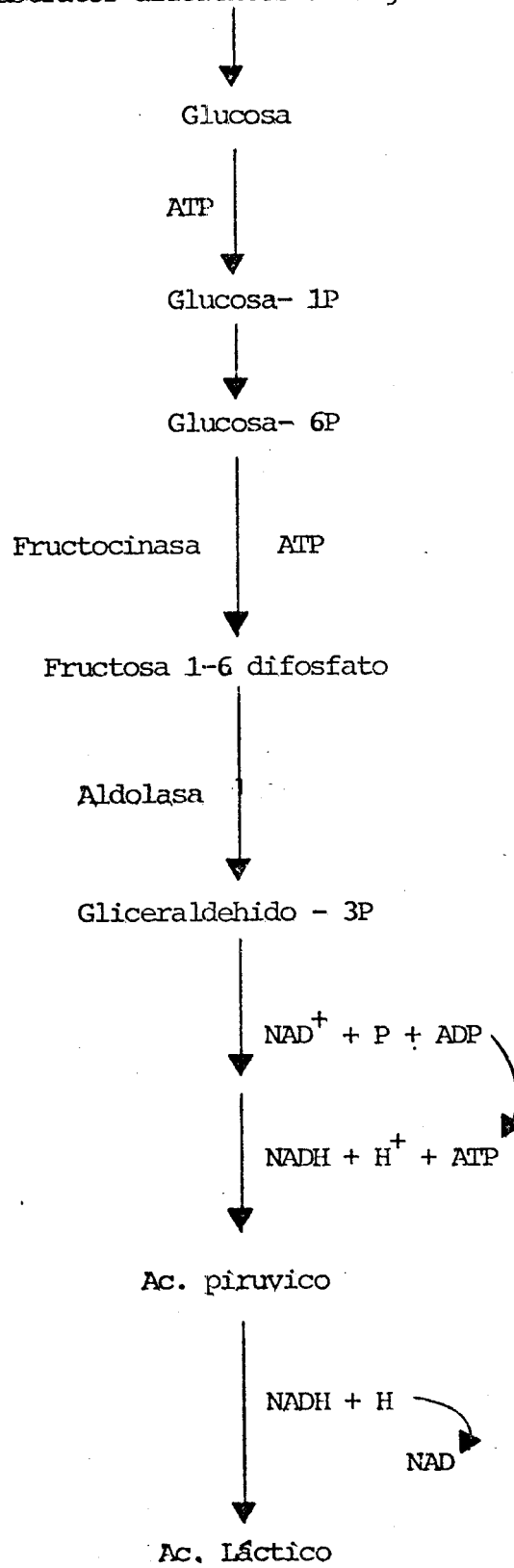


Fig. 1 Formación de ácido láctico por bacterias lácticas homofermentativas.

bacterias homofermentativas tiene un pH óptimo entre 7.8 y 8.8, en cambio el pH óptimo para las heterofermentativas se localiza en intervalo de 9 y 10. Los deshidrogenasas, teniendo flavinas como coenzimas, presentan su máxima actividad entre valores de pH de 5.6 a 5.8, que son ácidos (Doelle, 1971).

Las bacterias heterofermentativas (Leuconostoc, algunas especies de Lactobacillus y Bifidobacterium, entre otras) metabolizan el azúcar, a través de dos vías parecidas a la trayectoria de las pentosas (conocida como hexosa monofosfato, HMP), e incluso se consideran como ramificaciones de esta vía. A la vía heterofermentativa se le conocen las vías de la pentosa fosfocetolosa y hexosa fosfocetolosa. La vía de la pentosa fosfocetolosa puede utilizar como azúcares tanto hexosas como pentosas según se ve en la Figura 2, en la que se observa que la utilización de las pentosas se lleva a expensas de ATP por medio de una fosfotransferasa pues este grupo bacteriano carece de la transcetolasa de la vía HMP. La fosfocetolasa que interviene en esta vía hidrolizando a la xilulosa-5P a gliceraldehído-3P y acetilfosfato. El género Leuconostoc, es el grupo bacteriano que posee esta vía donde los productos finales de fermentación son etanol, CO₂ y ácido láctico (Deley, 1962).

La vía hexosa fosfocetolosa, típica de Lactobacillus bifidus (Ellermann et al., 1970), que se muestra en la Figura 3, carece de la enzima fructo-difosfato-aldolasa. Al igual que en la trayectoria de la pentosa fosfocetolosa, en esta vía la enzima clave es la fosfocetolasa que es una enzima dependiente de TPP y Mg⁺⁺ siendo el proceso de esta liasa irreversible (Votaw y Krampitz, 1966) y teniendo como sustrato específico a la xilulosa 5P.

En este esquema la enzima rompe la fructosa 6 fosfato a eritrosa 4 - fosfato y acetil-fosfato. Posteriormente, la eritrosa-4 fosfato será -

finalmente hidrolizada a gliceraldehído-3 fosfato y acetilfosfato. En esta vía no se libera CO_2 y el metabolito predominante es el ácido acético.

En general, las dos vías de la fosfoacetolasa, son, desde el punto de vista energético, menos eficientes que la fermentación homoláctica puesto que en vía se obtienen dos ATP por mol de hexosa consumida. Aunque valdrá la pena reconsiderar esto, en la vía de la pentosa fosfoacetolasa, pues la hidrólisis del acetilfosfato o acetil coenzima A tiene cambios de energía libre suficientes para formar ATP ($\Delta G^\circ = 7.3 \text{ Kcal/mol}$).

Consideraciones similares pueden extrapolarse a la heterofermentación de la vía hexosa fosfoacetolasa en donde se forman 3 moles de acetilfosfato que al hidrolisarse genera tanto calor que podría dar lugar a la formación de nuevo ATP.

La producción de ácido láctico tradicionalmente se ha venido haciendo por cultivos lote, sin embargo, la producción de este metabolito se ha hecho también mediante un proceso continuo (Whitter y Rogers, 1931, Hanson y Tsao, 1972) pero que es usado solo en pequeños fermentadores y su uso no está muy extendido, debido principalmente a los problemas de contaminación, frecuentes en este tipo de procesos. Por otro lado, las fuentes usuales de carbono son lactosa, almidón de maíz, melazas, almidón de papas, maltosa, etc. Cabe indicar que los almidones antes de la fermentación, son hidrolizados mediante procesos enzimáticos o procesos químicos, en donde se emplean valores de pH ácidos y altas temperaturas (Inskeep *et al.*, 1956, Needle y Aries, 1949, Cordon, *et al.*, 1950, Leonard, *et al.*, 1948). La composición del medio de cultivo contiene una fuente nitrogenada compleja de tipo proteico, además de que requiere de la adición de factores de crecimiento que en los procesos industriales, son adicionados normalmente en forma de extrac-

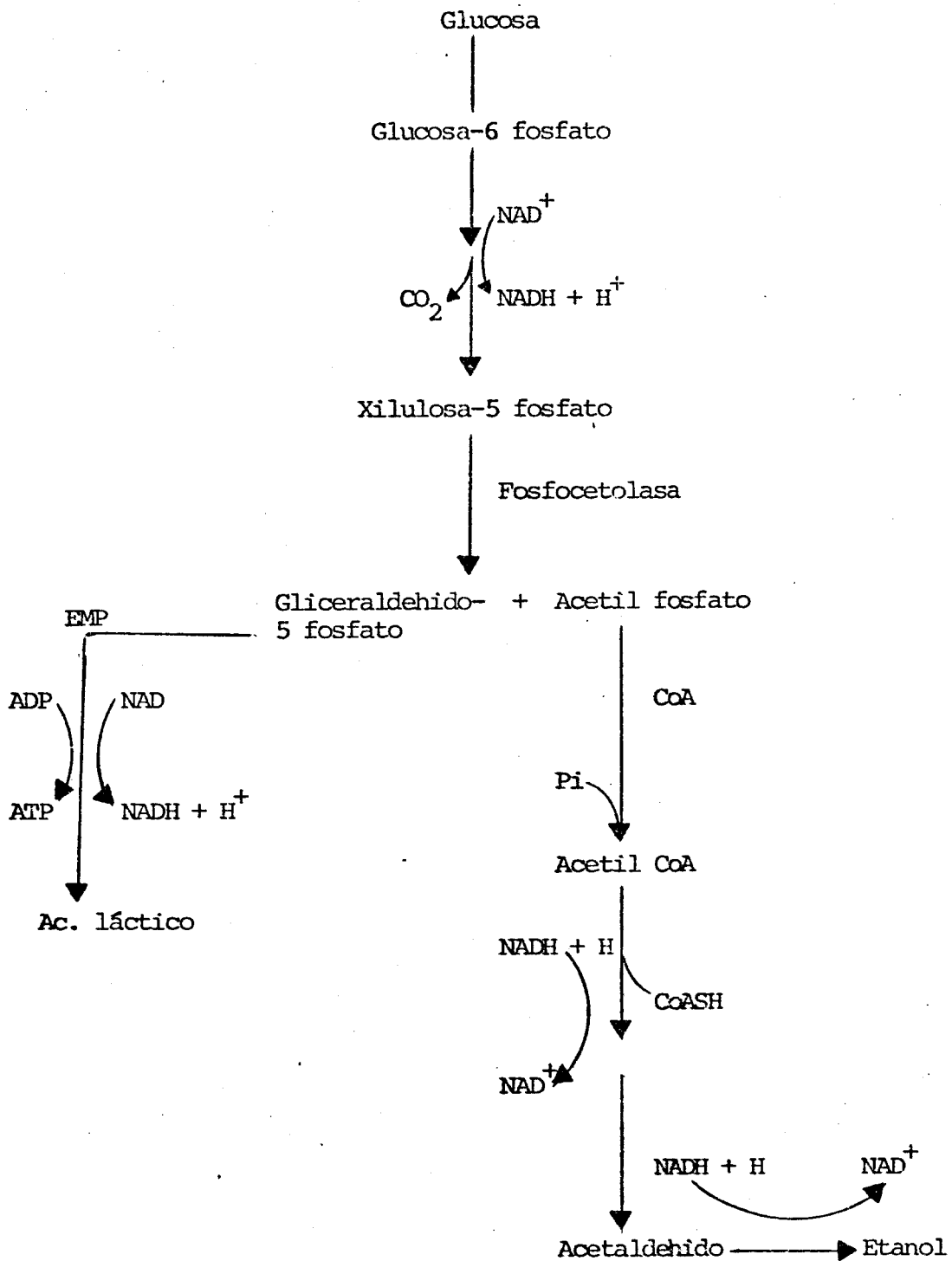


Fig. 2 Heterofermentación de Leuconostoc mesenteroides por la vía de la pentosa fosfocetolasa.

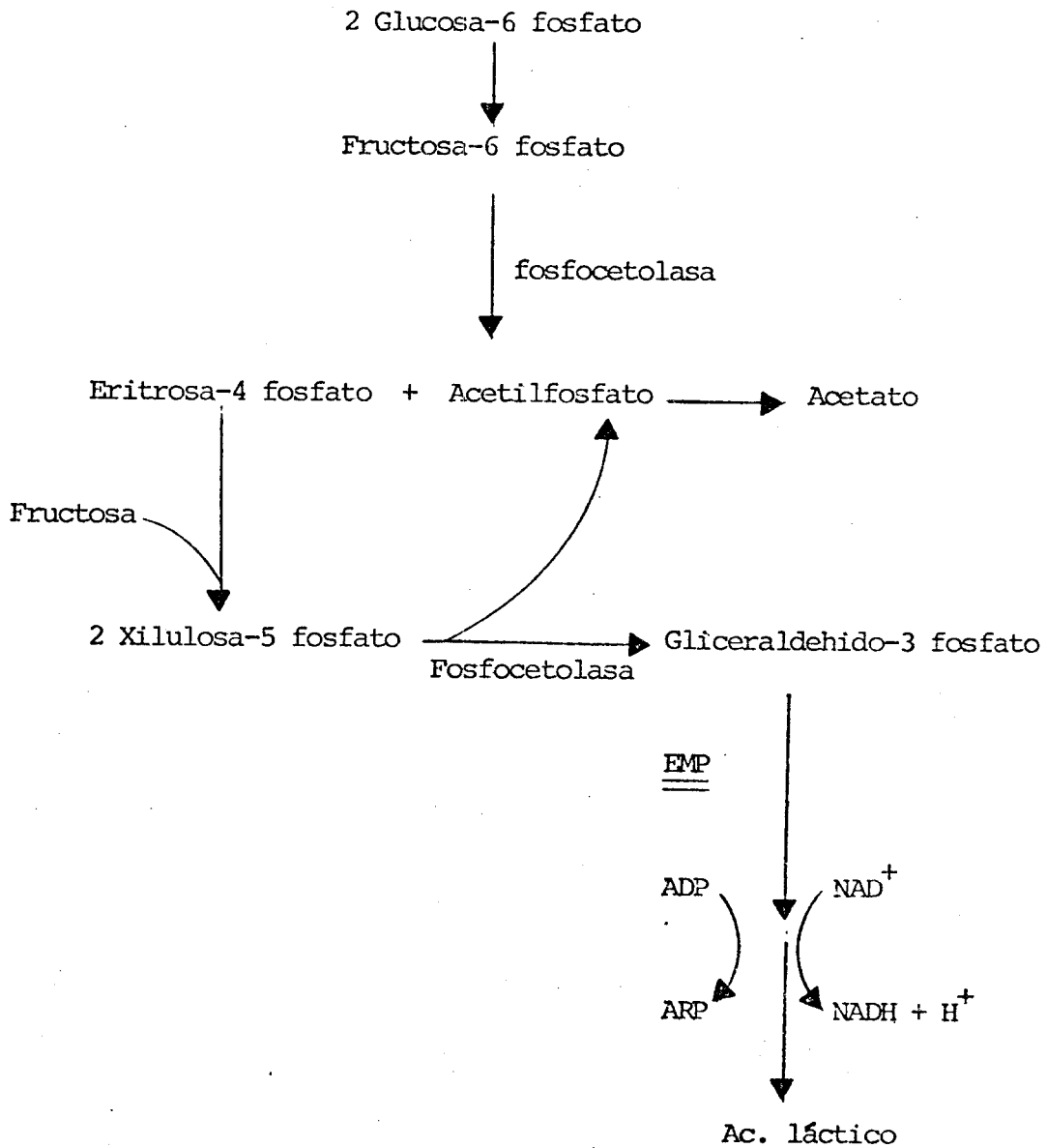


Fig. 3 Vía de la hexosa fosfocetolasa seguida por bacterias con fermentación heteroláctica (género Bifidobacterium).

tos, a saber, extracto de malta y suero de leche o agua de cocimiento de maíz. Los valores de temperatura dependen del microorganismo empleado, por ejemplo, cuando se usa como inóculo a Lactobacillus casei se pone una temperatura de 43°C; con L. delbrueckii se fija 49°C pero cuando el inóculo lo constituye L. pentosus la temperatura es de 30°C. El pH usado se encuentra en el intervalo de 5 y 6.

En casi todas las variantes existentes para la producción de ácido láctico se logra una conversión entre el 80 y 90%. El tiempo que tarda el proceso es variable pues dependerá del tipo de microorganismo, sin embargo, la máxima producción se logra entre 2 y 7 días si se parte de concentraciones que se encuentren entre el 6 al 10% de azúcar.

Aunque el empleo de inóculos complejos heteroféneos (ICH) no se ha llevado a escala industrial se puede comenzar a pensar en este tipo de inóculos, como una alternativa para la producción de diferentes solventes y ácidos orgánicos. En realidad, la literatura vertida sobre la producción de solventes, empleando ICH, se ha encaminado básicamente a la utilización posterior de los metabolitos producidos para la producción de gas metano (Bhattacharya y Taylor, 1975, Cooney y Wise, 1975, Pohland y Ghosh, 1977, Verel et al., 1977, Robbin et al., 1979).

La producción de etanol está prácticamente limitada a las levaduras del género Saccharomyces que son microorganismos ovalados (50u) pertenecientes al orden de los Ascomycetales. Ocasionalmente se llegan a encontrar bacterias formadoras de etanol, sin embargo, la cantidad producida, respecto a las bacterias, es poco significativa.

Las levaduras son microorganismos facultativos que crecen en medios simples a pH ácido (4-5) y a temperaturas que van de 25 a 30°C y la fuente de carbono tanto para el crecimiento como para la fermentación alcohólica es una hexosa. No se han encontrado cepas de levadura que

necesiten de factores de crecimiento para su desarrollo.

La vía metabólica para oxidación de glucosa a piruvato es la descrita por Embden-Meyerhoff-Parnas (Fig.1). La reducción del piruvato se lleva a cabo mediante su descarboxilación a acetaldehído, quien es reducido a etanol mediante la deshidrogenasa alcohólica.

Por otro lado, se ha encontrado que la fermentación alcohólica se puede favorecer a concentraciones elevadas de azúcar debido a una reducción de las enzimas del ciclo de Krebs (se ha reportado que la enzima marcadamente inhibida es la 2-oxoglutarato-deshidrogenasa. A este fenómeno se le conoce como efecto Crabtree). Por otra parte, el oxígeno tiene un efecto negativo en la fermentación alcohólica pues existen evidencias de que inhibe la biosíntesis de deshidrogenasas en microorganismos facultativos (Lin et al., 1960 y McPhedran, et al., 1961, reportaron que el oxígeno en la fermentación alcohólica inhibía la formación de la deshidrogenasa láctica).

Newberg y Reinfurth (1910), inicialmente y más tarde Neish y Blackwood (1951), demostraron la importancia del pH en la fermentación alcohólica. Observaron que a diferentes valores de pH el producto final era diferente. Encontraron que a pH ácido el producto principal era etanol, en tanto que a pH alcalino se tiene una heterofermentación — pues los productos finales son etanol, acetato, CO₂ y glicerol. Lo anterior indica que el pH como factor fisiológico no solo altera el proceso de fermentación en sí, sino que también influye notoriamente en el crecimiento celular al verse reducidos los niveles de energía.

Las aplicaciones y usos de la fermentación alcohólica son bien conocidos, pero destacan las aplicaciones industriales. Así la fermentación alcohólica se emplea para la preparación y fabricación de bebidas tales como la cerveza, vinos de mesa, ron, brandy y muchos otros.

El uso del etanol se amplía a la industria farmacéutica y médica en donde se emplea como diluyente y como anticéptico.

Además de los usos descritos, los tradicionales, existen otros, pero hay uno sobresaliente, a saber, el uso del etanol como carburante en motores de combustión interna. En este sentido, actualmente existen en diversos lugares del mundo (principalmente en los países no productores de petróleo) programas para la producción masiva de etanol, para emplearlo como sustituto de la gasolina o en mezcla con la gasolina. Para tal propósito, se han iniciado programas de mejoramiento de cepas de levadura super productoras de etanol. Los resultados obtenidos a la fecha indican la incosteabilidad del proceso (su precio en el mercado es más bajo que su valor de producción). Se han planteado alternativas para reducir los costos, tales como la de emplear sustratos de muy bajo precio y abundantes como la celulosa, y prescindir del sustrato carbonado tradicional, la melaza, ya que los usos de este subproducto de la industria azucarera se están dirigiendo hacia la producción de alimentos, por lo que se hace imperioso buscar nuevos sustratos o bien, nuevos procesos de fermentación. Respecto a éste último, Jones y Greenfield (1981) produjeron etanol utilizando un cultivo mixto gnotobiotico de levaduras y los resultados son alentadores, sin embargo, es necesario seguir buscando un proceso simple y sobre todo, barato. Todo lo anterior evidencia que los trabajos realizados en cultivos axénicos, comparados con los cultivos mixtos no admiten una comparación cuantitativa. Estas diferencias establecen la necesidad de iniciar y sistematizar los estudios de los cultivos mixtos y heterogéneos y concretamente aquellos que se refieren a las fermentaciones de metabolitos primarios.

De hecho, los únicos estudios formales con cultivos mixtos hetero - géneos (no axéncios) son los que se refieren a la digestión anaerobia para la producción de gas metano en los que se han estudiado el efecto de la temperatura, pH y composición del medio de cultivo. Existen otros, por ejemplo, los relacionados con el estudio de la microflora ruminal pero que en realidad han terminado en el estudio individual - fisiológico de grupos bacterianos bien caracterizados, sin embargo, - son pocos los que trataron de estudiar la conducta del cultivo sin se - pararlos en grupos o géneros bacterianos.

Lo anterior hace necesario el estudio de este tipo de inóculos en su forma natural, es decir, sin someterlos a una selección y, en parti - cular, aquellos que por su naturaleza actúan como contaminantes pero que son potencialmente susceptibles de ser utilizados industrialmente como, por ejemplo, producción de alimentos forrajeros, producción de metabolitos como el etanol, lactato, acetato, etc. y, en este sentido, el estiércol de bovinos es uno de estos inóculos, ya que su produc - ción anual alcanza cifras impresionantes y su uso está muy restringi - go, de modo que se acumula, lo cual origina focos de contaminación y enfermedades (principalmente entéricas).

En términos generales, se ha venido diciendo que los patrones fer - mentativo de los cultivos mixtos, no axénicos, (como el estiércol) es - tán determinados principalmente por la composición del medio de culti - vo. Concretamente, se dice que la fermentación alcohólica o láctica se modifica por el tipo de fuente nitrogenada presente en el medio de cultivo, así se ha indicado que en presencia de nitrógeno no protéico la fermentación es alcohólica y si la fuente nitrogenada es proteína - la fermentación es principalmente láctica, sin embargo, el efecto de la composición del medio de cultivo se ha aislado de la influencia que

podrían tener otros parámetros, a saber, el pH, la temperatura y la presencia de factores de crecimiento que, como se sabe, en cualquier cultivo son necesarios de establecer. Del mismo modo, poco se sabe de efecto cinético de la fuente nitrogenada en los patrones fermentativos usando este inóculo heterogéneo.

Por las consideraciones anteriores, en este trabajo se tiene como objetivo:

- a) Establecer las condiciones experimentales de laboratorio para la producción de metabolitos primarios.
- b) Demostrar que un inóculo heterogéneo complejo puede ser orientado hacia un patrón fermentativo definido, dadas las condiciones de cultivo.
- c) Estudiar el efecto de la fuente nitrogenada (inorgánica y protéica) bajo diferentes condiciones fisicoquímicas, a saber, pH, temperatura y el efecto de los factores de crecimiento, empleando un inóculo heterogéneo complejo (no axénico-no gnotobiotico).

Dados los objetivos anteriores se tiene como metas:

- 1) Estudiar el efecto y control del pH con dos fuentes nitrogenadas diferentes.
- 2) Estudiar el efecto de la temperatura con dos fuentes nitrogenadas diferentes.
- 3) Estudiar el efecto de los factores de crecimiento con dos fuentes nitrogenadas diferentes.

Las metas descritas serán evaluadas midiendo la formación de ácidos grasos volátiles, etanol y ácido láctico mediante cromatografía de gases.

MATERIAL Y METODOS:

Inóculo. El inóculo empleado fue estiércol fresco de bovino (raza Holstein). La dieta básica de los animales consistió de maíz y salvado y se complementó con diferentes forrajes. El inóculo fue de 10g por cada 100 ml de medio de cultivo.

Medio de Cultivo. Estuvo compuesto por dos fuentes nitrogenadas diferentes, a saber: peptona (NO) y sulfato de amonio (NI). Uno y otro medio de cultivo contuvieron la misma concentración de nitrógeno. El medio basal se compuso de: glucosa al 3%, sulfato de magnesio al 0.1%, fosfato ácido mono-potásico al 0.1%, cloruro de sodio al 0.1% y vitaminas de tipo farmacéutico que se adicionaron de la siguiente forma: se ponen 2 cápsulas en 20 ml de agua destilada y se agitan vigorosamente. De esta suspensión se tomo 1 ml por cada 100 ml de medio de cultivo.

pH. En ocasiones el pH fue controlado (constante) y en otras se fijo solo un valor de pH inicial (no constante). El control del pH se hizo de dos formas, a saber: regulación del pH con amortiguadores y regulación por medio de un controlador automático de pH (New Brunswick Scientific). Para el caso del empleo de amortiguadores se empleó un ácido o base débil dependiendo del valor de pH a usar. La concentración del amortiguador, en todos los casos fue de 0.25 M. Los compuestos químicos que se emplearon fueron: ácido succinico, glicina, ácido fosfórico y tris (hidroximetilaminometano). Para estudiar este parámetro se fijaron intervalos de 0.5 unidades de pH.

Temperatura. El estudio de la temperatura se llevó a cabo con una variación de $\pm 2^{\circ}\text{C}$.

En todos los casos la fermentación se llevó a cabo con agitación

(200 rpm). En unos casos el volumen fermentado fue 200 ml y en otros de 400 ml.

Cromatografía de Gases. Para determinar los perfiles de fermentación se midieron ácidos grasos volátiles, AGV (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico), etanol y ácido láctico. Para la determinación y cuantificación de los compuestos se procedió como sigue: Se tomaron 5 ml de muestra de fermentación, a diferentes intervalos de tiempo y se les adicionó 0.6 ml de una mezcla (3 : 1) de ácido fosfórico concentrado y ácido fórmico al 25%. Se agita y se centrifuga a 5000 rpm durante 20 minutos. Del sobrenadante se tomó muestra para determinar etanol y AGV. Para determinar el ácido láctico se tomó 1 ml de sobrenadante al que se le adicionó 2ml de metanol, 0.5 ml de ácido sulfúrico al 50%. Se calentó a 55°C durante 30 minutos, se sacó del baño y se adicionó 1 ml de agua destilada y se agitó; se agrega 0.5 ml de cloroformo y se agitó. Se tomó de la fase no acuosa para la determinación del ácido láctico. Cabe señalar que como se tiene en algunos ensayos la presencia de ácido succínico se hicieron algunas modificaciones a los métodos establecidos, para cuantificar tanto el ácido láctico como el ácido succínico.

Para la cuantificación de los productos de fermentación se inyectaron 3 microlitos en una columna de 1.60 mts. rellena con cromosorb W 60/80. La fase estacionaria se compone de ácido fosfórico al 2% y de Tween 80 al 20%; la fase móvil fue nitrógeno molecular y se usó a una velocidad de 30 ml/min. El cromatógrafo utilizado fue un cromatógrafo Varian 1400 con un detector de ionización de flama. El gas para el quemador fue hidrógeno molecular y se manejó a 20 ml/min. El aire se usó a 200 ml/min. Para la cuantificación se empleó un integrador Varian CDS 111. Para la cuantificación se empleó una refe -

referencia de AGV y etanol al 1%. Para ácido láctico la referencia tuvo una concentración de 1.5%. Para la cuantificación de los productos solo se procedió cuando el error no fue mayor a 6%, con respecto a la referencia.

RESULTADOS

Control del pH y Efecto de la Fuente Nitrogenada. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y en algunos casos, el mismo experimento, se repitió semanas después. Se trabajó con un error estándar de $\pm 5\%$, aunque la magnitud de la concentración en algunas ocasiones fué de variación mayor. Las Figuras 4 y 5 muestran la fermentación de glucosa, con continuo de pH a 6.5, donde se puede apreciar que el patrón es el de una fermentación láctica, pues este metabolito predomina sobre los demás. Es notorio, por otra parte, que la producción máxima de los metabolitos se alcanzó en aproximadamente 12 hrs., cuando el nitrógeno provino de la proteína. Cuando la fuente nitrogenada es de tipo inorgánico, la producción máxima se alcanza después de las 24 hrs. de fermentación tanto en NO como en NI la concentración de los metabolitos, como el ácido acético y el etanol, no fué significativa.

En la Figura 6 se muestra un perfil de fermentación a pH 4.5 de constante, con peptona, en un caso y sulfato de amonio en otro, como fuentes nitrogenadas. Se observa que el producto principal, empleando peptona, es el ácido láctico y el etanol es el producto secundario. Este patrón de fermentación se invierte cuando la fuente nitrogenada es sulfato de amonio. Así mismo, pudo observarse que el tiempo de fermentación, para alcanzar la producción máxima, es de más de 40 hrs. Se observa también, que en NI hay retardo en la producción de metabolitos mayor que en NO.

La Figura 7 representa la fermentación a un valor de pH de 6.5 inicial, con sulfato de amonio como fuente nitrogenada. Se ve que el producto principal es el etanol y el secundario es el ácido láctico. Aparecen también ácido propiónico, sin embargo, en experiencias posteriores no fué reproducible. La Figura 8 muestra el perfil de fermentación

a pH de 4.5 inicial en el medio NI. El patrón de fermentación de las Figuras 5 y 9 son muy similares. Probablemente la fermentación a 6.5 sea solo un poco mas eficiente que la fermentación a 4.5. En ambas Figuras la magnitud del metabolito principal es menor que el del metabolito principal a pH constante. En ambas fermentaciones el pH final fué de 3.4. Este valor de pH fué reproducible en todos los casos en que se experimentaron variación en el pH.

En la Figura 9 se representan los perfiles de fermentación en presencia de peptona a dos valores de pH, a saber 4.5 y 6.5 se observó que a ambos valores el producto principal es el etanol, en donde, a diferencia de lo que se observa en las Figuras 7 y 8, el nivel máximo se alcanza en un tiempo corto. En la Figura 9 también se puede ver que hay una mayor producción de ácido láctico. El pH final a los dos diferentes valores fué de 3.4.

En la Figura 10 se muestra el perfil de una fermentación láctica a 3 diferentes valores de pH con sulfato de amonio como fuente nitrogenada. Se observa que hacia valores de pH ácidos la fermentación láctica se abate (en la Figura 6 se ve que el ácido láctico casi desaparece), sin embargo, a valores de pH hacia la neutralidad la velocidad y producción máxima aumentan. Se observa, también que a 7.5, respecto de 6.5, la diferencia cinética es muy pequeña.

Efecto del pH (amortiguado)

Se estudió el perfil de pH para conocer el efecto de pH y su amortiguamiento empleando ácidos o bases débiles, empleando el medio No y NI.

En la Figura 11 se ve claramente que a valores bajos de pH el producto principal es el etanol, sin embargo, el ácido láctico va siendo el producto metabolico principal a valores mayores de pH. La concen-

tracción máxima de ácido láctico se alcanza a valores de pH francamente alcalino, cuando se emplea NO como medio de cultivo. La variación de pH, en cada punto, durante diferentes ensayos, fué 1.2 ± 0.3 .

En la Figura 12 se observa el perfil de la fermentación de glucosa teniendo a NI como medio de cultivo. Aquí se aprecia una situación similar como al descrito en la Figura 6. Sin embargo, se nota que los niveles de producción para ácido láctico se logran a tiempos mayores que a pH constante. Por otra parte, el etanol aparece en forma más significativa que cuando se emplea el medio NI. El nivel máximo de ácido láctico alcanzado es menor que en el caso del medio NO.

Efecto de la Temperatura

En la Figura 13 se ven los dos perfiles de la fermentación láctica en NO y NI a diferentes temperaturas en donde claramente se observa que la fermentación láctica alcanza niveles de concentración mayores en el medio NO, que en el medio NI. Además, se puede apreciar que en presencia de peptona el inóculo (el estiércol) es más tolerante a temperaturas relativamente altas y es casi constante el nivel de producción de ácido láctico en el intervalo de 34-45°C sin una caída súbita en la formación del metabolito. En cambio, cuando el medio lo forma NI, el intervalo en el que se alcanzó la producción más alta es más corta, con una caída brusca después de los 37°C. A 55°C en el medio NO hay una disminución de aproximadamente 25% de ácido láctico y en el NI a esta temperatura es de más de 60%.

Efecto de las Vitaminas

En la Figura 14 se representan los experimentos en presencia y ausencia de factores de crecimiento en los medios NO y NI. El medio NI sin vitaminas (perfil IV) es notorio que la ausencia de los factores de crecimiento influye significativamente en la fermentación láctica. Sin

embargo, en el medio NO la ausencia de vitaminas no tiene un efecto importante en términos de producción máxima de metabolito, pero si influye en el aspecto cinético.

Los perfiles mostrados en las Figuras 11, 12, 13 y 14 fueron amortiguados con compuestos químicos con variaciones de pH tal como se indicó antes.

Se estudió microscópicamente (coloración de Gram) la microflora, al inicio y al final de la fermentación, en experimentos llevados a cabo en diferentes estaciones del año. Al inicio de la fermentación se observó que la microflora es muy heterogénea, encontrándose tanto bacterias gram positivas como negativas, así como levaduras. Este patrón de microflora varió dependiendo en la estación del año. Al final de la fermentación - la microflora se hace mas homogénea; dependiendo de la estación, en unos casos predominaban las formas bacterianas bacilares y en otros casos la forma imperante fueron las bacterias coccoides. Pruebas parciales de identificación taxonómica indican que son bacterias lácticas (familia Lactobacillaceae). Otras pruebas de carácter general, mostraron que las bacterias, como las coliformes, desaparecieron después de 24 hrs. de fermentación, lo que indican la reducción toxica o patogéna del estiércol,

D I S C U S I O N

Control de pH y Efecto de la Fuente Nitrogenada.

El estiércol que se empleó como inóculo se estuvo tomando de animales estabulados sujetos a una dieta variable ya que el tipo de rastrojo que se suministró dependió de la estación del año. Lo anterior obligó a que se hiciera un estudio de la conducta bioquímica del estiércol durante un año, con el propósito de medir los cambios en los productos de fermentación. No se obtuvieron cambios notorios en los perfiles de fermentación mayores al 10%, pues los patrones de fermentación mostrados en las Figuras 4 y 5 se observaron constantes en todos los procesos llevados a cabo bajo esas condiciones. Sin embargo, si se notaron cambios en la microflora del estiércol cuando se hicieron observaciones al microscopio, resultado que está de acuerdo con lo reportado por Grubbs y Dehority (1975), quienes demostraron que la composición microbiana del aparato digestivo de rumiantes varía de acuerdo con el tipo de ingesta y como consecuencia varía también la microflora de las excretas.

En las Figuras 4 y 5 se muestra la fermentación de la glucosa bajo condiciones controladas de pH. El pH en ambos casos fue de 6.5 con una variación no mayor de 0.1 y se observa en ambos perfiles que la producción máxima alcanzada en estas condiciones fue similar. Cabe anotar, sin embargo, que en presencia de peptona la producción máxima alcanzada se logra en la mitad de tiempo, respecto a la fuente inorgánica, aunque por otra parte no se observan cambios significativos en los tiempos de retardo. Esto se puede explicar fácilmente, pues se ha demostrado que la presencia de aminoácidos en un cultivo microbiano reduce considerablemente la fase de retardo de los microorganismos (Shida et al, 1975), por ende, la aparición de los metabolitos de fermentación aparecen primero aquí que en presencia de NI. Así mismo, se ha demostrado que la

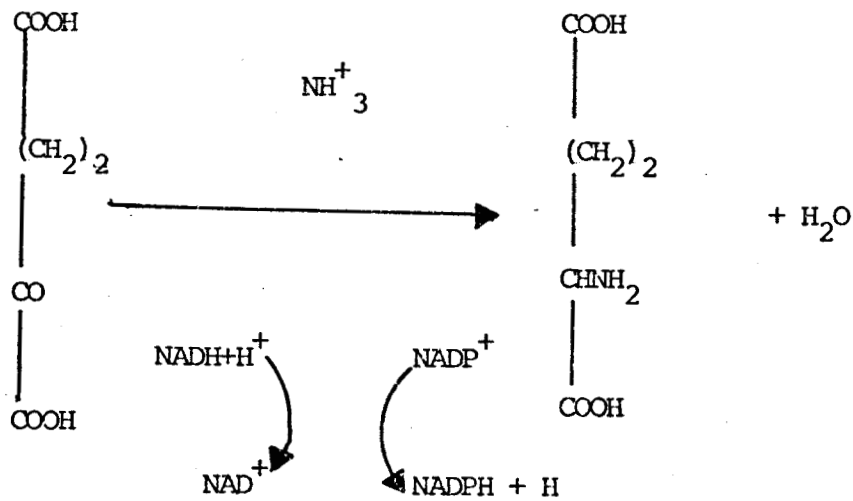
presencia de aminoácidos en el medio de cultivo incrementan la velocidad de crecimiento microbiano. De hecho, la formación del producto metabólico depende del crecimiento microbiano y por lo tanto, éste se formará cuando los microorganismos se multipliquen.

La concentración de etanol producida bajo estas condiciones, no fue muy importante, aunque en ambos casos (NL y NO) se observa la aparición de otros productos como el acetato, propionato y butirato, que en otras fermentaciones llevadas a cabo bajo las mismas condiciones, no se presentaron. De todas formas, como en el caso del etanol su presencia no fue considerable. La homogeneidad de resultados son sorprendentes dada la heterogeneidad y complejidad del inóculo y una explicación a esto resultó difícil ya que análisis de la composición microbiana tanto de rumen como de estiércol no reportan a las bacterias lácticas como la microflora predominante.

En las Figuras 4, 5 y 6 se puede observar una heterogeneidad en productos metabólicos que son resultados de una no regulación del pH. Neuberg y Hirsh (1919) y más tarde Neish y Blackwood (1951) y Gunsalus (1955), demostraron que el pH inicial tenía un efecto significativo en un proceso de fermentación con levadura del género Saccharomyces cerevisiae. Encontraron que dependiendo del valor inicial, el producto de fermentación variaba tanto cualitativa como cuantitativamente en cultivos axénicos de levaduras o de bacterias. En nuestro caso, utilizando un inóculo heterogéneo complejo se observó un resultado similar. Estos resultados indican que el valor de pH inicial determina cuantitativamente y cualitativamente la formación del producto metabólico en el proceso de fermentación. De hecho, estos resultados concuerdan con Seger et al (1981) y Pipyn y Verstraete (1981) quienes trabajando con cultivos no axénicos encontraron que la producción de etanol, lactato y otros productos fundamentalmente depende del pH.

Por otro lado, se observa también que el tipo de fuente nitrogenada in-

fluye de alguna manera en el proceso fermentativo. Ya se señaló que la adición de aminoácidos al medio de cultivo puede reducir la fase de retardo, sin embargo, puede influir también positivamente en la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Shida *et al*, 1975). Se pueden hacer algunas consideraciones adicionales, por ejemplo, se podría decir que el poder reductor necesario para la reducción de piruvato a lactato, aumenta en presencia de nitrógeno protéico, en cambio, en presencia de sulfato de amonio la disponibilidad de poder reductor, para la formación de lactato disminuye, ya que el $\text{NADH} + \text{H}^+$ formado se utilizará para la reducción de ácido glutárico y ácido glutámico, como puede verse en el siguiente esquema.



Lo anterior es en el supuesto de que la vía a través de la cual se forme el dinucleotido sea la de EMP, Figura 1, y no por medio de la vía de las fosfoacetolasas, pues aquí, además de que puede formarse $\text{NADPH} + \text{H}^+$, se formaría no solo lactato, sino también acetato o etanol más lactato, tal como se ilustra en las Figuras 2 y 3.

Es probable que esta hipótesis sea válida en cultivos axénicos pero para cultivos complejos no es del todo consistente, pues en si se obser-

van las Figuras 4 y 5 se puede apreciar que se produce ácido láctico, tanto con NI como con NO, en donde la magnitud de la concentración del metabolito es muy similar. Además, en la Figura 7 se observa que aún en presencia de peptona, se produce etanol, en donde este metabolito representa cerca del 40% de los metabolitos producidos, resultado que va en contrario con la hipótesis de que cuando el medio de cultivo contiene proteína no se forma el alcohol etílico ni acetato, es decir, se produce una fermentación homoláctica. Nuevamente, el pH juega un papel bioquímico muy importante .

Existen revisiones detalladas (Buchanan y Gibbon, 1974) de las bacterias lácticas y en todas se pueden apreciar que éstas requieren de una fuente nitrogenada protéica para su crecimiento, excepto Streptococcus bovis (se debe aclarar que este microorganismo no es el único responsable del proceso fermentativo en este caso, ya que como se indicó antes, en las observaciones al microscopio se pudo apreciar una microflora muy variada). Nuevamente, ésto es cierto para cultivos axénicos, sin embargo, en cultivos heterogéneos, según se observa en la Fig. 5, ésta no es una restricción que limite la fermentación láctica o bien, el crecimiento celular, aunque si se evidencia un efecto cinético. Existen reportes en ecología microbiana que podrían arrojar alguna luz y pudieran explicar estos resultados, es decir, tratan de dar una explicación a través de las interacciones que se presentan entre los diferentes grupos bacterianos y llenando de esta forma sus deficiencias nutricionales. Más tarde se volverá a hablar de ésto.

No se debe olvidar el efecto del pH en el proceso fermentativo que, desde el punto de vista bioquímico y termodinámico, juega un papel muy importante y que podría verse acentuado este efecto de pH por la influencia de la fuente nitrogenada. Se sabe por ejemplo, que algunos microor-

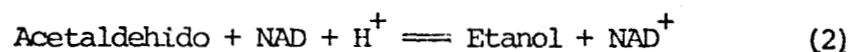
ganismos tienen respuestas diferentes a pH, a saber se ha observado que Klebsiella aerogenes, en medios de cultivo con peptona, a valores de pH alcalinos desamina la proteína y que a pH ácido la descarboxila con el objeto de amortiguar el efecto de un pH desfavorable. No hay datos en la literatura que describan este mismo efecto en cultivos heterogéneos y que estén relacionados con procesos fermentativos.

Por otro lado los estudios bioquímicos in vitro y los termodinámicos para el sistema de la deshidrogenasa alcohólica y deshidrogenasa láctica también han demostrado que, las variaciones del pH, inducen cambios en la estructura terciaria de las enzimas, aunque estos cambios se producen a valores extremos del pH óptimo de las deshidrogenasas. En el caso que aquí se trata no se tienen valores de pH extremo para el conjunto microbiano localizado en el inóculo, aunque el efecto desde el punto de vista enzimático podría ser diferente (Wittinberger y Angelo, 1970), por lo que se puede intentar una explicación fisicoquímica. Para tal propósito se debe partir del equilibrio químico que se establece en el sistema compuesto por las coenzimas de la deshidrogenasa láctica o alcohólica, a saber:



$$\Delta G^\circ = -6.0 \text{ Kcal/mol a pH 6.5}$$

para la fermentación láctica y



$$\Delta G^\circ = -5.15 \text{ Kcal/mol a pH 4.5}$$

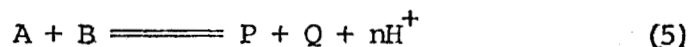
para la fermentación alcohólica de modo que en el equilibrio se puedan establecer las ecuaciones:

$$K_{eq} = \frac{(\text{Lac})}{(\text{Pir})(\text{H}^+)} \quad (3)$$

$$K_{eq} = \frac{(\text{Etanol})(\text{NAD}^+)}{(\text{Acetaldehido})(\text{NADH})(\text{H}^+)} \quad (4)$$

Los valores de las constantes de las ecuaciones 3 y 4 pueden establecerse de las reacciones 1 y 2 a partir de lo reportado en la literatura y puede observarse que serán menores que cero dado que los cambios de ΔG° son negativos, indicándonos la espontaneidad del proceso y que la reacción procede hacia el lado derecho.

Por otra parte, la reacción 1 se puede plantear en forma más general



y en el equilibrio la energía quedaría

$$\Delta G = - \frac{RT}{(A)(B)} \frac{(P)(Q)(H^+)^n}{(A)(B)} \quad (6)$$

que haciendo los arreglos suficientes se puede llegar a

$$\Delta G^{\circ''} = -RT \ln \frac{(P)(Q)}{(A)(B)} \quad (7)$$

$$\text{finalmente } \Delta G^{\circ'} = \Delta G^{\circ''} - RT \ln (H^+)^n \quad (8)$$

que ajustada para los cambios de pH vendría a ser

$$\Delta G^{\circ} = \Delta G^{\circ'} - RT \ln \Delta(\text{pH})$$

ecuación que, en forma general, permite establecer la dependencia del sistema en términos de las variaciones del pH.

Las consideraciones anteriores, aunque ciertas para sistemas enzimáticos bien definidos, no han podido ser demostradas dentro del sistema celular citoplasmático fundamentalmente debido a que una célula es una estructura muy compleja, compuesta por muchos sistemas enzimáticos y no por uno solo. Así mismo, se reconoce que el pH ambiental es diferente al pH intracelular aunque es difícil explicar la dependencia de la célula al pH exterior. Esta dependencia metabólica se aprecia en las Figuras 7, 8 y 9, en donde se puede observar el efecto del

pH, tanto del regulado mecánicamente (pH-stat) como mediante amortiguadores químicos. En la Figura 9 se ve que la fermentación láctica con sulfato de amonio, a valores de pH ácidos tiende a reducirse. En la Figura 8, el patrón fermentativo, con la misma fuente nitrogenada, sal de amonio, se vuelve a observar la misma tendencia, es decir, que la fermentación láctica es la principal forma de respirar, en tanto que a valores francamente ácidos, la fermentación alcohólica es la forma predominante. En la Figura 9, fermentación con peptona, se observa algo similar, sin embargo, respecto a la fuente nitrogenada se observan diferencias en la magnitud de la concentración de los metabolitos producidos. Así se aprecia que el etanol se produce más en presencia de amonio que con peptona. Estos resultados evidencian un efecto nutricional de la fuente nitrogenada, sin embargo, dar una explicación bioquímica acerca de la dependencia de las deshidrogenasas láctica o alcohólica es difícil ya que se sabe que estas enzimas tienen una dependencia de factores vitamínicos (nicotinamida) pero no se ha reportado que para su financiamiento sea necesario la presencia de aminoácidos.

Por otra parte, no hay una diferencia marcadamente significativa de concentraciones entre la fermentación amortiguada mecánicamente y químicamente, lo cual plantea la posibilidad de producir a cualquiera de los metabolitos mediante un proceso más simple que el de estar regulando la fermentación con equipo sofisticado, aunque se debe señalar que la amortiguación de la fermentación con sustancias químicas no fue total, ya que hubo cambios, pero no modificó sustancialmente el patrón fermentativo, ya que el tipo de productos producidos así como la magnitud de la fermentación es casi constante, pues la suma total de los metabolitos es aproximadamente la misma. Estudios económicos y de mercado

podrían dar indicaciones en el sentido de que camino seguir. Así mismo, estos resultados son muy alentadores ya que permite demostrar la manejabilidad de inóculos heterogéneos y su aplicación en otros procesos, tales como la producción de alimentos o en el tratamiento de contaminantes o procesos de descontaminación.

De la Torre y Gomá (1981), Pipyn y Verstraete (1981), encuentran que la fermentación con cultivos no axénicos (aguas negras) depende fuertemente del valor del pH inicial y de su control. En las Figuras 10, 11 y 12 se observa que el inóculo empleado (estiércol de bovino) también tiene esa dependencia, ya que el patrón fermentativo heterogéneo es similar, tanto a valores de pH diferentes como con fuentes nitrogenadas diferentes. Se nota una notable diferencia entre, por ejemplo, los perfiles observados en las Figuras 3, 4, 8 y 9 respecto a los mostrados en las Figuras 10, 11 y 12, donde en las primeras se lleva un control del pH, y en las otras se deja evolucionar sin ningún control, además de la diversidad de productos se aprecian cambios cinéticos, ya que el proceso fermentativo se hace más lento y todo esto es como consecuencia de la no regulación del pH. De los resultados mencionados, la no regulación del pH, se aprecia que el producto principal es el alcohol etílico, adicionalmente se observó que el valor final de pH en todos los casos fue de 3.4, que es francamente ácido. Este último resultado de fuerte acidez, probablemente explica que el etanol sea el producto metabólico principal, pues existen evidencias experimentales de que a pH ácidos, empleando inóculos heterogéneos, se produce este metabolito y parece ser que esta conducta es independiente del tipo de fuente carbonada o nitrogenada (Seeger, et al, 1981). Parece ser que la eficiencia fermentativa no cambia a pesar de la reducción del pH a valores ácidos. En general, los resultados anteriores no concuerdan del to-

do con lo reportado por Roger y Whitter (1931) y Wang et al (1980), quienes señalan que los ácidos no disociados inhiben la fermentación (el pKa de ácidos carboxílicos está alrededor de 5), pues si se observa, la suma de los metabolitos producidos en todas las fermentaciones, es muy parecida. Este criterio se extiende también a productos metabólicos no disociables y se habla, en términos genéricos, de inhibición por producto final. Por último, aunque la producción del etanol coincide con el valor de pH ácido, considerado como el valor normal, no sucede la misma para la formación del ácido láctico puesto que éste se sale de lo previsto, ya que existen reportes (Wittinberger y Angelo, 1970) que indican que a valores de pH mayores a la neutralidad, la fermentación láctica se abate y en lo que aquí se reporta, la mayor formación se alcanza a valores francamente alcalinos (Fig. 8 y 9). Esto abre la posibilidad de que la vía metabólica involucrada sea precisamente la EMP utilizada para oxidar el azúcar, pues es aquí donde se forma FDP, y este actúa como estimulador de deshidrogenasas en valores de pH próximos a 6 pero, por otra parte, es francamente inhibido este efecto a pH alcalino. Esta contradicción es difícil de explicar debido, nuevamente, a la heterogeneidad del cultivo.

Efecto de Temperatura y Fuente Nitrogenada.

En los perfiles de temperatura mostrados en la Fig. 13 se aprecia que, independientemente del tipo de fuente nitrogenada, la producción máxima se alcanza a 37°C. Así mismo, se observan diferencias marcadas entre un perfil y otro como, por ejemplo, la magnitud de la concentración del lactato producido en presencia de proteína (pH 8.5) es mayor que con la fuente nitrogenada inorgánica (pH 7.5), además el abatimiento

to de la fermentación láctica en presencia de peptona es mínima en una amplia región de temperatura (30-55°C), en tanto que cuando es sulfato de amonio la fuente nitrogenada se presenta una caída brusca de la fermentación. Lo anterior podría ser explicado desde el punto de vista nutricional y genético y partiendo del supuesto de que sean las bacterias lácticas la microflora predominante. Así, se sabe que las bacterias lácticas tienen una nutrición compleja en cultivo axénico (Buchanan y Gibbon, 1974). Adicionalmente se ha demostrado que la temperatura es un factor mutagénico (Watanabe et al, 1976). Por otra parte, Zeikus, et al (1970) y Zeikus (1979) señalaron que en cultivos axénicos, la complejidad nutricional se incrementa cuando la temperatura se eleva. Partiendo de estas evidencias, los perfiles mostrados en la Fig. 13, podrían ser aclarados, es decir, que en presencia de amonio y a temperaturas altas, debido a probables alteraciones genéticas y en consecuencia nutricional, se presen
tó una caída brusca de la fermentación, pues en el caso de sulfato de amonio no se cuenta con aminoácidos que amortigüen el efecto mutanogéni
co de la temperatura.

Desde el punto de vista práctico éstos resultados son interesantes, pues si se deseara producir industrialmente este metabolito, se puede tener la certeza de eliminar las bacterias patógenas (que crecen a temperaturas mesofílicas, preferentemente) o bien, si se quisiera producir alimen
tos balanceados (ensilados), la formación de hongos se vería nulificada (éstos crecen a temperaturas psicrófilicas). En este trabajo solo se ana
lizaron los cambios metabólicos como consecuencia de los cambios ambien
ta les, de modo que no se estudió el efecto producido en el crecimiento ce
lular ni los cambios producidos en la composición celular, que son muy de
pendientes de la temperatura, por ejemplo, se sabe que las membranas cito

plasmáticas cambian tanto cuantitativa como cualitativamente a diferentes temperaturas; también se ha demostrado que la composición cualitativa de las enzimas cambia.

En fin, dado que en este trabajo se observan diferencias metabólicas respecto a las reportadas, es probable entonces que se esté hablando de nuevas perspectivas en la fisiología y bioquímica bacteriana, básicas, pero de conjuntos microbianos complejos y no de los tradicionales cultivos axénicos.

Efecto de los Factores de crecimiento y la Fuente Nitrogenada.

Actualmente, se sabe que Streptococcus bovis es la única bacteria láctica que puede crecer en sulfato de amonio como fuente nitrogenada (Niven et al, 1948), pero los demás microorganismos lácticos requieren de medios de cultivo más complejos; todos invariablemente, requieren de vitaminas. En la Figura 14 (I y II), se observa que no es indispensable la presencia de vitaminas, pero se nota un marcado efecto, tanto cinético como en la productividad de los metabolitos, cuando la fuente nitrogenada es sulfato de amonio (III y IV). Existen reportes en el sentido de que, entre las bacterias de un mismo género, existen sistemas de cooperación (algunos señalan la recombinación como el principal) que hacen que bacterias de nutrición compleja puedan crecer en medios simples (Numikko, 1954; Bryant y Robinson, 1962). Se supone también otro tipo de cooperación por ejemplo, se dice que en cultivo mixto una bacteria autotrofa de algún aminoácido puede obtenerlo de otra, en el mismo cultivo, y a su vez otra obtiene otra nutriente para su propio crecimiento, es decir, se habla de probables simbiosis. Se dice también que pueden establecerse otro tipo de asociaciones como el comensalismo o mutualismo, etc. En cualquier caso, las evidencias encontradas que expliquen estos eventos son muy escasas y son mera-

mente especulativas, lo cual establece la necesidad de ahondar más en el estudio de las interrelaciones en cultivos mixtos complejos (probablemente primero con cultivos mixtos complejos gnotobióticos y luego en no gnotobióticos no axénicos).

Este tipo de evidencias y supuestos pueden dar una explicación parcial a los resultados mostrados en la Fig. 14, ya que si no se adicionan las vitaminas en la fermentación con nitrógeno inorgánico es prácticamente nula la formación de lactato, sin embargo, esto no reduce la posibilidad de producir lactato mediante este tipo de cultivo, ya que los métodos comunes adicionan tanto proteína como vitaminas al medio de cultivo, sin contar con que emplean cultivos axénicos y condiciones estériles que, a lo largo de este trabajo no fueron empleadas, lo cual desde el punto de vista económico (costo de energía y conservación) resulta muy atractivo.

Finalmente, se debe dejar asentada la importancia de seguir el estudio tanto bioquímico - fisiológico como cinético ya que las explicaciones en este momento, para este cultivo se están quedando en el terreno especulativo. Además del interés básico que tienen, su estudio es importante desde el punto de vista económico (y también social en forma muy importante) y es, en este sentido, necesario que se hagan estudios cinéticos que permitan pronosticar y establecer alternativas en las formas de producción de metabolitos de valor económico (como el etanol, acetato, lactato, etc.), por ejemplo, no se sabe cual es el efecto bioquímico y cinético producido al cambiar la concentración del azúcar, de la fuente nitrogenada, del tamaño del inóculo (Christensen et al, 1958, reporta cambios en los perfiles de fermentación cuando se cambia la concentración de azúcar), etc. En fin, se pueden seguir enumerando otras aplicaciones, pero hasta solo señalar una muy importante, la producción de alimentos

tanto de uso pecuario como los de consumo humano, en donde el uso de los microorganismos es cada vez más frecuente y en donde la aplicación de los cultivos mixtos y complejos abren una posibilidad muy valiosa que es necesario explorar a corto plazo.

CONCLUSIONES

- 1) La fermentación alcohólica es espontánea y sin regulación del pH a valores de pH ácido sin importar el tipo de fuente nitrogenada.
- 2) La fermentación homoláctica es posible a pH cercanos a la neutralidad sólo si se controla el pH (mecánicamente con amortiguadores).
- 3) La fermentación es láctica a pH constante cercano a la neutralidad y es independiente del tipo de fuente nitrogenada.
- 4) La fermentación láctica está determinada por el tipo de fuente nitrogenada a temperaturas altas a pH próximo a la neutralidad.
- 5) La fermentación es láctica a temperaturas termofílicas sólo en presencia de proteínas.
- 6) La fermentación láctica a pH próximo a la neutralidad y 37°C depende de los factores de crecimiento si la fuente nitrogenada es inorgánica y es independiente de esos factores cuando la fuente es proteína.

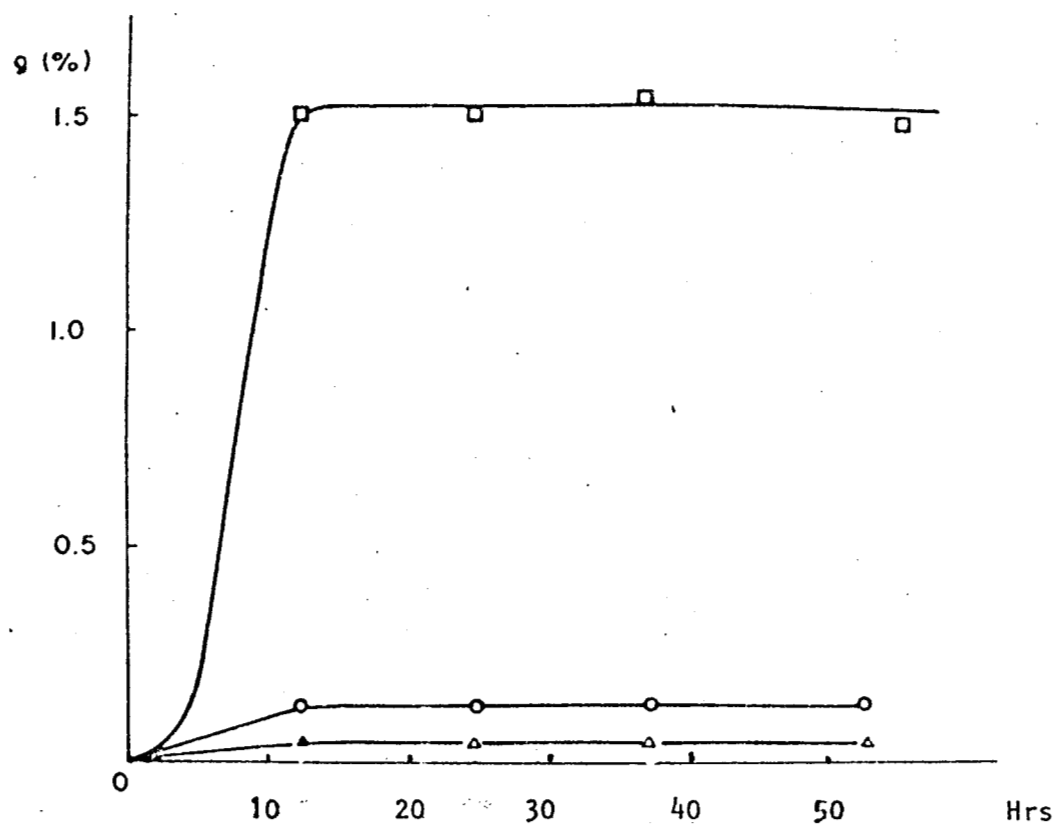


Fig. 4 Patrón de fermentación con glucosa y peptona. La temperatura fue de 37°C. El pH de 6.5 se mantuvo constante durante la fermentación. (□) ácido láctico; (○) ácido acético; (△) etanol.

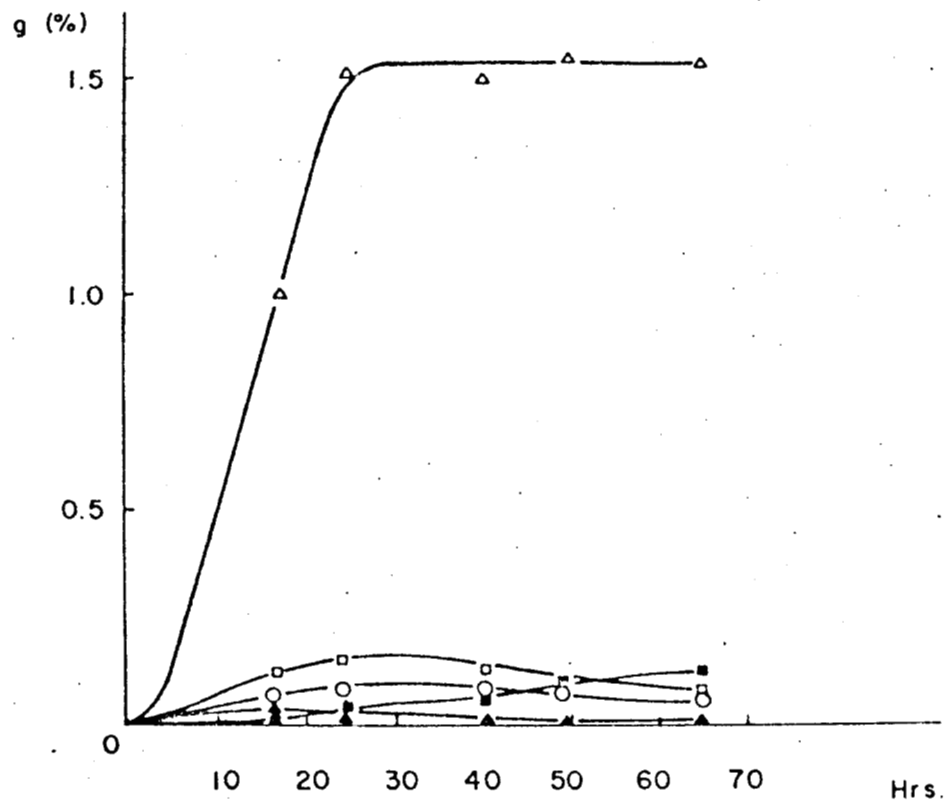


Fig. 5 La fermentación de la glucosa se llevó a cabo a pH de 6.5 y permaneció constante durante todo el tiempo. La temperatura fue 37°C. La fuente nitrogenada fue sulfato de amonio. (Δ) ácido láctico; (□) etanol, - (○) ácido acético; (▲) ácido propiónico; (■) ácido butírico.

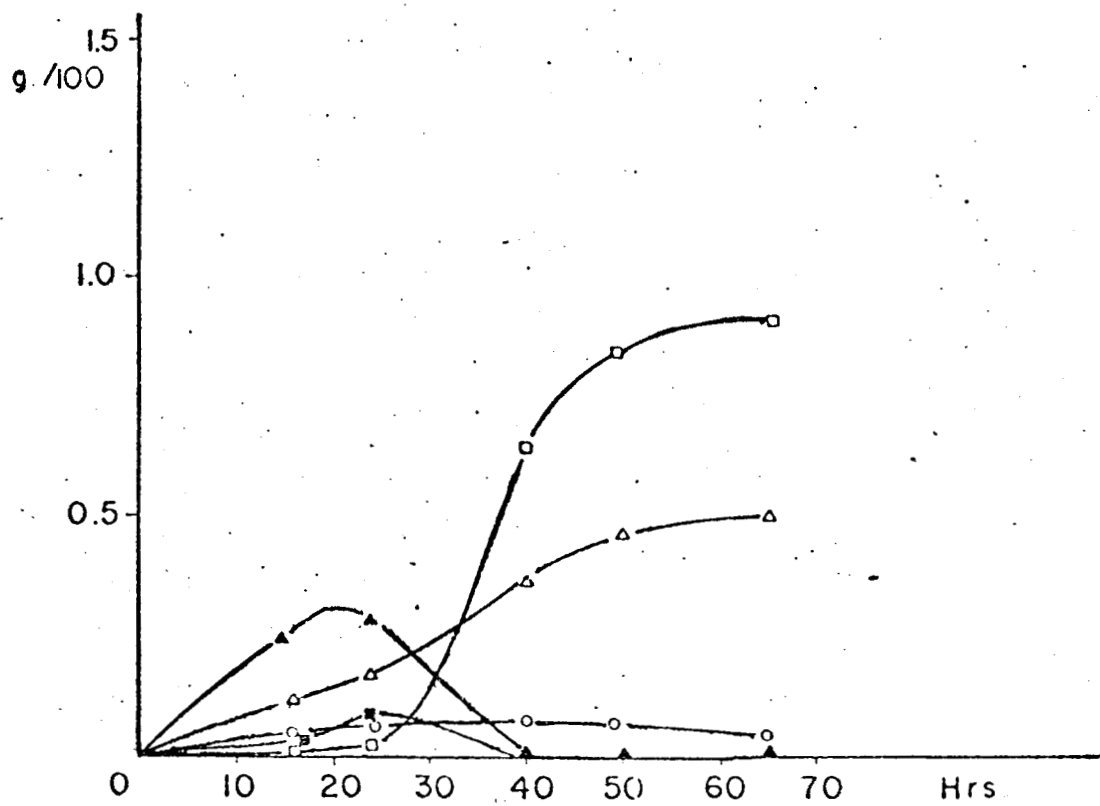


Fig. 10 Perfil de producción de metabolitos por fermentación a partir de glucosa. El pH inicial fué de 6.5 con sulfato de amonio. La temperatura se mantuvo constante a 37°C. (Δ) ácido láctico; (□) etanol; (○) ácido acético; (▲) ácido propiónico; (■) ácido butírico.

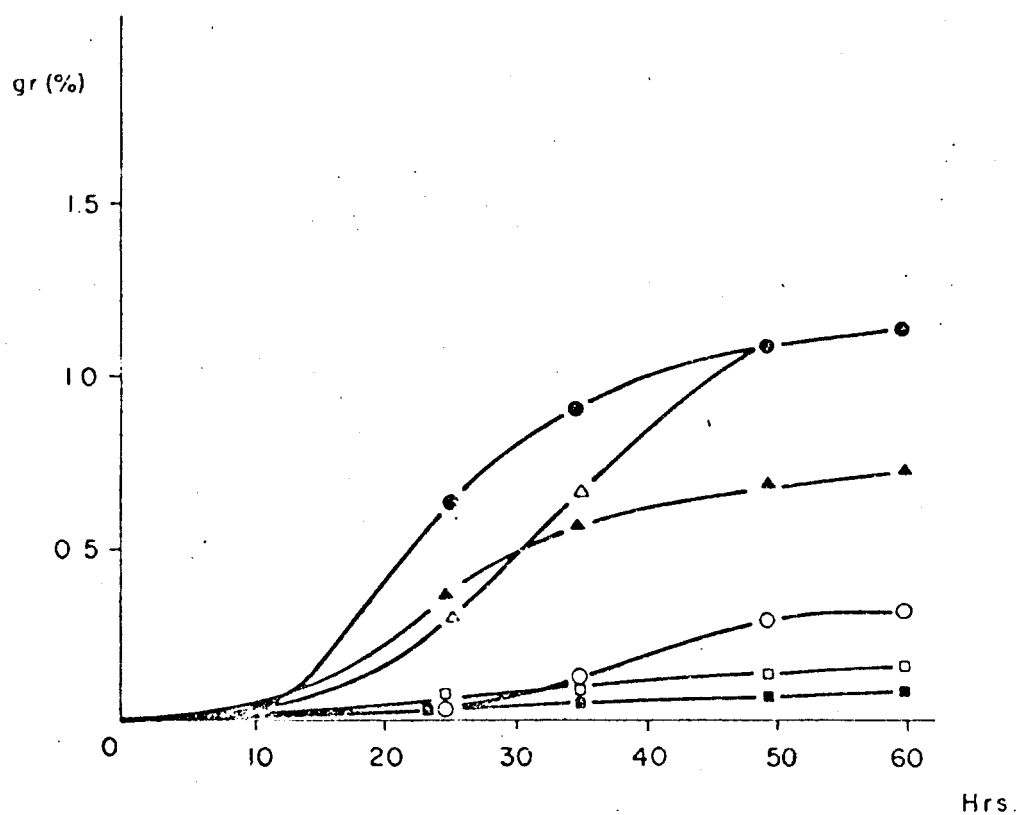


Fig. 6 La fermentación se llevó a cabo a pH de 4.5 constante. La temperatura fue 37°C. Las figuras geométricas llenas son con peptona, las vacías representan al sulfato de amonio. (△ ▲) etanol; (○ ●) ácido láctico, - (□ ■) ácido acético.

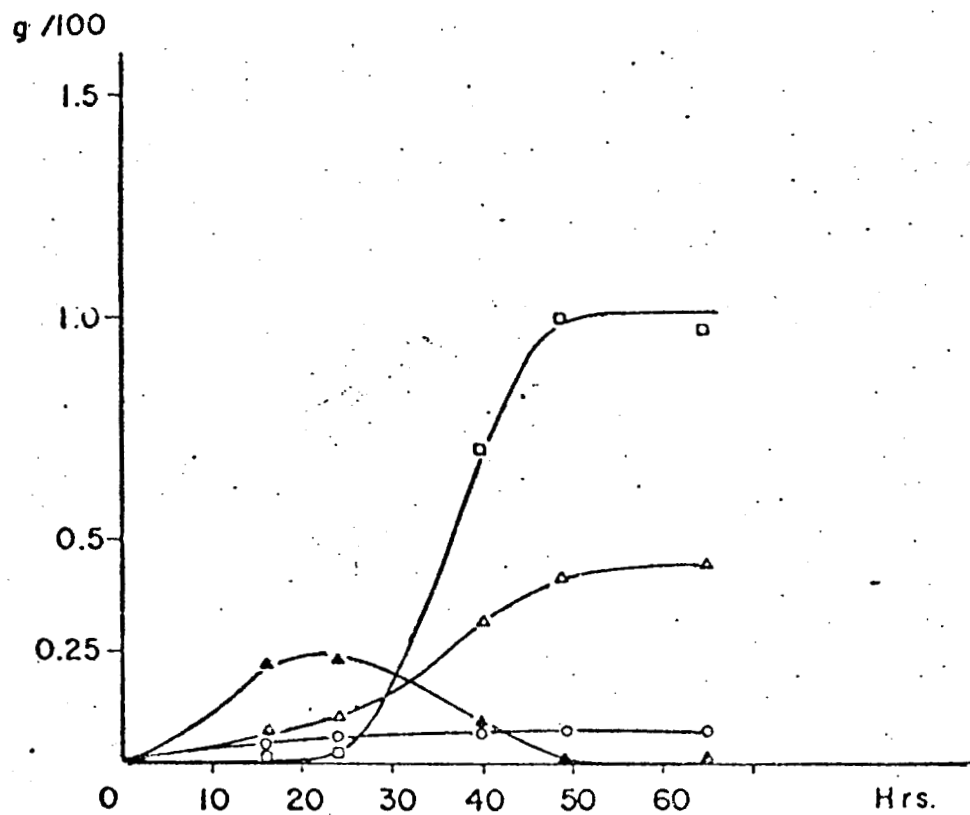


Fig. 11 Fermentación de glucosa a pH inicial 4.5 empleando sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. La temperatura se mantuvo a 37°C. (Δ) ácido láctico; (\square) etanol, (\circ) ácido acético.

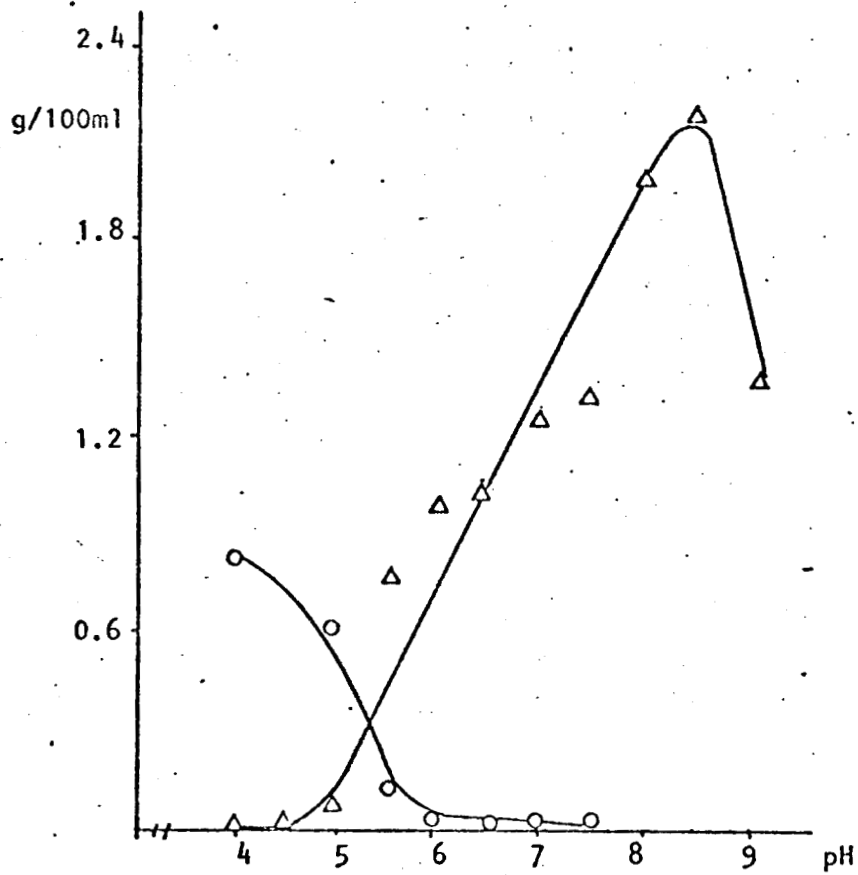


Fig. 9 Perfil de fermentación a diferentes valores de pH a 37°C. La fuente nitrogenada es peptona. Cada punto se tomó a las 35 hrs. El pH se reguló con amortiguadores diferentes. (Δ) ácido láctico; (○) etanol.

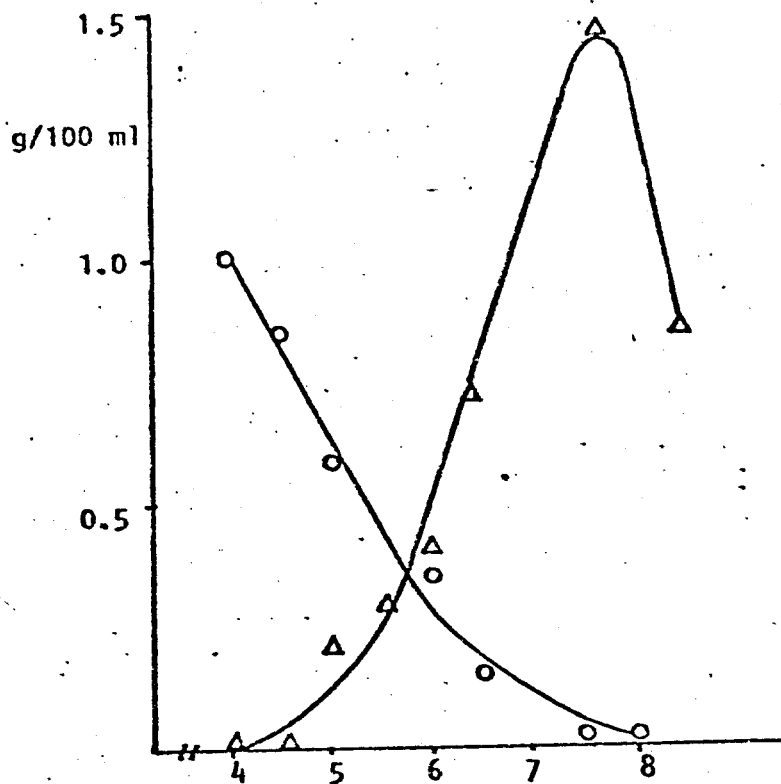


Fig. 8 Fermentación de la glucosa a diferentes valores de pH amortiguados con diferentes compuestos químicos. La temperatura fué de 37°C. La fuente nitrogenada fué sulfato de amonio. Los puntos corresponden a 38 hrs. (Δ) ácido láctico; (O) etanol.

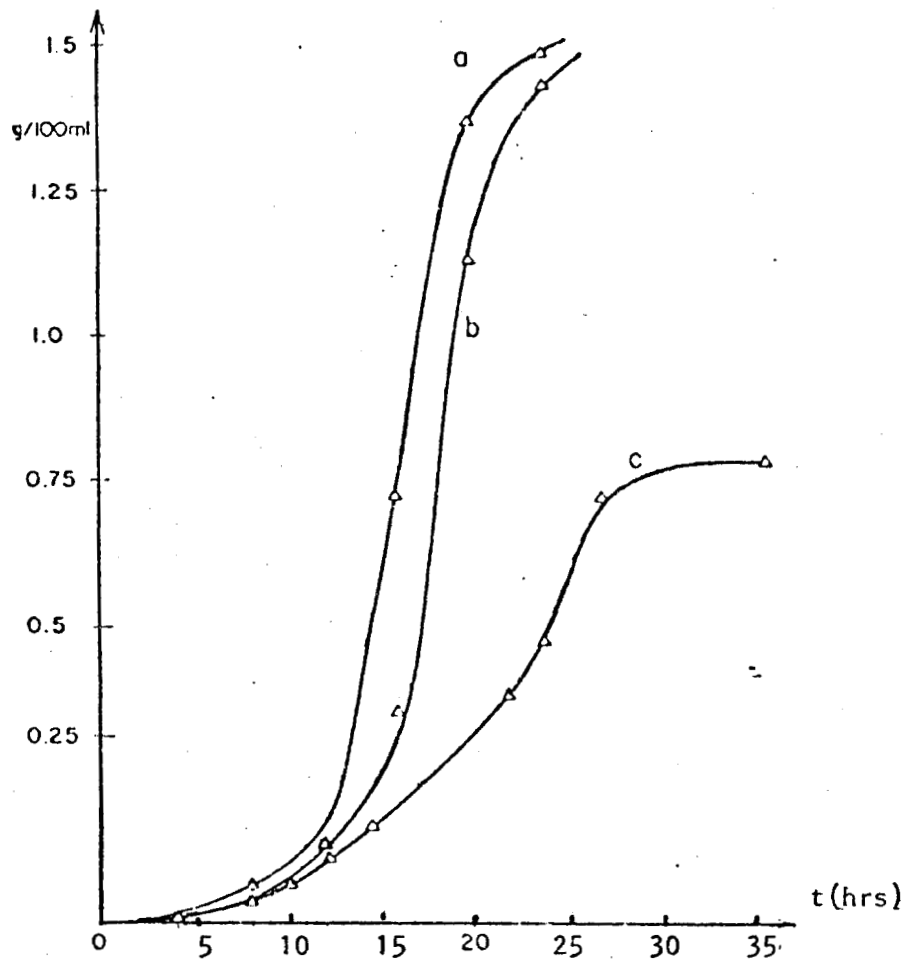


Fig. 7 Fermentación láctica a diferentes valores de pH. El pH se mantuvo constante. La fuente nitrogenada utilizada fué sulfato de amonio. La temperatura fué 37°C. Los valores de pH fuéron: (a) 7.5; (b) 6.5; (c) 5.5

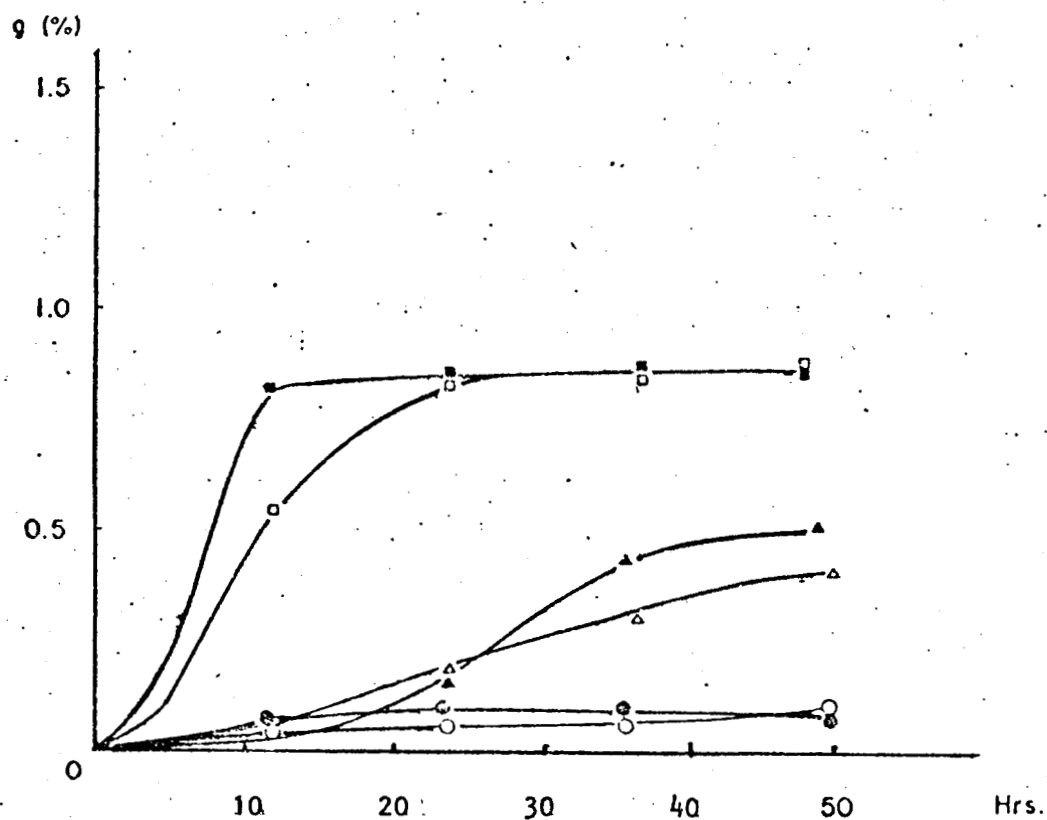


Fig. 12 Fermentación de la glucosa sin amortiguamiento del pH. El valor inicial del pH fué de 4.5 representado por las figuras blancas; las figuras oscuras representan el valor de pH inicial de 6.5. (Δ) ácido láctico; (\square) etanol; (\circ) ácido acético. Se empleó peptona como fuente nitrogenada.

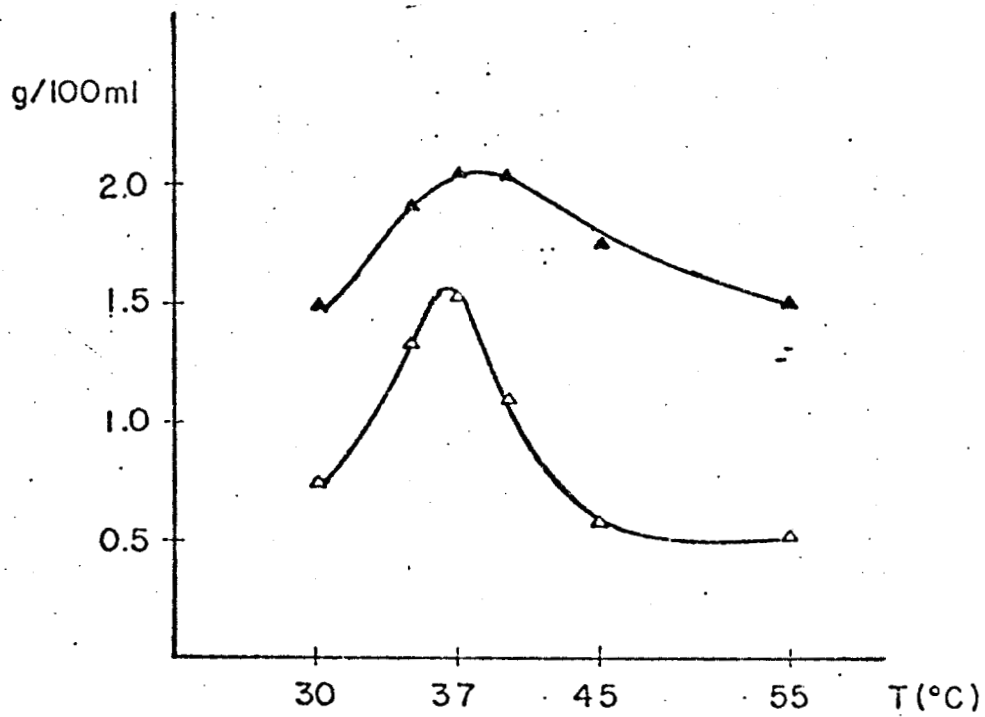


Fig. 13 Fermentación láctica a diferentes temperaturas. Los puntos corresponden a 30 hr. de fermentación. (\blacktriangle) peptona a pH de 8.5; (\triangle) sulfato de amonio o pH de 7.5.

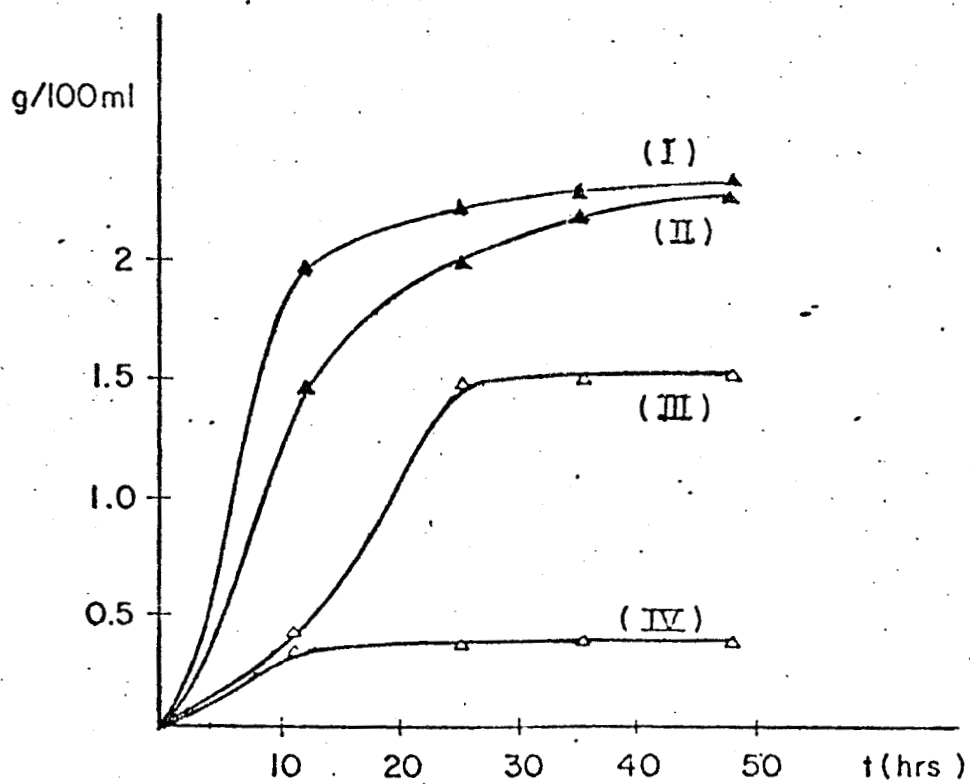


Fig. 14 Fermentación láctica en presencia y ausencia de factores de crecimiento (FC). El pH fué de 7.5. La temperatura fué de 37°C. (▲) peptona; (△) sulfato de amonio. I y III fuéron adicionados de FC; II y IV no fuéron suplementados con FC.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, R., Pacheco, V., Pérez-Gavilan, J.P.E., Pouso, J. y Viniestra-González (1979). Sustitución de maíz por biofermel (melaza, estiércol pre-fermentados) en dieta de bovinos. *Rev. Cubana Cienc. Agric.*, 13, 83.
- Antony, W.B. (1968). A new concepto in cattle feeding. *J. Animal Sci.*, 27, 289.
- Antony, W.B. (1971). Animal waste value nutrient recovery and utilization. *J. Animal Sci.* 32, 799.
- Bhattacharya, A.N. Taylor, J.C. (1975). Recycling animal waste as a feedstuff. A. review. *J. Anim. Sci.* 41, 1438.
- Brown, W.V. and Collins, E.B. (1977). End products and fermentation balances for lactic streptococci grown aerobically on low concentrations of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 38.
- Buchanan, R.E. and Gibbon, N.E. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. pp 501-568. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Buyze, G. van de Hamer, C.J.A. and Hoan, P.G. (1957). Correlation between hexose monophosphate shunt glycolitic system, and fermentation type in lactobacilli. *J. Microbiol. Errol.* 23, 345.
- Cardon, B.P. and Barker, H.A. (1947). Aminoacid fermentation by *Clostridium propionicum* and *Diplococcus glycinophilus*. *Arch. Biochem.* 12, 165.
- Casida, L.E. (1968). *Industrial Microbiology*, John Wiley, pp 304-314, New York.
- Christensen, M.D., Albury, M.N. and Peterson, C.S. (1958). Variation in the acetic-lactic acid ratio among the lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol.*, 41, 1.
- Cogan, T.M. (1975). Citrate utilization in milk by *Leuconostoc cremoris* and streptococcus diacetylactis. *J. Dairy Res.* 42, 139.
- Cogan, T.M., O'dowd, M., and Mellerick, D. (1981). Effect of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 1.
- Cooney, C.C. and Wise, D.L. (1975). Thermophilic anaerobic digestion of solid waste for fuel gas production. *Biotechnol. Bioeng.* 17, 1119.
- Cordon, T.C. Treadway, R.H. Walsh, M.D. and Osborne, M.F. (1950). Lactic acid from potatoes. *Ind. Eng. Chem.*, 42, 1833.
- Cravioto, D.F., Cravioto, Y. W., Massieu, H.G. y Guzman, G.J. (1955). El pozol forma indígena de consumir maíz en el sureste de Méjico y su aporte de nutrientes en la dieta. *Ciencia*, 15, 27.

Deley, J. (1962). Comparative biochemistry and enzymology in bacterial Classification. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 12, 190.

Dirar, H. And Collins, E.B. (1973). Aerobic utilization of low - concentrations of galactose by Lactobacillus platarum J. Gen. Microbiol. 78, 211.

Doelle, H.W. (1971). Nicotine adinine dinucleotide-dependent and nicocotine adenine dinucleotide-independent lactate dehydro genase - in homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria J. - Bacteriol. 108, 1284.

Doelle, H.W. (1975). Bacterial Metabolism. 2nd edition pp. 244 - 250 y 622-646, Academic Press, N.Y.

Driessen, P.M. Ubbels, J. And Stadhouders, J. (1977). Continuous manufacture of yogurt: 1 Optimal conditions and Kinetics of the fermentation process. Biotech. Bioeng., 19, 821-840.

Driessen, F.M., Ubbels, J. and Stadhouders, J. (1977). Continuous manufacture of yogurt. II. Procedure and apparatus for continuous - coagulations. Biotech. Bioeng. 19, 841.

Eilerman, C.J.M., Pandit-Huvenikamp, H.G. and Kilj, A.J.H. (1970). Oxidative phosphorylation in Azotobacter vinelandii partinckles. Phosphorylation sites and respiratory control. Biochem. Biophys. Acta 197, 25.

Fidelds, M.C. Ahmed, M.N. and Duane, S.K. (1981). Natural lactic acid fermentation of corn meal. J. Food Sci., 46, 900.

Gibbs, M. Dumrose, R. Bennett, F.A. and Bubeck, M.R. (1950). On the mechanism of bacterial fermentation to lactic acid studied With 14 C-glucose. J. Biol. Chem. 184, 545.

Gómez, J. and Viniegra-González, G. (1981). Orientation of sugar fermentation inoculated With heterogeneous microbial population. Adv. Biotechnol. 2, 627.

Gonzalus, S.C. and Niven, C.F. (1942). The effect of pH on the lactic acid fermentation. J. Biol. Chem. 145, 131.

Grubbs, J.A. and Dehoroty, B.A. (1975). Effect of an abrupt - change in ration from all roughage to high concentrate upon rumen microbial number in sheep. Appl. Microbiol. 30, 1975.

Hanson, T.P. and Tsao, G.T. (1972). Kinetics studies of the lactic acid fermentation in batch and continuous cultures. Biotech. - Bioeng., 14, 233.

Herrera, T. y Ulloa, M. (1970). Aspectos generales sobre la microbiología del pozol. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 12, 103.

Hesseltine, C.W. (1979). Important fermented foods of Mid-Asia, the Middle-East and Africa. J. Amer. Oil Chem. Soc. 56, 367.

- Inskeep, G.C., Taylor, G.G. and Breitzke, W.C. (1956). Lactic acid from corn sugar. *Ind. Eng. Chem.* 44, 1955.
- Jones, R.P. and Greenfield, P.F. (1981). Batch ethanol production with dual organism. *Biotech. Letters*, 13, 225.
- Jones, A.T.J. (1952). The mechanism of propionic acid formation by Veillonella gazogenes. *J. Gen. Microbiol.* 5, 326.
- Kithahara, K. and Obayashi, A. (1955). D.L. forming lactic acid bacteria *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1, 237.
- Kopeloff, L.M., Kopeloff, N., Etchells, J.C. and Possett, E. -- (1937) Optical activity of lactic acid produced by Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus. *J. Bacteriol.* 33, 89.
- Kruger, K.K. and Peterson, W.H. (1948). The nutritional requirement of Lactobacillus pentosus. *J. Bacteriol.* 55, 683.
- Ladd, J.N. and Walker, D.J. (1959). The fermentation of lactate anacrylate by the rumen microorganism LC. *Biochem J.* 71, 364.
- Latham, M.J., Sharpe, E.M. and Shutton, J.D. (1971). The microbial flora of the rumen of cows fed hay and high cereal rations - and its relationship to the rumen fermentation. *Appl. Bacteriol.* 34, 425.
- Leonard, R.J., Peterson, W.H. and Johnson M.J. (1948). Lactic acid from fermentation of sulphate wasteliquor. *Ind. Eng. Chem.*, 40, 51.
- Lin, E.C.C., Levin, A.P. and Magasanik, S. (1960). The effect of aerobic metabolism on the inducible glycerol dehydrogenase of Aerobacter aerogenes *J. Biol. Chem.* 235, 1824.
- London, J. (1968). Regulation and Function of lactate oxidation in Streptococcus faecium. *J. Bacteriol.* 95, 1380.
- MacBeam, R.D. (1974). The production of yoghurt by continuous fermentation Ph. D. Thesis, University of New South Wales, U.K.
- MacPhedram, P. Sommer, B. And Lin, E.C.C. (1961). Control of ethanol dehydrogenasa levels in Aerobacter aerogenes. *J. Bacteriol.* 81, 852.
- Marty, R. J. and Demeyer, D.I. (1973). The effect of inhibitor of methane production for mutation pattern and stoichiometry invitro using rumen contents from sheep given molasses. *Brit. J. Nutr.* 30, 369.
- Metchikoff, E. (1907). The prolongation of the life Heinemann, London.
- Needle, H.C. and Aries, R.S. (1949). Lactic acid and lactates, Sugar, December, p 32.

Neish A.C. and Blackwood, A.C. Dissimilation of glucose by yeast at poised hydrogen concentrations, *Can. J. Tech.* 29, 123.

Newberg, C. and Hirsch, E. (1919). Alcoholic fermentation in an alkaline medium, II Fermentation with Living yeast in an alkaline medium. *Biochem. Z.* 96, 175.

Niven, C.F. Washburn, M.R. and Sherman, J.M. (1946). Folic acid requirements of the minute streptococci. *J. Bacteriol.* 51, 128.

Niven, C.F. Jr., Washburn, M.R. and White, J.C. (1948). nutrition of *Streptococcus bovis*. *J. Bacteriol.* 55, 601.

Nurmikko, V. (1956), Biochemical factors affecting symbiosis - - among bacteria. *Experientia*, 7, 245.

Orla-Jensen, S. Otte, N.C. and Snog Kjaer, A. (1936) the vitamin and nitrogen requirements of the lactic acid bacteria.

Pérez-Gavilan, E.J.P. Cardoso M. and Viniegra-González, G. (1976). Ecological Constraint of anaerobic fermentation of cane molasses with rumen inoculum. *Cuban J. Agric. Sci.*, 10, 63.

Pérez-Gavilan, J.P.E. y Viniegra-González, G. (1976). Potencial del uso del estiércol en la alimentación de los bovinos. *Ciencia Vet.* 2, 241.

Pette, J.W. and Lolkema, J. (1951). Yoghurt, V. Firmness and whey separation of milk yoghurt. *Neth. Milk Dairy J.* 5, 27.

Pipyn, P. and Verstraete, W. (1981). Lactate and ethanol as intermediates in two-phase anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1145.

Pohland, F.G. and Ghosh, S. (1977). *Biotech. Bioeng. Symp.* 2, 85.

Prescott, S.C. and Dunn, C.G. (1962). *Industrial Microbiology*, 3rd edition p 324-359, McGraw-Hill, N.Y.

Preston, T.R. (1972). Molasses as an energy source for cattle. - *World Rev. Nutr. Diet.* 17, 1.

Roger, L.A. and Whittier, E.O. (1928). Limiting factors in the lactic fermentation. *J. Bacteriol.* 16, 211.

Robbins, J.E., Melvin, T.A. and Stephen, L.L. (1979). Methane - production from cattle waste and delignified straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 175.

Sánchez-Marroquín, A. And Hope, H. (1953). Fermentation and - chemical composition studies of some species of agave juice. *J. Arg. Food Chem.* 1, 246.

Segar, L. Verstryngge, L. and Verstraete, W. (1981). Product patterns of non-axenic sucrose fermentation as a function of pH. *Bio tech. Letters*, 3, 635.

Shida, T., Komagata, K. and Mitsugi, K. (1975). Reduction of lag time in bacterial growth 1. Effect of inoculum size and nutrients, G. Appl. Microbiol. 21, 75.

Snell, E.E., Strong, F.M. and Peterson, W.H. (1938). Pantothe nic and nicotinic acids as growth factors for lactic acid bacteria. J. - - Amer. Chrm. Soc., 60, 2825.

Snell, E.E., Strong, F.M. and Peterson, W.H. (1939). Growth factor for lactic and propionic acid bacteria. J. Bacteriol. 38, 293.

Steinkraus, K.H. van Veen, A.G. and Tiebeau, D.B. (1967). Report rom Geneva Experiment Station on utilizing edible fungi. Food Technol., 21, 916.

Thomas, T. D. Ellwood, P.C. and Longyear, V.M. (1979) Change from homo- to heterolactic fermentation by Streptococcus lactis resulting - from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. J. Bacteriol. 138, 109.

Torre, de la, I. And Goma, G. (1981). Characterization of anaero bic microbial culture with high activity. Biotechnol. Bioeng. 23, - 185.

Ulloa, M. y Herrera, T. (1970). Resistencia de las aflotoxinas du rante la fermentación del pozol. Rev. Lat-Amer. Microbiol., 12, 19.

Varel, V.H., Issacson, H.R. and bryant, M.P. (1977). Thermophilic methane production from cattle waste. Appl. Environ. Microbiol. 33, 298.

Votaw, R.G. and Krampitz, L.O. (1966). Mechanism of action of - phosphoketolase. Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 25, 342.

Wang, D.C. Fleishchater, R.J. and Wang, G.V. (1980). Alche. Symp. Series 74, 105.

Watanabe, K. Shimma, M. and Oshima, N- (1976). Heat-induced stabi lity of IRNA from an extreme thermophile, Thermus thermophilus. Bio - chem. Biophys. Res. Commun. 72, 1137.

Wegner, W.S., Reeves, H.C. and Ajl., S.J. (1967). Propionate oxi dation in Escherichia coli. Arch. Biochem. Biophys., 121, 440.

Wise, D.L., Wenworth, R.L. Augenstein, D.C. and Cooney, C.L. (1977) Fuel gas production by anaerobic digestion. Res. Rec. 3, 41.

Wittenberger, C.C. and Angelo, N. (1970). Purification and pro - perties of a fructose 1,6-diphosphate-activated lactate dehy drogenasa from Streptococcus faecales. J. Bacteriol. 101, 717.

Wolin, M.J., Manning, G.B. and Nelson, W.O. (1959). Ammonium salts as a sole source of nitrogen for the growth of Streptococcus bovis, J. Bacteriol. 38, 147.

Wood, H.G., Andersen, A.A. and Werkman, C.H. (1937). Growth factors for propionoc and lactic acid bacteria, Proc. Soc. Exptl. factors for propionic and lactic acid bacteria. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 36, 217.

Zeikus, J.G. (1979). Thermophilic bacteria: Ecology physiology and tecnology. Enzym. Microb. Technol., 1, 243.

Zeikus, J.G. Taylor, M.W. and Brock, T.D. (1970). Thermal stability of ribosomes and RNA from Thermus acuaticus; Biochem. Biophys. Acta. 204, 512.