

---

## ESTUDIOS SOBRE LA MICROBIOLOGIA DEL PULQUE XVII. FERMENTACION DE MIELES INCRISTALIZABLES POR *Lactobacillus* SP.

---

A. SANCHEZ-MARROQUIN y ALFREDO ECHEGARAY A.  
Laboratorio de Microbiología Experimental de la Escuela Nacional de Ciencias Químicas (U.N.A.M.) y Lab. de Microbiología (Escuela Nacional de Agricultura).

Los estudios del aguamiel y el pulque, desde varios puntos de vista, se iniciaron en el año de 1772, según diversas reseñas bibliográficas.

Las primeras referencias que se tuvieron de la existencia del *Lactobacilos* en el aguamiel y el pulque, fueron dadas a conocer por Lindner (7) en sus trabajos publicados en Alemania, como resultado de los estudios hechos durante su estancia en México. Dicho autor señaló la presencia de un bacilo al que llamó *Bacillus acidificans* o bacteria filamentososa, sin dar mayores datos.

Morton, en su tesis de examen profesional, volvió a hacer mención de dicho bacilo incluyendo unas microfotografías y no aportando mayores datos (9).

Nieto y Maecke (10), en 1938, presentaron una reseña morfológica y bioquímica, acerca de una nueva especie de *Lactobacillus* aislada por ellos en una muestra de aguamiel, procedente de la Hacienda de Zoquiapan, en el Estado de Tlaxcala, y a la cual denominaron *Lactobacillus patonii*.

Sánchez-Marroquín y Wild (14) reportan uno de los trabajos mas recientes sobre la presencia de *Lactobacilos* en el aguamiel y el pulque con un estudio taxonómico y bioquímico de las cepas aisladas.

El ácido láctico puede ser obtenido por métodos químicos (8) o por fermentación. Los primeros no son aún aplicables a la industria, por lo cual se utilizan los métodos de fermentación (12, 15).

En la producción del ácido láctico por fermentación, se utilizan una gran variedad de substratos que contengan hidratos de carbono a los que se les añade substancias accesorias de la fermentación, tales como brotes de malta agua de cocimiento de maíz residuo de grano fino, etc.

El objeto de este trabajo es el de averiguar si usando las melazas como fuente de carbono para la fermentación en condiciones de laboratorio, es posible obtener ácido láctico en cantidad aceptable, empleando capas de *Lactobacilos* aislados del pulque.

### MATERIALES Y METODOS

#### a) *Procedencia de las muestras.*

Para el desarrollo del presente trabajo, se pensó en utilizar las cepas de *Lactobacilos* aisladas con anterioridad del aguamiel, del pulque (14) en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la E. N. C. B., pero juzgando que sería preferible reaislar las mismas cepas, se procedió a su obtención.

#### b) *Técnica de aislamiento y medios de cultivo.*

El método de aislamiento que mejores resultados dio, es el que señalan Sánchez-Marroquín y Wild (14), el cual consiste en hacer frotis y coloración de Gram a varias muestras de pulque.

Aquellas que mostraron una gran cantidad de bacterias semejantes al *Lactobacilo*, se sembraron en estría, en placas con medio Núm. I; se incubaron a 28° C. durante 5 a 6 días y se procedió a la localización de las colonias en el microscopio binocular de disección, marcándose aquellas que presentaron características de colonias de *Lactobacilos*.

De las colonias seleccionadas se tomó una porción para hacer frotis y coloración de cápsulas, por el método de Dorner modificado. En vista de que todas las colonias seleccionadas presentaban microorganismos contaminantes, se procedió a la purificación siguiendo la siguiente secuela:

1. Siembra en medio Núm. I Líquido, e incubación a 28° C. durante 5 a 6 días.
2. Resiembra en placa con medio Núm. I sólido del cultivo obtenido en el medio líquido e incubación a 28° C. durante 5 a 6 días.
3. Observación, frotis y coloración de cápsulas de las colonias obtenidas.

En los casos en que se obtuvo una colonia pura, se resembró en tubos con el medio Núm. I sólido inclinado. Si en la preparación se encontraban todavía gérmenes contaminantes, se repetían las operaciones señaladas, hasta lograr un completo aislamiento

Cuando las colonias de *Lactobacilos* fueron pequeñas, se tomaron con el asa, se resembraron en el medio Núm. I líquido, se incubaron a 28° C. por 5 a 6 días y se hicieron frotis y coloración de Dorner, desechándose aquellos tubos que no presentaron formas semejantes al *Lactobacilo*. Si el cultivo presentaba éstos pero estaba contaminado, se hacía el aislamiento por el método antes señalado

Finalmente se obtuvieron seis cepas, las cuales se denominaron de la siguiente manera: C-35, C-36, C-36', B-121, B-123 y N-22.

En las comparaciones de fermentación, con una de nuestras cepas se utilizó la cepa *L. plantarum* Núm. 10,012 de la American Type Culture Collection.

Los medios de cultivo fueron los siguientes:

#### MEDIO NUMERO I

Medio de Aguamiel (14).

Aguamiel	250.0 ml.
Extracto de levadura	10.0 g.
Glucosa	5.0 g.
Riboflavina	2.0 microgramos/ml.
Acido nicotínico	2.0 microgramos/ml.
Agua	250.0 ml.

#### MEDIO NUMERO II

Medio de Snell (18).

Hidrolizado ácido de caseína	0.5 %
Triptofano	0.01 %
Cistina	0.01 %
Glucosa	1.00 %
Acetato de sodio anhidro	0.60 %
Adenina	10.00 p.p.m.
Guanina	10.00 p.p.m.
Uracilo	10.00 p.p.m.
Acido nicotínico	0.10 microgramos/ml.
Tiamina	0.10 p.p.m.
Pantotenato de calcio	0.10 p.p.m.
Piridoxina	0.10 p.p.m.
Riboflavina	0.20 p.p.m.

Biotina (concentrada)	0.40 partes por billón de biotina pura.
Sales inorgánicas:	
Sol. A	5.00 ml.
Sol. B	5.00 ml.

La solución de sales tuvo la siguiente composición:

	Sol. A.		Sol. B.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g.	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.0 g.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g.	NaCl.	0.1 g.
Agua	50 ml.	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.1 g.
		MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.1 g.
		Agua	50.0 ml.

Los ingredientes del medio de Snell se prepararon de acuerdo con las indicaciones señaladas por el autor (18).

#### MEDIO NUMERO III

Medio de Snell modificado por Chaldelin et al. (6)

Hidrolizado ácido de caseína	4.0 g
Peptona tratada con álcali	10.0 g
Glucosa	40.0 g
Acetato de sodio anhidro	24.0 g
Extracto de levadura alcalinizado	2.0 g
Cloruro de cistina	0.2 mg.
Riboflavina	0.2 mg.
Sales inorgánicas	
Sol. A.	5.0 ml.
Sol. B.	5.0 ml.
Agua a completar	1000.0 ml.

#### MEDIO NUMERO IV

Sacarosa comercial	10.0 g.
Extracto de levadura	0.5 g.
Riboflavina	0.2 mg.
Acido nicotínico	0.2 mg.
Sales inorgánicas:	
Sol. A	0.5 ml.
Sol. B.	0.5 ml.
Agua a completar	100.0 ml.

La sacarosa se hidrolizó con HCl Q. P. al 1% en autoclave con llave de vapor abierta durante una hora; se neutralizó con sol. de NaOH concentrada y se agregaron las demás sustancias.

#### MEDIO NUMERO V

Miel incristalizable	200.0 g.
Extracto de levadura	7.5 mg.
Riboflavina	3.0 mg.
Acido nicotínico	3.0 mg.
Sales inorgánicas	
Sol. A.	7.5 ml.
Sol. B.	7.5 ml.
Agua a completar	1500.0 ml.

En este medio la miel se disolvió en un litro de agua y se hidrolizó con HCl Q.P. al 1% en Arnold, durante una hora: se neutralizó con solución de NaOH concentrada y se agregaron las sustancias restantes.

Se hizo otra fermentación sustituyendo el extracto de levadura por agua de cocimiento de maíz, por ser un material bastante rico en nitrógeno y vitaminas y se agregó el medio V a una concentración de un 4%.

Todos los medios antes citados se ajustaron a un pH de 6.6 a 6.8 y se esterilizaron a 15 libras de presión durante 15 minutos. Para la preparación de los medios sólidos se añadió agar al 2.5 g%.

El Medio número I se utilizó para el aislamiento de las cepas, así como para la obtención del lactato de zinc.

El medio número II se usó como medio de conservación.

El medio número III como medio base para investigar la acción bioquímica y los productos (indol, H<sub>2</sub>S, reducción de nitratos, etc.) resultantes del metabolismo. Para esta investigación se modificó el medio de la siguiente manera:

Para nitritos, medio número III con KNO<sub>3</sub> al 0.1 g%.

Para indol, medio III sin glucosa.

Para H<sub>2</sub>S, medio III sólido con acetato básico de plomo al 0.1 g%.

El estudio de la fermentación de algunos carbohidratos, se llevó a cabo usando el medio número III con el azúcar prueba a la concentración de 1 g% y con púrpura de bromocresol al 0.4%, suprimiendo la glucosa del mismo medio.

Para observar la formación de gas, se utilizaron los medios I y III en tubos de Smith. En la prueba de la catalasa, se usó el medio III sólido.

Para observar la licuación de la gelatina se utilizó el medio número III con gelatina al 12%.

También se estudió la acción en la leche simple y con púrpura de bromocresol.

#### c) Identificación de las cepas.

Con las 6 cepas, se practicaron las siguientes pruebas de identificación:

1. Prueba de Ilosvay's para nitritos.
2. Prueba de Ehrlich para indol.
3. Prueba de H<sub>2</sub>S por el ennegrecimiento del medio.
4. Pruebas de fermentación de carbohidratos observado el vire del indicador.

5. Prueba de catalasa añadiendo  $H_2O_2$  en el tubo de cultivo y observando la aparición de burbujas.
6. Reacción de Ee griwe para el ácido láctico.
7. Acción en la gelatina.
8. Acción en la leche simple y con púrpura de bromocresol.

Tanto la investigación de indol, nitritos,  $H_2S$ , catalasa, gas y ácido láctico, como las pruebas de fermentación de azúcares, se llevaron a cabo a los 6 días de incubación; la licuación de la gelatina y la acción en la leche simple y con púrpura de bromocresol, a los 10 días de incubación.

Todas las pruebas anteriores usadas para la identificación de este género de bacterias, vienen descritas en el Manual de Métodos de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos, así como en otros manuales de Bacteriología.

d) *Estudios previos a la fermentación.*

La capacidad fermentativa de las cepas aisladas, fue estudiada probándolas en el medio número I líquido. Esta fermentación se realizó de la siguiente manera:

Se prepararon matraces conteniendo 200 ml. del medio I, líquido y tubos de ensayo conteniendo 10 ml. del mismo medio. Se tomó una alícuota de 10 ml. de cada matraz para determinar azúcares reductores y acidez total. El método utilizado para el cuanteo de los azúcares fue el de Hagedorn-Jensen modificado por Blish y Sandstedt (3) y para la acidez se tituló con solución de NaOH 0.1 N usando como indicador el azul de timol.

Se inocularon los tubos con una asada de un cultivo reciente de *Lactobacilos* y se incubaron a 28° C. durante 2 días, comprobándose la pureza del cultivo por frotis y coloración de Gram. Se inoculan asimismo los matraces con el contenido de los tubos y a medida que progresó la fermentación, se tomaron muestras para determinar el consumo de azúcares y la cantidad de ácido formado. En esta fermentación no se usó ningún neutralizante.

e) *Actividad óptica del ácido producido.*

Como la cepa C-35 es la que tiene la mayor capacidad fermentativa, fue la utilizada para estudiar la clase de ácido producido por esta bacteria. Esta identificación se logró preparando las sales de zinc del ácido láctico y por el agua de cristalización y la rotación específica de dicha sal se conoce la forma óptica del ácido.

La obtención del lactato de zinc se logró de la siguiente manera:

Se preparó una fermentación mayor, utilizando 15 litros del medio número I; hidrolizando el aguamiel con HCl Q.P. al 1% en Arnold durante una hora, se neutraliza con sol. de NaOH y se añade el extracto de levadura a una concentración de 0.2 g%.

Para la preparación del inóculo, se sembró la cepa en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml. del medio antes citado, y se incubó a 28° C. durante 48 horas; se vertió su contenido en un matraz con 100 ml. del mismo medio y se incubó durante 24 horas a 28° C., pasándose a otro matraz con 750 ml. del mismo medio, el cual se incubó otras 24 horas más y finalmente con este líquido, se inoculó el frasco que contenía el medio por fermentar. Esta fermentación se efectuó durante 14 días utilizándose como agente neutralizante, el  $CaCO_3$  que fue agregándose, con intermitencia irregular, a medida que progresaba la fermentación. Los azúcares reductores se cuantearon por el método ya antes citado.

Terminada la fermentación, se filtró el líquido fermentado y el filtrado se concentró; este concentrado se acidificó con ácido sulfúrico a un pH de 2 utilizándose el azul de timol como indicador; se filtró después y éste se extrajo con éter etílico durante 48 horas con un extractor de continuo.

Se agregó agua al extracto etéreo eliminando éste por destilación; se hirvió entonces la solución con un exceso de carbonato de zinc libre de álcali, para formar las sales de zinc del ácido láctico. Se filtró esta solución y el precipitado se lavó añadiéndose las aguas de lavado, al filtrado; este se decoloró con carbón "Norit B" se filtró y el filtrado se evaporó a 50-60° C. hasta que principió la cristalización. Se agregó alcohol etílico al 50% y se dejó reposar durante la noche para que fuera completa la cristalización. Se filtró nuevamente y los cristales de lactato de zinc que resultaron se lavaron con alcohol de 95%, luego con éter y fueron secados al aire (21).

Con el lactato de zinc obtenido se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

I. *Agua de cristalización*. El agua de cristalización se determinó desecando a 100-110° C. una muestra de lactato de peso conocido, hasta obtener un peso constante.

II. *Rotación específica*. Se determinó la rotación específica en el polarímetro por el método directo (22). Se pesaron 1.5310 g. de lactato de zinc y se diluyeron a 25 ml. a 20° C.

III. *Pureza del lactato de zinc*. Para conocer la pureza de la sal se calcinó una muestra pesada, hasta peso constante. Los datos obtenidos fueron los siguientes:

Peso de la muestra	= 1.88
Peso de las cenizas	= 0.33
Porcentaje de ZnO en el lactato	= 33.09%

f) *Fermentación*.

La fermentación de la sacarosa comercial y de las melazas se hizo comparativamente utilizando una de las cepas aisladas, la C-35, y una cepa de colección: el *L. plantarum* Núm. 10012.

Las condiciones utilizadas en la fermentación fueron las siguientes:

1. *Concentración del sustrato*. La concentración de la sacarosa comercial y de las melazas fue aproximadamente de 10%. También se usó la melaza a una concentración cercana a un 20%.

2. *Temperatura*. La temperatura utilizada para la fermentación y para la inoculación de las cepas fue de 28° C.

3. *pH*. El pH inicial del medio por fermentar fue de 6.6 a 6.8.

4. *Pureza de las cepas*. Se comprobó por coloración simple y por Gram.

5. *Inoculación*. El inóculo para la fermentación de la sacarosa hidrolizada se preparó tomando una asada de un cultivo reciente de *Lactobacilos*, sembrándola en tubos que contenían 5 ml. del mismo medio, incubándolas 48 horas a 28° C. y vertiendo su contenido en los matraces de fermentación.

El inóculo para la fermentación de las melazas se preparó sembrando los *Lactobacilos* en tubos que contenían 5 ml. del medio de melazas y se incubaron 48 horas a 28° C. vertiendo el contenido del tubo, en matraces que tenían 100 ml. del mismo medio volviéndose a incubar durante 24 horas y pasando su contenido a los matraces de fermentación. Estos inóculos representan un 5% del volumen del líquido por fermentar.

6. *Neutralización*. Como agente neutralizante se utilizó el CaCO<sub>3</sub> que fue añadido intermitentemente a medida que progresaba la fermentación.

7. *Tiempo de incubación*. El tiempo de incubación fue de 7 días.

8. *Adaptación de las cepas*. Las cepas fueron acostumbradas a crecer en el medio de melazas, sembrándolas por pases sucesivos en un medio de melazas sólido.

Para efectuar la fermentación de la sacarosa comercial hidrolizada, se prepararon matraces conteniendo cada uno de ellos 100 ml. del medio número IV. Para la fermentación de las melazas los matraces de fermentación contenían cada uno de ellos 500 ml. del medio número V.

g) *Métodos de análisis*.

1. *Determinación de azúcares*. Los azúcares se determinaron en todos los casos por el método de Hagedorn-Jensen modificado (3).

2. *Obtención del ácido láctico como lactato de calcio*. El método utilizado es el descrito por Olivé y Burton con ligeras modificaciones (5, 11). El medio fermentado se calienta en baño de María y se filtra al vacío. Se ajusta la concentración de iones hidrógeno del filtrado a pH de 5 a 6 añadiéndole unas gotas de ácido láctico Q.P., se agrega carbón "Norit B" al 2% en volumen y se filtra. Si el filtrado presenta algún color, se ajusta el pH de 7 a 8 agregándole

un poco de  $\text{Ca(OH)}_2$  en polvo; se añade carbón y se filtra. Esta operación se repite varias veces hasta que el filtrado no tenga o sólo presente un ligero color.

A continuación se procede a concentrar al vacío el filtrado hasta una concentración de 15° Baumé. Se pone el concentrado en el refrigerador durante una noche para que cristalice el lactato.

Se lava el lactato 2 ó 3 veces con agua fría recogiéndose las aguas de lavado, y como éstas contienen todavía lactato se procede a concentrarlas al vacío. Se recristaliza el lactato y se lava, desechándose las aguas de lavado. Se añade este lactato al obtenido anteriormente y se seca en estufa a 30° C., subiéndose lentamente la temperatura hasta 50-60° C. Ya seco el lactato, se muele a polvo fino y se guarda para su análisis.

Para conocer la pureza en ácido láctico del lactato obtenido en la fermentación, se procedió a cuantear dicho ácido por el método colorimétrico de Barker-Summerson (2) utilizando el Espectrofotómetro Beckman, modelo D. U.

3. *Determinación de alcohol.* La determinación del alcohol se hizo mediante el método oficial de la A.O.A.C. (1). Se tomó una muestra del líquido fermentado y se destiló. La densidad del destilado se determinó mediante el uso del picnómetro.

4. *Determinación de ácidos volátiles.* Los ácidos volátiles se determinaron según el método de la A.O.A.C. Se tomó una muestra del líquido fermentado y se destiló con arrastre de vapor de agua. El destilado se tituló con solución 0.1 N de NaOH usando la fenolftaleína como indicador.

## RESULTADOS

1. *Cepas.* Las cepas se aislaron del pulque, previa bacterioscopia sembrando en estría en placas que contenían el medio número I. Incubando a 28° C. durante 5 días y purificándolas mediante técnicas bacteriológicas usuales, seleccionando 6 para estudios posteriores.

2. *Características morfológicas y bioquímicas de las cepas.* Todas las cepas presentaron características morfológicas y bioquímicas semejantes. En frotis teñidos, todas las cepas fueron muy similares en lo que se refiere a su forma; bastones de lados paralelos, extremos rectos o ligeramente encorvados, no ramificados y se presentaron en cadenas de 2, 3, 4 ó más elementos (ver cuadro número 1).

En los medios de cultivo utilizados, presentaron las siguientes características:

*Placa con medio núm. I sólido.* Las colonias tenían el siguiente aspecto:

Tamaño de 1 a 3 milímetros.

Superficie rugosa.

Forma irregular y convexa.

Bordes difusos.

Color blanquecino.

Consistencia butirosa.

*Tubo con medio núm. I sembrado en estría.* Crecimiento abundante, aplanado, liso y de color blanquecino.

*Tubo con medio núm. III sembrado en estría.* El crecimiento es semejante al anterior.

*Tubo con medio núm. I sólido sembrado en picadura.* Crecimiento de pequeñas colonias a lo largo de la línea de inoculación. No hubo crecimiento en la superficie del medio. En tubo con gelatina y Sembrado en picadura el crecimiento fue escaso y no presentó licuación

*Tubo con medio núm. I líquido.* A los 3 días de incubación los tubos presentaron turbidez; a los 5 días, se formó en el fondo del tubo un precipitado compacto de color blanco y el líquido se volvió transparente. No hubo formación de película.

En el medio núm. III líquido el aspecto fue semejante.

Todos los medios de cultivo se incubaron 5 días a 28° C.

En cuanto a las características bioquímicas fueron las siguientes:

Todas las cepas dieron negativas las pruebas de indol, nitritos, H<sub>2</sub>S, coagulación de la leche simple y con púrpura de bromocresol licuación de la gelatina, catalasa y producción de gas.

Todas dieron positiva la reacción de Eegriwe para ácido láctico.

Respecto a la fermentación de algunos carbohidratos, los que más rápidamente fermentaron en orden de cita, fueron los siguientes: levulosa, arabinosa, xilosa y glucosa, en cambio no fermentaron la maltosa y la sacarosa. (Cuadro N° 2.)

En la prueba efectuada para conocer la capacidad fermentativa de las cepas, se encontró que la que tiene mayor capacidad es la C-35, ya que consume el 84.1% del azúcar total del medio siendo también la que produce la mayor cantidad de ácido por titulación. Le siguen las cepas N-22, B-121, B-123 y C-36'. Los resultados de esta prueba están anotados en la Tabla N° 1 y se expresan en g. de glucosa en 100 ml. de medio. Los resultados de acidez por titulación se muestran en la Tabla N° 2 y están expresados en milímetros de NaOH O.IN gastados al titular 5 ml. del medio fermentado.

Con respecto al lactato de zinc, se obtuvieron 30 gramos. En la determinación de su agua de cristalización se encontró que la sal contenía un 18% de agua.

En el polarímetro se observó que el lactato es inactivo, ya que no desvía el plano de luz polarizada.

De 1% de ZnO obtenido en la calcinación (33.09%) se nota que el resultado se aproxima al contenido teórico de una sal Q.P. que es de 33.42% (21).

Los resultados de la fermentación del medio de aguamiel por la cepa C-35 están anotados en la Tabla N° 3.

En la fermentación de la sacarosa comercial hidrolizada del medio IV (gráfica 1) la cepa C-35 fermentó 10.88 g. en 100 ml. del azúcar del medio, siendo el volumen del líquido fermentado de 70 ml. obteniéndose 5 gramos de lactato de calcio o sean 7.61 g de ácido láctico.

En el análisis del lactato de calcio por el método de Barker-Summerson, se pesaron 176.2 mg. de dicha sal y se encontró que contenía 72 mg. de ácido láctico; verificando los cálculos resultó un rendimiento de 26.80% de ácido láctico referido a los azúcares fermentados.

La cepa *L. plantarum* en el medio IV (gráfica 1) fermentó 6.23 g/100 ml. del azúcar del medio; el volumen del líquido fermentado fue de 70 ml. y se obtuvieron 5.5 g. de lactato. En su análisis se pesaron 183.1 mg. de lactato, el cual contenía 68 mg. de ácido láctico. Efectuados los cálculos se encontró que el rendimiento fue de 46.80% de láctico referido a los azúcares fermentados.

En la fermentación de las melazas al 10%: con extracto de levadura medio V (gráfica 2) la cepa C-35 fermentó 8.81 g./100 ml. de los azúcares, el volumen del líquido fermentado fue de 250 ml. y se obtuvieron 20.5 g. de lactato. Al analizar el lactato se pesaron 182.2 mg. que dieron un contenido de 32 mg. de ácido láctico y al verificar los cálculos se encontró un rendimiento de 16.25% de láctico.

La cepa *L. plantarum* en dicho medio (gráfica 2) fermentó 8.26 g./100 ml. del azúcar y se obtuvieron 33 gramos de lactato. En el análisis del lactato se pesaron 177.7 mg. que contenían 41.8 mg. de ácido láctico. Se encontró un rendimiento de 31.29%.

En la fermentación de las melazas al 20% con extracto de levadura, y utilizando la cepa C-35 en el medio V (gráfica 3) se encontró que fermentó 14.64 g./100 ml. del azúcar y se obtuvieron 29.2 gramos de lactato. Para su análisis se pesaron 185.6 mg. que dieron un contenido en láctico de 52 mg. Su rendimiento es de 18.81%. En cambio con la cepa *L. plantarum* la cantidad de azúcar fermentada fue de 11.47 g./100 ml. y se obtuvieron 22.06 g. de lactato. En el análisis se pesaron 187.2 mg. que correspondieron a 56 mg. de láctico. El rendimiento fue de 19.17%.



En la fermentación de la melaza al 10% en el medio V (gráfica 4) adicionada de agua de cocimiento de maíz la cepa C-35 fermentó 7.37 g./100 ml. del azúcar y se obtuvieron 23.2 gramos de lactato. En su análisis se pesaron 180.1 mg. y dieron un contenido de 43 mg. de láctico. El rendimiento es de 25.02%. Por otra parte utilizando la cepa *L. plantarum*, la cantidad de azúcar fermentada fue de 6.51 g./100 ml. y la cantidad de lactato obtenida, fue de 22.5 gramos. En el análisis se pesaron 173.5 mg. de lactato que dieron un contenido de 29 mg. de ácido láctico. El rendimiento es de 28.57% referido a los azúcares fermentados.

En lo que respecta a la determinación de alcohol, éste no se encontró en la fermentación de melazas al 20%, ni en la de melaza al 10% con agua de cocimiento de maíz; pero en la fermentación de melaza al 10% con extracto de levadura por la cepa C-35, se halló una pequeña cantidad de alcohol en la siguiente proporción.

Densidad del destilado a 20° C. = 0.9990, que corresponde según las tablas (1) a una concentración de 0.66% en volumen, pero como para la determinación se utilizó una muestra de 200 ml. de líquido fermentado se obtuvo 0.33% de alcohol en volumen que corresponde a 0.25 gramos.

Los resultados de la determinación de ácidos volátiles están anotados en la Tabla N° 4 y expresados en Acido acético.

CUADRO NUM. 1

Cepa	Gram.	Ac. Resist.	Cápsula	Espora	Flagelo	Tamaño
C-35	+	—	—	—	—	4.9 x 1.0
C-36	+	—	—	—	—	3.3 x 1.5
C-36'	+	—	—	—	—	7.3 x 0.8
B-121	+	—	—	—	—	6.6 x 1.0
B-123	+	—	—	—	—	4.0 x 1.0
N-22	+	—	—	—	—	3.3 x 1.5

CUADRO NUM 2.

Cepa	Levulosa	Arabinosa	Xilosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa
C-35	++	++	± ±	± ±	— —	— —
C-36	++	± ±	± ±	— —	— —	— —
C-36'	++	++	± ±	± ±	— —	— —
B-121	++	++	++	± ±	— —	— —
B-123	++	++	++	± ±	— —	— —
N-22	++	++	++	± ±	— —	— —

+ = vire hasta amarillo intenso del indicador.

± = vire hasta rojo-amarillo a amarillo rojizo.

— = no hay vire.

TABLA NUM. 1

Reductores totales fermentados por las cepas de *Lactobacillus* sp. (g. de glucosa en 100 ml. de medio I).

Días	C-35	C-36	C-36'	B-121	B-123	N-2
------	------	------	-------	-------	-------	-----

0	—	—	—	—	—	—
2	17.3	8.7	15.5	16.2	16.0	20.9
3	46.7	26.9	32.2	41.6	32.4	37.0
4	47.8	35.5	38.9	44.7	45.0	45.4
7	62.5	47.2	49.3	55.2	58.3	59.5
10	68.7	48.6	51.2	57.9	59.5	65.2
14	73.3	49.6	54.3	60.2	60.6	70.2
16	74.5	49.6	57.0	64.8	61.8	47.8
22	81.8	52.2	58.1	69.8	61.8	77.0
24	83.0	57.4	59.3	71.0	62.9	78.2
30	84.1	58.5	60.4	72.2	64.1	79.3
Azúcares originales: g./ 100 ml.	5.18	5.12	5.21	5.18	5.24	5.24

TABLA NUM. 2

Acidez por titulación de las cepas *Lactobacillus sp.*

(ml de NaOH 0.1 N gastados al titular 5 ml. de medio fermentado).

Días de cultivo	CepaC-35	CepaC-36	CepaC-36'	CepaB-121	CepaB-123	CepaN-22
0	1.40	1.50	1.35	1.50	1.50	1.50
2	3.40	2.80	2.50	2.70	2.50	3.25
3	5.30	4.95	4.60	4.80	5.10	5.20
4	6.80	6.20	6.30	6.30	6.75	6.60
7	8.80	6.50	6.45	7.80	7.25	8.35
10	11.10	7.00	6.80	9.90	8.60	10.50
14	12.40	7.40	7.75	10.20	10.30	12.25
16	13.05	7.80	8.40	10.60	10.40	12.70
22	13.35	8.70	8.60	11.20	10.80	12.90
24	13.60	11.50	11.60	12.60	11.90	13.20
30	13.70	11.60	11.70	12.70	12.00	13.30

TABLA NUM. 3

Fermentación del medio número I por la Cepa C-35.

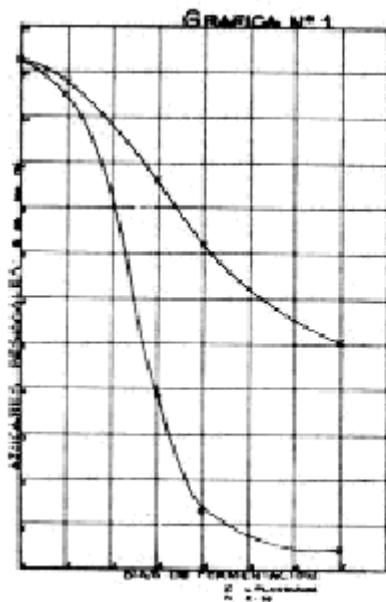
(Azúcares originales 14.25% g./100 ml)

Días	REDUCTORES TOTALES		
	Residuales g./100 ml.	Fermentados g./ 100 ml.	%Fermentados
0	—	—	—

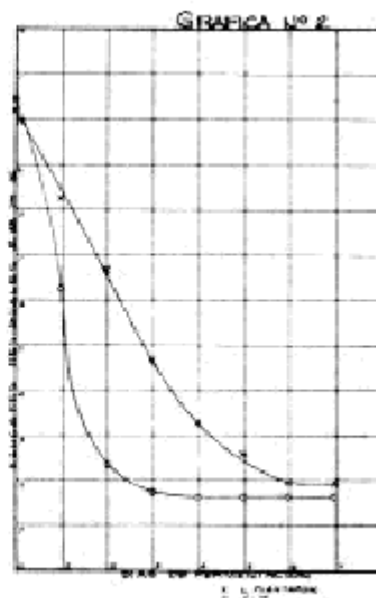
1	13.4	0.85	5.9
2	13.4	0.85	5.9
3	12.2	2.05	14.3
4	11.95	2.30	16.1
5	11.2	3.05	21.4
9	8.1	6.15	43.1
11	7.9	6.35	44.5
14	7.45	6.80	47.7

TABLA NUM. 4

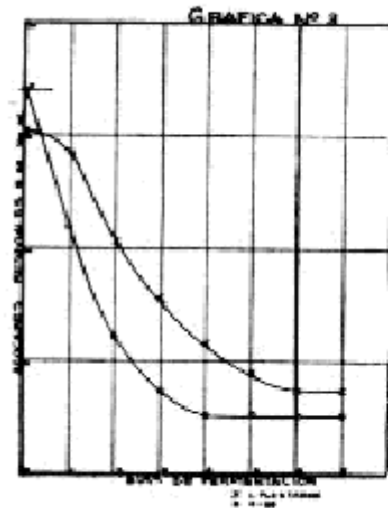
Cepa	Substrato	ml. de NaOH 0.1 N gastados	g. de Ac. acético en 100 ml. de medio	g. de Ac. acético referido a los azúcares fermentados
C-35L. <i>plantarum</i>	Melaza al 10% con extracto de lavadura.	47.11	0.2826	3.20
		12.29	0.7374	0.89
C-35L. <i>plantarum</i>	Melaza al 20% con extracto de lavadura.	80.62	0.4837	3.30
		36.22	0.2123	1.89
C-35L. <i>plantarum</i>	Melaza al 10% con agua de cocimineto de maíz..	24.20	0.1454	1.97
		14.96	0.8976	1.37



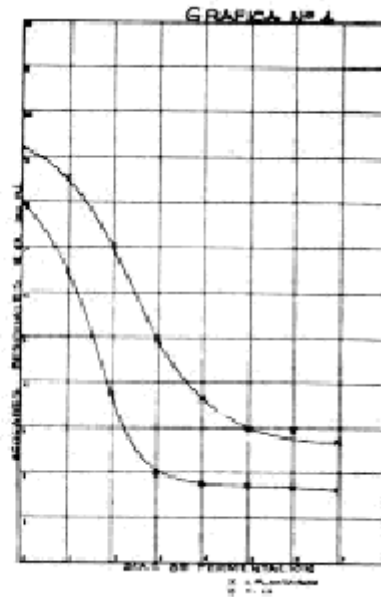
Gráfica 1. Fermentación del medio IV por *Lactobacillus* C-35 y *L. plantarum*



Gráfica 2. Fermentación de melazas al 10% en el medio V por las mismas cepas



Gráfica 3. Frementación de melazas al 20%, en el mismo medio V.



Gráfica 4. Fermentación de melazas al 10% en el medio V con agua de cocimiento de maíz en vez de extracto de levaduras

#### IV. DISCUSION

De acuerdo con la clave de clasificación de Bergey y colaboradores (4), se encontró que las bacterias aisladas están dentro de la *Familia Lactobacteriaceae, Tribu Lactobacillae*.

Según los caracteres morfológicos y bioquímicos anotados anteriormente, la cepa C-35 queda dentro del grupo IB, pues se trata de un germen homofermentador que produce ácido láctico de los carbohidratos y sólo pequeñas cantidades de otros productos. Es asimismo catalasa negativa y tiene una temperatura óptima de crecimiento de 28 a 30° C. Corresponde, por lo tanto, al *Lactobacilo* sp. de Sánchez-Marroquín y Wild (14).

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento y conservación de las cepas detallados en párrafos anteriores, así como los utilizados en la fermentación, contienen sustancias y factores de crecimiento experimentados por diversos investigadores, señalados como necesarios para el desarrollo de los gérmenes de referencia (16, 17, 19).

La cantidad de lactato de zinc obtenida, fue pequeña debido, probablemente, a que el extracto de levadura que usamos fue muy poco, lo que pudo influir en el rendimiento del ácido láctico; o pudo haberse debido también a que dado el gran volumen de líquido fermentado, la extracción etérea de éste no fue cuantitativa; pero en su defecto se obtuvo un lactato de zinc muy puro (contenido de ZnO 33.09%).

Las cepas utilizadas, fermentaron la glucosa y la fructosa, productos de hidrólisis de la sacarosa que es el principal azúcar de las mieles.

Se escogió el *L. plantarum* para compararlo en el proceso de fermentación, con una de las cepas en estudio, debido a que es un *Lactobacilo* homofermentador que produce ácido láctico inactivo; con una temperatura de crecimiento de 28 a 30° C. y que tiene por habitat diversos sustratos naturales, como los jugos fermentados de las plantas (4).

Teniendo en cuenta la naturaleza compleja de las mieles, se estudió el comportamiento de las dos cepas en la fermentación de la sacarosa comercial hidrolizada, para compararla posteriormente con la fermentación de las melazas.

En vista de los resultados que dio en la fermentación de la sacarosa comercial hidrolizada la cepa *Lactob. C-35* (gráfica 1) es de hacerse notar que dicha cepa consumió el 96% del azúcar del medio y produjo un bajo rendimiento de ácido láctico.

Asimismo es de observar, que en la fermentación del medio de melazas por nuestra cepa *Lactobacillus C-35* (Gráficas 2, 3 y 4) existe un consumo del 80 al 85% del azúcar del medio, con rendimientos de ácido láctico bastante bajos.

En tal virtud, siendo este *Lactobacilo* un germen homofermentador, (14) queda por resolverse en investigaciones posteriores qué transformaciones sufre el azúcar consumido no metabolizado a láctico y acético.

De los resultados obtenidos en la fermentación de melazas, se observa que los rendimientos de ácido láctico son un poco más bajos que los de la fermentación de la sacarosa comercial hidrolizada en las mismas condiciones de estudio.

También se pudo notar que la cepa C-35 produce mayor cantidad de ácido láctico en el medio de melazas con agua de cocimiento de maíz; en cambio, el *L. plantarum* lo produce en el medio de melazas adicionado de extracto de levadura. Esto tal vez se deba a la introducción de ciertos factores de crecimiento indispensables para las diversas especies de *Lactobacilos*, pues éstos necesitan diferentes vitaminas y mezclas de ellas para su crecimiento (20).

En cuanto a las pequeñas cantidades de alcohol y ácidos volátiles encontrados, pueden haber provenido de la fermentación de los azúcares existentes en las mieles.

Probablemente se pueda lograr un rendimiento mayor de ácido láctico en la fermentación de las melazas por este *Lactobacilo*, utilizando varias clases de sustancias accesorias de la fermentación, mezclándolas en diferentes proporciones y en cantidades variables.

## V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1 Se hizo un estudio morfológico y bioquímico de un *Lactobacilo* aislado del pulque, homofermentador y productor de ácido láctico inactivo, que correspondía a *Lactobacillus* sp. descrito con anterioridad (14).

2. Se realizó la fermentación láctica en melazas hidrolizadas, adicionadas de extracto de levadura o agua de cocimiento de maíz ajustando el pH inicial del medio y estableciendo condiciones óptimas de concentración de las mieles y temperatura para las cepas empleadas

3. En el ensayo efectuado para tratar de obtener mayor rendimiento de ácido láctico, se substituyó al extracto de levadura por agua de cocimiento de maíz, habiendo sido fermentado el 81.68% de los azúcares originales del medio, obteniéndose un rendimiento de 25.02% de ácido láctico.

4. De acuerdo con los resultados obtenidos y en las condiciones estudiadas, se llegó a la conclusión de que industrialmente, no es aconsejable la fermentación de mieles por *Lactobacillus* sp. procedente del pulque.

## BIBLIOGRAFIA

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. 1945. Methods of Analysis. Washington, D. C.
2. BARKER, S. B. and W. H. SUMMERSON. 1941. The Colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Material. J. Biol Chem. 138: 535-554.
3. BLISH, M. J. and R. SANDSTEDT. 1933. An Improved method for the estimation of flour diastatic value Cereal. Chem. 10: 189-202.
4. BREED, D., E. G. D. MURRAY and A. P. HITCHENS. 1948. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
5. BURTON, L. V. 1937. Byproducts of milk. Food Industries. 9:571-634.

6. CHALDELIN, V. H., E. H. HOAG and H. P. SARETT. 1945. The pantothenic Acid Requirements of Lactic Acid Bacteria. *J. Bact.* 149: 41-45.
7. LINDNER, P. 1930. Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle in dem Garungsweber mit besonderer Berücksichtigung der Brauerei. Sechste Neubearbeitete Auflage. Agauangärugen. pp. 581-593. Berlín. Ver Paul Parey. (Citado por Nieto) (20).
8. MONTGOMERY, R. 1949. The Chemical Production of Lactic Acid from Sugars. Sugar Research Foundation Inc. Scientific Report Series. No. 11. N. Y.
9. MORTON, M. G. 1925. Aprovechamiento Industrial del Maguey. Tesis. Fac. Ciencias Químicas. U. N. A. M. México.
10. NIETO ROARO, D. y M. MAECKE. 1938. Contribución al Estudio Bacteriológico del Aguamiel y del Pulque. Parte 1. *Anal. Inst. Biol.* 9: 25-48. México.
11. OLIVEE, T. R. 1936. Waste Lactose in Raw Materias for a New Lactic Acid. *Process. Chem e Met. Eng.* 43: 480-483.
12. PECKHAM, G, T. JR. 1944. The Commercial Manufacture of Lactic Acid. *Chem. Eng. News.* 22: 440-444.
13. PETERSON, W. H., and M. S. PETERSON. 1945. Relation of Bacteria to Vitamins and other Growth Factors. *Bacteriological Reviews.* 9: No. 2. 50-86. The Williams e Wilkins Co. Baltimore.
14. SÁNCHEZ-MARROQUÍN y C. WILD. 1946. Estudios sobre la Microbiología del Pulque. I. Características Morfológicas y Bioquímicas del *Lactobacillus* sp. *Ciencia,* 8: 207-214. México.
15. SMITH, L. T., and H. V. CLABORN. 1939. The Production of Pure Lactic Acid. *Ind. and Eng. Chem. News. Ed.* 17: 641.
16. SNELL, E. E., F. M. STRONG and W. H. PETERSON. 1938. Pantothenic and Nicotinic Acid as Growth factors for Lactic Acid Bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 60: 683-692.
17. — 1939. A Microbiological Assay for Riboflavin. *Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed.* 11: 346.
18. — y L. D. WRIGHT. 1941. A Microbiological Method for the Determination of Nicotinic Acid. *J. Biol. Chem.* 139: 675-686.
19. — 1945. The Nutritional Requirements of the Lactic Acid Bacteria and their Application to Biochemical Research. *J. Bact.* 50: 373 - 381.
20. — 1948. Nutritional Requirements of the Lactic Acid Bacteria. Wallerstein Laboratories. *Communications.* 11: N° 33. 81 - 104.
21. WILSON, P. W., and W. H. PETERSON. 1942. Laboratory Experiments in Fermentation Biochemistry. Univ. of Wisconsin. (Mimeógrafo).
22. WOODMAN, A. G. 1941. Food Analysis. McGraw-Hill Book Co. N. Y.