

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICAS

Estudio Comparativo de las Diversas Amilasas

Microbianas en la Conversión de Almidones

T E S I S

QUE PRESENTA PARA SU EXAMEN PROFESIONAL DE LA

CARRERA DE QUÍMICO

EL ALUMNO

FERNANDO C. SALAZAR DÍAZ



MEXICO, D. F.

IMP. FRANCO.—STA. VERACRUZ, 32

1 9 4 8

338



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

- 1.—OBJETO DEL TRABAJO.
- 2.—GENERALIDADES SOBRE AMILASAS Y ALMIDON. ACCION DEXTRINOGENICA Y SACAROGENICA DE LAS AMILASAS SOBRE LOS ALMIDONES.
- 3.—PRUEBAS REALIZADAS CON AMILASAS DE MALTA, BACTERIANAS Y DE HONGOS.
- 4.—CONCLUSIONES.
- 5.—BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I.

GENERALIDADES.

El objeto de este trabajo es contribuir al conocimiento del mejor camino para hallar un sustituto de la malta en la conversión de los almidones, por ser ésta un agente muy probable de contaminación en la fermentación alcohólica a partir de cereales en escala industrial. Por estudios previos realizados en el proceso de fermentación alcohólica tendientes a lograr esta en una forma continua se encontró que como obstáculo de mayor importancia se encuentra la contaminación bacteriana. Aún en escala de Laboratorio y bajo las condiciones más ascépticas la contaminación bacteriana era algo que no se podía evitar.

Dicha contaminación se pudo comprobar una y otra vez en las experiencias realizadas para desarrollar una fermentación continua que se debía a la introducción de malta en el sistema y pensando en la posible sustitución de la malta como agente liquefaciente y sacarogénico por otra substancia que posea estas mismas propiedades y al mismo tiempo evite una posible contaminación bacteriana, dió origen al desarrollo de este trabajo.

Como es bien sabido este problema de la conversión de almidones no es nuevo, mucho se ha investigado y bastante se ha escrito al respecto; sin embargo, aún queda mucho por aclarar y resolver sobre este particular.

Por lo tanto, esta modesta contribución tiende a encontrar un sustituyente eficaz de la malta en substancias de diferente origen pero que sean poseedoras de Alfa y Beta amilasas, que como ya es bien sabido son los agentes dextrinificantes y sacarogénicos de la malta y al mismo tiempo determinar comparativamente con respecto a la malta su grado de eficiencia.

Se pensó en usar amilasas de origen bacteriano para lo cual se usaron preparados a base de *Bacilo subtilis*. Se pensó *asimismo* en amilasas de hongo cuyas propiedades sacarogénicas son conocidas desde hace mucho tiempo.

Así, pues, este estudio tiende dentro de las posibles fuentes amilásicas a encontrar cuál podría ser la más conveniente como sustituyente de la malta en la conversión de almidones, siendo su aplicación inmediata en la fermentación alcohólica bajo una base continua a partir de almidones de cereales.

Naturalmente este es un trabajo lleno de imperfecciones por mi falta de experiencia en la materia, pero espero sirva para dar una indicación o al menos una luz en el camino tendiente a lograr una fermentación alcohólica continua sin llegar a un estado de contaminación.

Como la experiencia previa es en el sentido que las amilasas bacterianas no son eficaces agentes sacarificadores la comparación de su acción sobre los almidones comparada con la de la malta se limitará exclusivamente a su acción liquefactora. Por lo tanto, las experiencias llevadas a cabo en el Laboratorio fueron dirigidas hacia ese sentido.

Como complemento de esa primera acción de las amilasas bacterianas se usó después para la sacarificación de almidones amilasas de hongo y cuya acción fué también determinada comparativamente con respecto a la de la malta.

Únicamente y como fuente de referencia fué hecha una experiencia en la cual la hidrólisis de los almidones fué llevada a cabo mediante ácidos inorgánicos, usándose en este caso ácido clorhídrico concentrado.

Así que se puede decir que las pruebas realizadas en este trabajo quedan divididas en tres partes:

- 1.—Tendientes a comparar la acción liquefaciente de las amilasas bacterianas y de la malta en la hidrólisis de almidones.
- 2.—Comparación entre la hidrólisis de almidones llevada a cabo mediante malta y ácidos inorgánicos.
- 3.—Comparación entre la acción sacarogénica de las amilasas de hongos y la de la malta.

CAPITULO II.

AMILASAS. GENERALIDADES.

ACCION DEXTRINOGENICA Y SACAROGENICA DE LAS AMILASAS SOBRE LOS ALMIDONES.

Las amilasas se encuentran ampliamente distribuídas en el reino vegetal como en el reino animal; en el primero se encuentran presentes en cereales principalmente y en el segundo en la saliva, jugo pancreático de hígado de algunos animales, etc., así como en ciertos tipos de bacterias.

El nombre de amilasas es el nombre genérico que corresponde al grupo de enzimas que actúan sobre los almidones. La actividad de estos enzimas está modificada por diversas condiciones tanto físicas como químicas, tales como pH, temperatura, composición del sustrato, etc., ya que la variación de ellos traerá como consecuencia una variación en la velocidad de reacción en que toman parte o bien en la formación de productos finales.

Las amilasas en algunos casos para poder ser usadas requieren un proceso previo de purificación y concentración, en otros casos son utilizadas directamente como sucede con las amilasas de malta de cebada.

Desdoblan el almidón y glicógeno. Cuando las condiciones son favorables el desdoblamiento de los almidones puede llegar hasta azúcares como maltosa. Aunque el proceso de desdoblamiento de los almidones es un proceso complicado ya que en partes se dificulta por el desconocimiento de la verdadera estructura de la molécula de almidón.

La acción de las amilasas sobre el almidón se manifiesta por una

marcada disminución en la viscosidad, con la formación al mismo tiempo de azúcares reductores y siendo negativa la reacción con el yodo. Sin embargo, entre los cambios que ocurren no hay ninguna relación, de manera que muy bien puede haber una rápida liquefacción seguida de un proceso muy lento de formación de azúcares, o también una rápida formación de azúcares reductores pero un proceso muy lento de transformación de los productos que dan la coloración azul característica con la solución de yodo.

Por lo tanto las modificaciones que sufre el almidón debido a la acción de las amilasas pueden ser clasificadas en tres grupos:

- 1.—Liquefacción o solubilización del almidón sin lograrse una degradación de la molécula.
- 2.—Degradación de la molécula de almidón por la formación de dextrinas y pequeñas cantidades de azúcar. Esta acción se debe a amilasas dextrinogénicas.
- 3.—Hidrólisis del almidón con formación de un alto grado de azúcares reductores como maltosa y dextrosa; esta acción es debida a amilasas sacarogénicas.

Ahora bien, se ha encontrado que cuando el almidón no está previamente gelatinizado, la acción de las amilasas tropieza con muchas dificultades debido probablemente a que por la naturaleza de los granos de almidón la liquefacción obtenida es casi de ninguna importancia. Si al almidón se le gelatiniza, parece ser que la estructura de él se debilita y la liquefacción alcanza entonces un mayor grado.

Sabido es que la relación entre los diversos factores que influyen en la actividad de los enzimos es muy particular para cada substancia por lo que como norma deben tomarse en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1.—La destrucción del enzimo varía completamente con la temperatura.
- 2.—A medida que aumenta la temperatura la acción de un enzimo sobre determinado sustrato aumenta de valor hasta determinado punto, en el cual la destrucción del enzimo es mayor que la acción del mismo.

- 3.—La estabilidad de las amilasas depende en algunos casos de ciertos factores secundarios, tales como la influencia debida a la presencia de los iones calcio.
- 4.—En los sistemas complejos de amilasas la temperatura influye en los productos finales. En la hidrólisis de almidones mediante amilasas de malta de cebada si ésta se hace a 47° o bien a 65.5° C. determina una mayor formación de azúcares en el primer caso, debido probablemente a la diferente estabilidad térmica de las diferentes amilasas.

LIQUEFACCIÓN.—Es la transformación de los almidones en sustancias de peso molecular más bajo. Su efecto visible más importante consiste en la reducción de la viscosidad que bien puede atribuirse a la formación de sustancias reductoras como dextrinas y azúcares probablemente.

El mecanismo de la liquefacción del almidón no se conoce perfectamente por lo que se trata de explicar de dos modos diferentes:

Uno supone que el enzimo ataca exclusivamente las terminales de la cadena de almidón formadas por esterres del ácido fosfórico.

Otro dice que el enzimo específico produce dextrinas originando la liquefacción del almidón.

Algunos autores se inclinan a la posibilidad de una relación entre liquefacción y dextrinificación y suponen que un solo enzimo es el causante de los mencionados procesos de liquefacción y dextrinificación, al cual se le ha nombrado como Alfa amilasa.

La Alfa amilasa se desarrolla durante la germinación de los granos de cereales. Su acción se manifiesta sobre el almidón por una rápida liquefacción, conformación de sustancias que con solución de yodo ya no dan una coloración azul y que al mismo tiempo son de bajo poder reductor. Al Alfa amilasa por el hecho de formar sustancias parecidas a las dextrinas y muy pocos azúcares también se le llama amilasa dextrinogénica.

DEXTRINIFICACIÓN.—Las dextrinas son productos de degradación de los almidones. En este proceso se pueden observar cambios graduales en algunas propiedades como su poder reductor y solubilidad que aumentan; la viscosidad disminuye y la intensidad de la reacción del almidón con el yodo también disminuye gradualmente.

SACARIFICACIÓN.—En este proceso se verifica la formación de azúcares simples como maltosa o glucosa a partir del almidón. Proceso que se debe a la acción de otra amilasa, diferente de la causante de la acción liquefaciente y que se le llama Beta amilasa.

La Alfa como la Beta amilasa pueden transformar el almidón hasta azúcares únicamente que la Beta amilasa convierte aproximadamente 60% de almidón a maltosa, en cambio, la Alfa amilasa además de producir dextrinas forma también azúcares reductores factibles de fermentarse, siendo en general su acción dextrinogénica.

La Beta amilasa es, por lo contrario, un amilaza de alto poder sacarificador ya que transforma un 50-60% de almidón en azúcar reductor, sin embargo, la reacción con el yodo aún es positiva.

Con el objeto de hacer un estudio más completo de las amilasas, se han desarrollado técnicas para poder separar la Alfa de la Beta amilasas basadas cada una de ellas en las diferencias de ciertas de sus propiedades. Por ejemplo:

1.—Si un extracto con amilasa se calienta a 70° C. por 15 minutos, y el medio tiene un pH de 6-7 se destruye casi toda la Beta amilasa. Si por el contrario ese mismo extracto en lugar de calentarlo se le enfría a 0°C. y se ajustara el pH a 5.3 mediante ácido clorhídrico se destruiría la mayor parte de alfa amilasa.

Basándose en este hecho se tendría una manera de separar beta de alfa amilasa.

2.—Siguiendo el método de Van Klinkenberg, se pueden separar las dos amilasas mediante una precipitación parcial con alcohol. Al agregar alcohol a un extracto de amilasa hasta obtener una concentración de 60% se precipita la alfa amilasa. Si se continúa agregando alcohol hasta obtener una concentración de 80% el precipitado es una mezcla de alfa y beta amilasa.

3.—El método de Sancec y Waldschmidt Leiz se basa en la selectividad de la beta amilasa en alúmina a un pH de 3.8, la alfa amilasa permanece en solución, libre de beta amilasa.

4.—El método de Sherman, Caldwell y Doebeling, consiste en preparar alfa amilasa libre de beta amilasa por medio de una precipitación parcial de la malta de cebada mediante de sulfato de amonio seguida de diálisis y una posterior precipitación con alcohol.

Para poder precisar con exactitud el grado liquefaciente o sacarogénico de las amilasas se han desarrollado muy variados métodos para hacer dichas determinaciones.

El método más general para hacer la determinación de alfa amilasa es el de Wohlgemuth, llamado también método de total dextrinización. Dicho método aunque no muy exactamente mide la actividad de la alfa amilasa.

Para la determinación de la actividad sacarogénica el método más general es el de L. R. Sneider, que se basa en la liberación rápida de beta amilasa mediante papaína o cisteína, usándose con solución reguladora. citratos que impiden la inhibición debido a metales pesados.

La actividad sacarogénica se determina mediante ferrocianuro de potasio, con lo cual se determina poder sacarogénico total, o sea, la pequeña acción sacarogénica debida a la alfa amilasa. Si se quiere determinar el poder sacarogénico debido únicamente a la beta amilasa se seguirá el método de Kneeny Sandstedt.

ALMIDON.

Se le llama también amilo cuya fórmula probable es $(C_6 H_{10} O_5)_n$, es el producto de asimilación más importante de las células de las plantas, en cuyo reino se encuentra ampliamente distribuido encontrándose en casi todos los órganos de las plantas bajo la forma de granos o bien nódulos.

Se encuentra presente en cantidades considerables en toda clase de granos como maíz, arroz, trigo, cebada, etc., así como en tubérculos como patatas siendo en algunos países especialmente europeos, la fuente principal para la obtención de almidón.

En los granos de almidón el contenido de ellos llamado granulosa es soluble en agua pero en cambio, la sustancia que forma las paredes del grano también conocida como celulosa del almidón es insoluble de tal manera que pueda ser separada fácilmente por simple filtración; este producto filtrado o sea granulosa precipitada con alcohol se obtiene lo que comercialmente se le conoce bajo el nombre del almidón que es un polvo amorfo.

El almidón es insoluble en agua fría pero calentado con agua, los granos de él se gelatinizan.

El producto gelatinoso obtenido al calentar el almidón con agua se le llama pasta de almidón y es muy usado para el endurecimiento de la ropa y como sustituyente de la goma en algunos casos.

A dicho fenómeno se le llama pectinización y la temperatura a la cual el almidón forma una masa viscosa es muy variable según el tipo de almidón de que se trate, la cual es característica según puede verse a continuación.

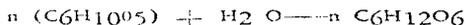
Arroz	72° C.
Maíz	67° C.
Centeno	56° C.
Trigo	62° C.
Patata	72° C.

Dicha propiedad es debida exclusivamente a la amilopectina, pues con amilasa pura no se forma ninguna pasta.

Como principal característica del almidón es el color azul brillante que se obtiene, cuando una solución de almidón es puesto en contacto con una solución de yodo; dicho color desaparece al calentar y reaparece al ser enfriada la solución.

La coloración azul característica del almidón que se forma en presencia del yodo según algunos investigadores se debe a la formación de un nuevo compuesto químico, mientras que otros se inclinan a creer que se debe a un fenómeno de absorción.

Cuando al almidón se le hierve con soluciones de ácidos diluidos se convierte primeramente en dextrinas y después en un grado más avanzado de la hidrólisis en glucosa.

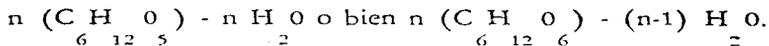


La hidrólisis mediante ácidos diluidos es casi total con la ya mencionada formación de glucosa como producto final, ahora bien; cuando la hidrólisis se lleva a cabo mediante enzimas, entonces como producto final se obtienen disacáridos como maltasa, en cuyo caso los rendimientos de la hidrólisis fluctúan entre 80-85%; el 15-20% restante se puede decir que está formado por sustancia de peso molecular elevado, las cuales si pueden ser hidrolizadas mediante ácidos diluidos o con glucosidasas a glucosa, casi en su totalidad.

El resto no Hidrolizado de la molécula de almidón generalmente está formado por ácidos grasos, algunos lípidos, sales minerales y sustancias de naturaleza proteica.

Las concentraciones relativas de estas substancias en la constitución del almidón varían según su origen.

La molécula de almidón es desconocida en su constitución y se han elaborado diversas teorías para explicarla, una muy sencilla tiende a demostrar que la molécula de almidón se forma probablemente por la combinación de "n" moléculas de glucosa y con la consiguiente eliminación de n o bien (n-1) moléculas de agua, siendo entonces su probable fórmula molecular.



El valor numérico de "n" es desconocido aunque se supone es un número muy grande; se considera que las diversas variedades de almido-

nes no son otra cosa que mezclas de diferentes compuestos. De un modo análogo puede entonces deducirse la fórmula de las dextrinas pero siendo en este caso n indefectiblemente de un valor mucho menor que en el caso de n en el almidón.

Según los trabajos desarrollados por Nageli, en 1858 y Maquenne en 1904 se supone que el almidón está formado por 2 compuestos:

Amilosa o conocida también como granulosa, es la porción interna de los granos, amilopectina o conocida también celulosa de almidón como mencioné anteriormente forma la parte exterior.

La porción interna se encuentra libre de electrolitos, mientras que la segunda contiene aproximadamente 0.175% fósforo seguramente bajo la forma de un esterfosfórico.

A la amilopectina se le atribuye la propiedad del almidón de formar geles.

La amilosa con el yodo toma una coloración azul, mientras que la amilopectina lo hace con un color café violeta. Como el almidón en la forma como se presenta en la Naturaleza toma una coloración azul en presencia del yodo, se supone la amilosa es más sensible al yodo que la amilopectina que lo hace más lentamente.

CONSTITUCION.—Muy a pesar de los numerosos trabajos hechos, relativos a determinar la estructura del almidón se puede considerar como una cuestión sin solución aún satisfactoria.

Según Richter, métodos puramente químicos son posiblemente demasiado rígidos para dilucidar el problema, puesto que no se pueden considerar en ellos cambios no previstos en la molécula del almidón nativo y las conclusiones obtenidas por otro camino son en muchos casos contradictorias.

Se ha encontrado que como resultado de los varios métodos de degradación del almidón cuando se refieren a la amilosa, siempre se obtienen como productos finales 2 hexosas como maltosa, dihexo sano, amilobiosa, etc., mientras que la amilopectina siempre da como productos finales trihexosas, tales como hexatriosa, milotriosa, etc.

En términos generales pueden considerarse como los problemas más importantes relativos a esclarecer la estructura del almidón los siguientes:

- a) Determinar que tipos de eslabones de unidades de glucosa se encuentran unidos para formar la molécula de almidón.

- b) Verificar si la misma estructura o estructuras se encuentran presente en todos los tipos de almidones, o bien, si los almidones son químicamente heterogéneos, determinar las proporciones relativas de las diversas estructuras para formar la molécula del almidón.
- c) Encontrar las proporciones relativas de las pequeñas cantidades de sustancias no hidrocarbonadas que forman parte de la estructura de la molécula de almidón.

Ahora bien, los métodos específicos seguidos por los numerosos investigadores del problema han sido muy variados, y únicamente a manera de ilustración trataré de mencionar los siguientes:

- 1.—El método llamado de degradación del almidón logrado mediante una parcial polimerización, obteniéndose una substancia soluble en agua que es también sensible a la solución de yodo, pues da coloración azul sin tener propiedades reductoras, comúnmente conocido por almidón soluble, el cual fundamentalmente se supone no es compuesto definido y sí una mezcla de productos despolimerizados.
- 2.—Destilación del almidón. Al hacer una destilación al vacío de este se obtiene como producto final levo-glucosas, cuando la destilación es llevada a cabo a la presión ambiente, el producto obtenido es maltol o bien isómero isomaltol.
- 3.—Según el método de Kirchoff, si el almidón se calienta con ácidos minerales diluidos, entonces éste es transformado en dextrinas y en ocasiones hasta glucosa.
- 4.—El desdoblamiento de los almidones también puede ser llevado a cabo mediante de amilasas, que genéricamente así se llaman a todos los enzimas que atacan los almidones, las cuales como traté de explicarlo en este trabajo se encuentran ampliamente distribuidas tanto en el reino vegetal como en el reino animal.

Debido a la acción de las amilasas sobre los almidones, los productos finales obtenidos en estos casos generalmente son disácaridos. Según los trabajos de O'Sullivan, el rendi-

miento final es de 80% maltosa y 20% isomaltosa, cuyo probable origen de esta es la amilopeptina. Según la intensidad del ataque por decirlo así, pueden obtenerse productos intermedios como dextrinas en proporciones muy variadas.

- 5.—La acción del bromo de acetilo sobre el almidón, nos conduce a la obtención de un producto aceto-bromo maltosa, según lo comprueban los experimentos llevados a cabo por Karrer.
- 6.—Pictet concluyó en sus experiencias que calentando almidón con glicerina a 200°C se obtiene di o tri hexosas.
- 7.—El experimento más sobresaliente de todos los conducentes a encontrar la estructura del almidón, es el verificado por Haworth, Hirst y Web, o sea el de la metilación del almidón que consiste explicado brevemente en metilar el almidón ya sea con sulfato o yoduro de metilo hasta que todos los grupos oxhidrilo presentes en la cadena original se hayan transformado en grupos metilados, formándose grupos éteres metílicos y como éstos son fuertemente resistentes a la hidrólisis ácida, el carbohidrato ya metilado así de esta manera puede entonces ser degradado el azúcar con su correspondiente grupo metílico sin haber sufrido alteración de ninguna especie.

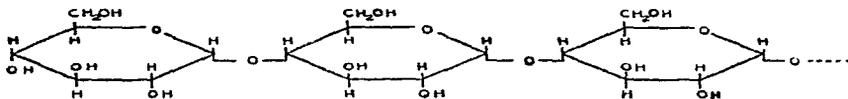
El producto así obtenido; la o las metil-glucosas se examina y si alguno de los 6 átomos de Carbono que forman su estructura se encuentran sin tener su grupo metílico, nos llevará a la conclusión de que dicho átomo de Carbono es el punto de unión de varias unidades de glucosa que unidas formaban el carbohidrato original.

El producto final obtenido por éste método es el llamado trimetil glucosa o almidón trimetilado de fórmula $(C_6H_7O_2)(OCH_3)$

La hidrólisis del almidón trimetilado nos da además como productos finales 2:3:4:6: tetrametil glucosa 2:3:6: trimetil glucosa.

Haworth supone debido a los resultados obtenidos que el almidón tiene en su estructura numerosos restos de glucosa unidos en cadena por medio de eslabones glucosídicos tal como se unen para formar maltosa.

Siguiendo por este camino Mac-Dowell obtuvo el mismo producto final únicamente que haciendo la metilación directamente, al introducir 2 grupos metílicos por cada resto de glucosa.



La mezcla de los oligosacáridos o sea los polisacáridos más simples, que se obtienen mediante la hidrólisis parcial del almidón por ácidos se puede metilar.

El producto final así obtenido, destilado da origen a éteres metílicos no cristalizables de trisacáridos o tetrasacáridos correspondientes, según los trabajos de K. Freudenberg.

Las más recientes investigaciones en el asunto establecen que los 2 componentes del almidón, amilosa y amilopectina, difieren fundamentalmente de su estructura, pues mientras que la amilosa es una mezcla de homólogos de varios grados de polimerización y de radicales azúcares unidos en una cadena de muy poca o ninguna ramificación, y con un peso molecular que fluctúa entre 10000 y 60000.

La amilopectina que posee un peso molecular, más elevado que se supone varía entre 50000 y 100,000, tiene por el contrario una estructura más ramificada, con uniones mediante grupos hidroxílicos a la cadena principal en posición 6 de los radicales de glucosa.

Esto se comprueba por el hecho de que si se lleva a cabo una fermentación alcohólica, la amilosa es transformada completamente, mientras que la amilopectina únicamente un 75% se transforma en maltosa.

CAPITULO I I I

PRUEBAS REALIZADAS CON AMILASAS DE MALTA BACTERIAS Y HONGOS.

Tres muestras de amilasas bacterianas fueron probadas.

Amilasa bacteriana I

Amilasa bacteriana I I

Amilasa bacteriana I I I

Las muestras I y II fueron usadas bajo la forma de extracto y la III en forma de polvo.

Debido a su bajo rendimiento en azúcares, realmente el objeto de las experiencias fué el de determinar su capacidad liquefaciente del almidón soluble y comprobar si había la posibilidad de ser sustituida la malta como agente liquefactor.

En consecuencia, el almidón de maíz una vez tratado con las amilasas bacterianas fué posteriormente sacarificado con *A. Orizae* desarrollado en salvado de trigo. La temperatura de conversión fué de 55°C (131°F).

Agente liquefactor	Relación del peso de grano en el medio			% Alcohol	% Conversión
Malta (Control)		A. Orizae	Maíz		
Malta (Control)	1.0	8	91	6.86	91.4
A. Bacteriana I	1.0	8	91	6.87	91.5
A. Bacteriana I	1.5	8	91	6.99	92.9
A. Bacteriana I	1.0	5	91	6.80	91.0
A. Bacteriana I	0.5	5	91	6.51	86.8
A. Bacteriana II	1.0	8	91	7.02	93.7
A. Bacteriana II	1.5	8	91	7.00	93.5
A. Bacteriana III	1.0	8	91	6.98	92.9
A. Bacteriana III	0.5	8	91	6.88	91.5

Como puede verse por la tabla anterior, el peso de maíz fué el mismo en todas las determinaciones, siendo el rendimiento teórico en alcohol de 7.5%.

Estos resultados indican que cuando cantidades iguales de malta y preparación bacteriana fueron usadas, con estas últimas se obtubieron rendimientos iguales o ligeramente superiores a los obtenidos con malta. Además, con la excepción hecha de la preparación bacteriana III que es una preparación concentrada, cuando el peso de la preparación bacteriana se redujo a la mitad del peso correspondiente al de la malta, hubo un sensible cambio en el rendimiento de alcohol.

Por otra parte, si bien no hubo una diferencia apreciable en los rendimientos de alcohol cuando se usó malta que cuando se usó la preparación bacteriana si se pudo apreciar que cuando el almidón fué convertido con amilasa bacteriana se encontró una considerable menor viscosidad que en el caso de la malta. Se hizo una rudimentaria prueba de viscosidad determinando con una pipeta volumétrica de 10 c. c. de capacidad el tiempo de escurrimiento para agua, masa licuada con amilasa bacteriana y masa licuada con malta encontrándose que los tiempos de escurrimiento son los siguientes respectivamente:

Agua; masa licuada con amilasa bacteriana;	masa licuada con malta
3	15
	100

Como corolario por lo que respecta a la liquefacción del almidón, las amilasas bacterianas son seguramente varias veces más potentes que

las amilasas de la malta, sin embargo, por lo que a la fermentación alcohólica respecta, con la excepción de la preparación bacteriana III, se requiere un peso igual de preparación bacteriana, el peso de malta para obtener un rendimiento en alcohol satisfactorio.

LIQUEFACCION CON ACIDO.

En la tabla II, se puede comprobar que los ácidos siguen siendo los agentes liquefactores más eficientes para el pretratamiento del grano. Rendimientos teóricos de conversión fueron consistentemente obtenidos 93-95% usando 5% de preparación de amilasa de hongos. En las experiencias se encontró que el ácido únicamente era satisfactorio como agente liquefactor cuando la amilasa de hongo era usada como agente sacarificador, porque cuando se usó malta, el cocimiento del almidón con ácido parece ser en detrimento del rendimiento de alcohol, debido probablemente a que el ácido hidroliza parte del almidón a dextrinas, y parte de estas dextrinas pueden ser sacrificadas por las amilasas del hongo mientras que no son atacadas por las amilasas de la malta.

TABLA I I.

Agente licuefactor	Relación del peso de grano en el medio		% Alcohol	% Conversión
	Licuefactor	Maíz		
	A. Orizae			
Malta (Control)	1	8 91	6.86	91.4
HCl concentrado	3	8 91	7.15	95.5
HCl concentrado	3	8 § 91	6.25	84.0

§ Quiere decir Malta.

PREPARACIONES CON HONGOS COMO AGENTES DE CONVERSION.

Como es ya bien sabido, los hongos contienen un gran número de enzimas: además de la Alfa y Beta amilasa, el contenido en enzimas cualitativa como cuantitativamente varía considerablemente de una especie a otra.

El hongo usado para llevar a cabo las siguientes experiencias fué el *Aspergillus, orizae* el cual se puede desarrollar en muchísimos medios

teniendo como fuente de carbón substancias tales como polisacáridos, hexosa, pentosa, triosa, glicerina, ácidos malico, láctico, cítrico, succínico, etc., y como fuente de nitrógeno sustancias que varíen desde sales de amonio y nitratos hasta purinas y pirimidinas. Algunos compuestos orgánicos funcionan simultáneamente como fuentes de nitrógeno y carbono tales como el ácido úrico y una variedad de aminoácidos. Los hongos además requieren pequeñas cantidades de sales inorgánicas para su crecimiento, desarrollándose la mayoría bastante bien en el medio de Czapeck.

La preparación obtenida se usó en diversas formas para determinar cual es la que da un rendimiento mejor como agente de conversión de los almidones.

Las muestras empleadas en las experiencias desarrolladas fueron cuatro preparaciones crudas desarrollando el hongo en salvado de trigo; dos muestras fueron extractos en agua del hongo desarrollado en salvado de trigo.

En las preparaciones crudas usadas, una de ellas consistió en dejar esporular el hongo por siete días para determinar si tenía o no influencia la edad del cultivo y el grado de esporulación en la actividad del enzimo.

También se hizo una prueba aereando el medio donde se desarrollaba el hongo para determinar la influencia de la aereación sobre la actividad del hongo.

El medio usado para desarrollar el *A. orizae* se preparó de la manera siguiente:

Salvado de trigo fué humedecido hasta un 60% de su peso con una solución conteniendo FeSO_4 (0.01 gr. 1000 c.c.) ZnSO_4 (0.01 gr. 1000 c.c.), HCl y el residuo de una fermentación alcohólica previa de algún cereal hasta obtener un PH de 4.5. Fué posteriormente esterilizado 45 minutos bajo una presión de 10 libras.

Después de enfriarlo a 40°C. una pequeña cantidad de esporas del hongo fué mezclada con el, colocándolo en charolas con falso fondo de alambre por el que hacía pasar aire manteniendo todo esto dentro de una estufa a 30 C. Debido al rápido desarrollo del hongo, después de 24 horas de la inoculación hay un aumento de temperatura y como la optima para el desarrollo del hongo es de 30° a 35°C. se logra mantener en este nivel rosiando un poco de agua fría estéril sobre el cultivo. Después de 50 a 60 horas la preparación estará lista para usarse.

Cuando se usó esta preparación cruda, la cantidad en peso fué equivalente a la cantidad correspondiente al peso de malta usado en la fermentación de control tal como puede verse en la siguiente tabla:

Agente de conversión	Relación del peso de grano en el medio		% Acohol	% Conversión
	Amilasa	Maíz		
Malta (Control)	8	91	6.5	89.0
A. Orizae I	8	91	6.54	89.5
A. Orizae I	5	91	6.60	90.0
A. Orizae II	8	91	6.73	91.0
A. Orizae II	5	91	6.59	90.8

I.—Muestra cruda

II.—Extracto en agua

En todos los casos se usó 1% de malta como agente licuefactor

A) Para determinar el efecto de la edad de la preparación del hongo sobre la actividad de la amilasa se hizo la siguiente prueba:

Sobre el salvado de trigo preparado en forma análogo al usado en la prueba anterior se inoculó *A. orizae* y se le desarrolló durante siete días a 30°C. hasta obtener una abundante formación de esporas. El cultivo fué posteriormente extraído en agua y se usó en concentraciones que variaron de cinco a ocho partes sobre el peso total del grano encontrándose que los rendimientos fueron inferiores que cuando se usó la preparación con un grado menor de esporulación tal como puede verse en la tabla número IV.

TABLA IV.

Efecto de la edad (Grado de esporulación) en la actividad de la amilasa de *Aspergillus Orizae*.

% En peso de <i>A. Orizae</i> bien esporulado §	Maíz	% de Alcohol
8 (Malta)	91	6.32
0.50	91	6.54
1.00	91	6.61
1.50	91	6.60
2.00	91	6.73

Cultivo joven de

A. Orizae

0.10	91	6.50
0.50	91	6.59
1.00	91	6.60
1.50	91	6.69
2.00	91	6.80

§ Extracto en agua

Tiempo de esporulación : 7 días

B) Para determinar el efecto de la aereación de la preparación de la amilasa del A. Orizae sobre la actividad de ella se llevó a cabo la siguiente prueba:

La inoculación se hizo sobre salvado de trigo preparado en condiciones idénticas a las anteriores con la única diferencia que durante todo el tiempo de desarrollo se le hizo pasar aire durante 24 y 48 horas.

El cultivo con 24 horas de aereación dió resultados un poco mejores que los obtenidos con el cultivo 48 horas tal como puede verse en la tabla número V.

TABLA V

EFECTO DE LA AEREACION EN LA ACTIVIDAD DE LA
AMILASA DE A. ORIZAE

	% Alc.	% en volumen en 24 horas	% en volumen en 48 horas
Malta (Control)	6.63	—	—
	6.73	5	—
	6.66	—	5
	7.02	10	—
	6.90	—	10
	7.15	15	—
	7.14	—	15

Como agentes de conversión fueron usadas dos muestras en el extracto de agua de la preparación amilásica del A. Orizae. Estos extrac-

tos fueron usados en forma líquida. Se encontró que son estas preparaciones excelentes agentes de conversión y los resultados obtenidos pueden observarse en la tabla número VI, en la que se podrá encontrar que la cantidad de extracto agregada equivale a las ocho partes en peso de la malta usada en la fermentación de control.

TABLA VI

Agente de Conversión	Relación en peso en 100 partes del medio		% Alcohol	% Conversión
	Aamilasa	Maíz		
Malta (Control)	8	91	6.47	88.6
Muestra 1	4	91	6.84	93.6
Muestra 2	4	90	6.79	92.6

Para preparar las muestras en forma de extracto en agua y de ahí obtener los extractos en alcohol a las primeras, esto es, a las muestras en forma de extracto en agua se les agregó alcohol hasta obtener una concentración alcohólica de 70%. Al producto precipitado por el alcohol se le separó y se secó al vacío a 30°C. conteniendo este producto cenizas por un valor de 14 a 16%. Para usar estas muestras para determinar su poder de conversión únicamente se usaron cantidades de extracto equivalentes a 1 y 2% del peso total del grano, pues por las primeras pruebas se encontró que este preparado daba altos rendimientos de conversión y que usándolo en una proporción que variaría de una a dos partes del peso total del grano se obtenían rendimientos de conversión más altos que los obtenidos con ocho partes en peso de malta.

Tanto en esta prueba como en la que se usó la preparación amilásica bajo la forma de extracto en agua se agregó 1% de malta que actúo como agente licuefactor ya que de esta manera la conversión dió como resultado un producto mucho menos viscoso que en todas las pruebas anteriores.

Sin embargo, debido al número tan limitado de pruebas realizadas, las cantidades respectivas de los diferentes extractos no pudieron ser determinadas para obtener un óptimo rendimiento en la conversión, ya que el objeto del trabajo era encontrar la mínima cantidad de preparación amilásica ya fuera bacteriana o de hongo que diese un rendimiento análogo a ocho partes en peso del grano total usado en la fermentación,

correspondiendo este peso a la malta que se usó como agente de conversión de control.

Los resultados obtenidos usando amilasa bajo la forma de extracto en alcohol y después usadas en forma sólida como polvo se encuentran en la tabla VII.

TABLA VII

Agente de conversión	Relación en peso en 100 partes del medio.		% Alcohol	% Conversión
	Amilasa	Maíz		
Malta (Control)	8	91	6.41	88.0
Muestra 1	0.375	91	6.52	89.1
Muestra 1	0.20	91	6.46	88.5
Muestra 2	1.0	91	6.66	91.3
Muestra 2	1.50	91	6.77	92.5

Según los trabajos de Hae, Fulmer y Underkefler, cuando la preparación de amilasa de hongos se agrega en intervalos hay un aumento en el rendimiento de alcohol. Esto se comprobó haciendo dos experiencias usando cinco y ocho partes en peso del grano total de preparación de amilasa. En un caso se agregaron tres quintas partes del peso de la preparación de amilasa al tiempo de la conversión y el resto o sea dos quintas partes del peso de la preparación de amilasa después de veinte horas de fermentación en la experiencia en que se usaron ocho partes en peso del grano total de preparación de amilasa al tiempo de la conversión se agregaron cinco octavos del peso total de la preparación y después de veinte horas de fermentación los tres octavos restantes. Los resultados obtenidos indican que hay un incremento de 1 a 2% en la eficiencia de conversión, así como en el rendimiento de alcohol cuando la preparación de amilasa de hongos es agregada a intervalos, según puede verse en la tabla VIII

TABLA VIII

% de amilasa agregada		% Conversión	% Alcohol
Primera adición	segunda adición		
8	—	94.0	6.89
5	3	96.2	7.10
5	5	96.0	7.03
3	2	96.2	7.12

El método que seguí para determinar el grado de conversión en cada una de las pruebas realizadas fué un método indirecto. En lugar de determinar la extensión de la conversión por medios ya fuera físicos o químicos, se hizo una posterior fermentación alcohólica del rendimiento en alcohol obtenido se calculó la cantidad de azúcar obtenida por la conversión.

Es decir, para tener una idea del mayor o menor poder sacarogénico de las diversas muestras de amilasas usadas, y así calcular la proporción en que deberán ser mezcladas con el grano cocido para obtener una conversión apreciable, si se hizo su determinación del poder dextrinificante y sacarogénico siguiendo el método de NEBRASKA modificado por Eric Kneen (Cereal Chem 16: 712-723) pero para las diferentes experiencias llevadas a cabo con el fin de simplificar el desarrollo del trabajo, se determinó indirectamente su poder sacarogénico como queda dicho anteriormente, valiéndose del rendimiento en alcohol después de fermentarse el azúcar obtenido por la conversión.

Aparentemente resulta ilógico lo anterior ya que el hecho de hacer una fermentación alcohólica implica necesariamente la introducción de una serie de factores nuevos que en mayor o menor grado pueden tener una influencia de los resultados finales.

Pero afortunadamente cuanto estos trabajos fueron desarrollados en los laboratorios de la Casa Joseph & Seagram, la técnica de la fermentación alcohólica en el laboratorio, debido al método de los señores Stark, Scalf y Kolachov, había sido encauzada dentro de límites tan rígidos que la posibilidad de un error debido a fallas de manipulación había sido reducido a un mínimo.

Esto fué lo que me indujo a seguir por este camino para determinar la eficiencia de la conversión en las diferentes pruebas realizadas en lugar de hacerlo directamente en las amilosas, método más laborioso para llevarme a la misma situación.

Encontrar dentro de todas las amilasas usadas, cual era la más viable para poder ser usada como un sustituto de la malta en la conversión de los almidones.

Con el objeto de uniformizar todas las pruebas realizadas y para trabajar siempre dentro de las mismas condiciones, todas las fermentaciones se llevaron a cabo siguiendo el método de Stark, Scolfy Kolachov el cual es lo suficiente flexible para ser usado en experiencias para gran variedad de materias primas así como distintas condiciones de fermentación. El método parte de preparar 1.5 litros de medio con una

concentración de 0.26 Kg. de medio o sea 38 galones de medio por bush el de gramo que es la concentración usada en escala industrial.

MOLIDO.—El grano se muele en molino hasta obtener una finura de 60 mallas.

2.—Se determina la humedad del grano secando en una estufa de aire 3 horas a 100-110° C aproximadamente 3 g. de muestra molida.

3.—**CONTENIDO EN ALMIDÓN.**—Contenido en almidón se determina por el método A.O.A.C. o sea digestión con HCL.

4.—**COCIMIENTO.**—Se ponen 883 c.c. de agua en un recipiente que se encuentre sumergido en un baño de agua, debiéndose dotar a dicho recipiente de una agitación mecánica continua; se calienta a 37.8°C (100° F) y se agregan 2.33 g. de malta de destilería; posteriormente se calienta a 54.4°C (130°F) y se añaden 241.2 g. de grano, en nuestro caso particular maíz.

Se deja entonces de calentar y se ajusta la acidez entre los límites de pH de 5.6-5.8 con H₂SO₄ N teniendo cuidado de regresar cuantitativamente la muestra al recipiente de donde se tomó.

Una vez ajustado el pH, se calienta nuevamente a 76.7°C (170°F) de tal modo de alcanzar esa temperatura en aproximadamente 20 min. y entonces se determina el volumen midiendo la distancia entre la superficie libre de la masa y al borde del recipiente y se anota.

Entonces se sigue calentando hasta 93.3°C (200°F) aprox. tan rápidamente como sea posible y se mantiene a esta temperatura durante una hora. Sin embargo, se puede empezar a contar ese tiempo cuando la temperatura sea de 85°C (185°F). Después de una hora, se agrega agua hasta igualar el volumen que había cuando se encontraba a 76.7°C. Se pone en el autoclave durante una hora bajo 22 libras de presión.

Como requisito indispensable se tiene que la masa durante todo el proceso anterior esté continuamente agitada, excepción hecha cuando se pierde el volumen y cuando esté dentro del autoclave.

CONVERSIÓN.—Una vez que la masa está fuera del autoclave después de una hora, a 22 libras, se pone en un baño de agua y se le vuelve a agitar continuamente. Es importante tener la temperatura del baño de agua entre 71.1°C y 76.6°C (160-170°F) cuando el grano cocido esté

enfriándose en él. Se enfría el baño de agua a 62.7°C (145°F) y se agrega el agente de conversión, consistente en 140 c.c. de agua y 20.95 g. de malta de destilería, cuando el grano cocido tenga una temperatura de 66.6°C (152°F).

El agente para la conversión se prepara unos 30 minutos aproximadamente antes de agregarlo al grano cocido, calentándose a 54.4°C (130°F) inmediatamente antes de añadirlo al grano. Esto se hace calentándolo en baño de agua y agitándolo de vez en cuando.

Se mantiene a 62.7°C (145°F) durante una hora, agitando constantemente, después de lo cual se enfría rápidamente a 25°C (72°F) y está listo el medio para la inoculación.

INOCULACIÓN.—Para preparar la inoculación, del medio preparandolo del modo anterior, se toma de un tubo de cultivo de la levadura que se vaya a usar con una haza de platino, y se pasa a un tubo conteniendo 10 c.c. de extracto de malta con una concentración de azúcares de 16° Balling. Se transfiere de ese tubo después de 24 hrs. de incubación a 30°C a 2 veces en el mismo medio a otros tubos conteniendo también 10 c.c. El contenido del tubo producto de la segunda transferencia se transvasa en Erlenmeyer conteniendo 200 c.c. del mismo medio, se incuba 20 hrs. a 30°C (86°F) y entonces estará lista para usarse como inoculación.

PREPARACIÓN DE LOS FERMENTOS.—Es fundamental para obtener una buena fermentación la preparación de los fermentadores ya que cualquier error, por pequeño que sea traerá como consecuencia una contaminación en la fermentación y lógicamente el trabajo no tendrá ningún valor.

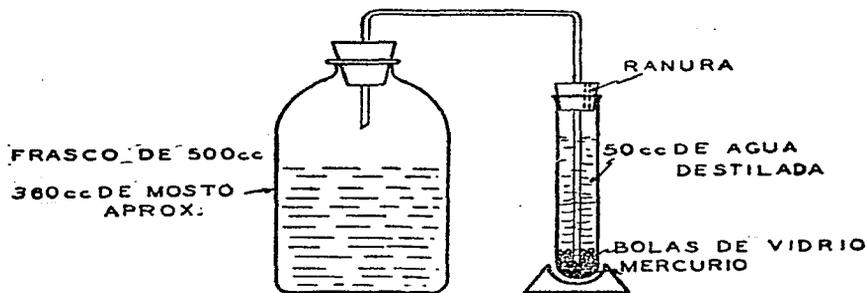
Una vez que el medio esté ya frío para inocularse se le ajusta nuevamente el pH a un valor de 4.8 con H_2SO_4N , y se ajusta también el volúmen final a 1500 c.c.

Se miden en una probeta graduada y estéril 350 c.c. del medio y se colocan en cada fermentador, previamente esterilizados inoculando con 7 c.c. del medio donde está la levadura (aproximadamente 2% en vol. del volúmen total).

A cada fermentador se les adapta en mecanismo para recoger el alcohol que puedan arrastrar los gases formados durante la fermentación, y que consiste en un tapón horadado con un pedazo de tubo de hule unidos a un tubo conteniendo 50 c.c. de agua destilada y en cuyo fondo

se colocan de 2-3 g. de Hg. metálico, y bolas de vidrio para aumentar el contacto.

Un tubo de vidrio unido al tubo de goma llega hasta quedar tangente a la superficie del mercurio; todo este aditamento debe esterilizarse previamente.



El esquema adjunto dará una idea más clara de la forma como deba adaptarse el fermentadorcito en la prueba para el laboratorio.

ANÁLISIS DE LA FERMENTACIÓN.—El análisis del medio antes de la fermentación se hace con el sobrante después de inocular los fermentadores. Se centrifuga y el líquido supernadante obtenido es usado para el análisis, en el que se hacen las siguientes determinaciones:

1.—pH con el Potenciómetro.

Acidez. Se toman 10 c.c. de muestra centrifugada y se tratan con 0.1N NaOH, usando fenoftaleína como indicador. Los resultados se dan simplemente como c c de NaOH 0.1N por 10 c.c. de muestra.

2.—Concentración en azúcar.

a) Maltosa, que se determina siguiendo el método de Stiles. Peterson & Fred. para azúcares reductores.

b) Azúcar total. De la muestra centrifugada se toman 5 c.c., se hidrolizan con 5 c.c. de HCl 1.38 N en baño de María dos horas y media y después se sigue el método para determinar azúcares totales de Stiles. Peterson & Fred.

3.—Balling que se determina en la muestra filtrada con un hidrómetro.

Una vez terminada la fermentación, el análisis de la muestra consiste en las siguientes determinaciones:

1.—% Alcohol. Se agita perfectamente el fermentador, se pesa y se calcula el peso del mosto en él, se toma exactamente la mitad de él que se pasan a un matraz de destilación junto con 25 c. c. de agua, contenidos en el tubo del fermentador. Se destilan 100 c.c. procurando que el recipiente en donde se reciba el destilado sea un frasco vol. y se encuentre en hielo. Una vez destilados 100 c.c. se deja que el frasco tome la temperatura ambiente, se enraza el menisco a la marca del cuello del matraz y se determina el % del alcohol por medio de un refractómetro de inmersión o de un ebuliómetro.

2.—pH

3.—Acidez de un modo análogo al de la muestra antes de la fermentación.

4.—Balling por medio de un hidrómetro.

5.—Azúcar total. De la misma manera que en la muestra antes de la fermentación.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

El mosto debe tener una concentración inicial en azúcares aproximadamente de 12 gramos por 100 c.c. Una concentración menor indicará un pobre cocimiento y bajo contenido en almidón en el grano. pH final arriba de 4.0. Un pH más bajo indica una contaminación bacteriana.

ACIDEZ.—Debe variar de 3.5-4.5. Una alta acidez, de la misma manera que un pH bajo, indica contaminación bacteriana.

BALLING FINAL.—Oscila entre 0.3 y 0.7 este valor para indicar una fermentación completa. Un valor alto tendría como corolario que la fermentación no estaba terminada.

CONVERSION.—Debe ser su alrededor de 98%, un porcentaje más bajo indicará un pobre cocimiento o bien la malta de bajo poder diastásico.

CALCULO DE LA EFICIENCIA DE LA FERMENTACION

El cálculo de la eficiencia de la fermentación se determina basándose en la cantidad de azúcar fermentada, aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{grs. de alcohol absoluto obtenido}}{\text{azúcar inicial} - \text{azúcar final}} \times 100 \times 0.511$$

$$\text{grs. de alcohol absoluto obtenido} = \% \text{ de alcohol} \times 0.791$$

Ejemplo:

$$\begin{aligned} \% \text{ de alcohol} &= 7.19 \\ \text{azúcar inicial} &= 12.06 \\ \text{azúcar final} &= 0.60 \end{aligned}$$

$$\frac{7.19 \times 0.791 \times 100}{(12.06 - 0.60) 0.511} = 95.41$$

El método utilizado para la determinación de la concentración de azúcares antes y después de la fermentación fue el de Shiles, Peterson y Fred, que puede ser empleado para muestras cuyo contenido en azúcares reductores varíe de 0.5 a 2 mgr. especialmente cuando se hallen en cultivos bacterianos.

I.—REACTIVOS

	Grs. litro
CuSO ₄ . 5H ₂ O	5.0
Na ₂ CO ₃ (anhidro)	40.0
KI	10.0
KIO ₃	0.7
K ₂ C ₂ O ₄	18.4
Acido Tartárico	7.5

El carbonato de sodio, se disuelve en cerca de 400 c.c. de agua caliente, se agita y se agrega el sulfato de cobre que junto con el ácido tartárico han sido previamente disueltos en 150 c.c. de agua. El yoduro y el yodato se disuelven en 250 c.c. de agua, se agregan a la solución alcalina de sulfato de cobre y se completa el volumen a un litro.

2.—SOLUCION DE ACIDO SULFURICO.

27 c.c. de ácido sulfúrico concentrado (1.84 de densidad) se diluyen a un litro, obteniéndose así una solución normal de ácido sulfúrico, que si se desea se puede ajustar exactamente.

3.—SOLUCION DE TIOSULFATO.

25 gr. de tiosulfato de sodio y un gramo de sosa cáustica se disuelven en agua y se diluyen a un litro. Esta solución se estandariza contra una solución valorada de $K_2Cr_2O_7.O.IN.$

Para preparar esta última solución 4.9033 grs. de dicromato de potasio puro y secado previamente varias horas a $110^{\circ}C$ se disuelven en agua y diluyen a un litro 25 c.c. de esta solución se pone en un vaso de precipitado que contienen 3 grs. de yoduro de potasio y 10 c.c. HCl concentrado. Se diluyen a 500-600 c.c. y se titulan con la solución de tiosulfato. Cuando se esté llegando al punto final de la reacción se agrega la solución de almidón. Cuando este pasa de un color azul a ligeramente verde, se ha llegado al punto final de la reacción.

Si se ha estado usando tiosulfato de sodio puro, no se deberán consumir más de 25 c.c. y la solución podrá fácilmente ser ajustada a 0.1 N diluyéndola con agua. Si por ejemplo en la titulación se gastarán 24.7 c.c. de tiosulfato, a cada 24.7 c.c. de esta solución se les agregará 0.3 c.c. de agua.

La solución de tiosulfato así preparada guardará sus propiedades por un tiempo mayor de un año. Para hacer una solución 0.005 N de tiosulfato de sodio, 25 c.c. de esta solución se diluirán a 500 c.c. y se deberá en todos los casos usar unos días a más tardar después de haberse preparado.

4.—ACETATO DE PLOMO BASICO.

Se prepara haciendo una solución en agua al 30% de acetato de plomo puro.

5.—SOLUCION DE FOSFATO DISODICO.

Para quitar el exceso de plomo se usa una solución al 10% de fosfato disódico; se requieren 3 c.c. de esta solución por cada c.c. de solu-

ción de acetato de plomo usado. Agréguese fenolftaleína y neutralícese si está ácido o alcalino.

PREPARACION DE LA MUESTRA PARA EL ANALISIS

Normalmente se clarifica la solución agregando el acetato de plomo, filtrando y quitando el exceso de este con carbonato de sodio u otro precipitante.

El precipitado formado se decanta del líquido sobrenadante. Se colocan 25 c.c. del cultivo o menor cantidad dependiendo del contenido en azúcar, en un matraz, se agregan unas gotas de fenolftaleína y se neutraliza con NaOH. Se agrega un c.c. de solución de acetato, se agita y después se agregan 3 c.c. de solución de fosfato. Se neutraliza, se diluye a 50 c.c. y se mezcla bien. Se deja reposar y se toma la parte alícuota necesaria para el análisis. Debe evitarse un exceso de acetato de plomo ya que parte del azúcar presente puede ser arrastrado por el precipitado.

DETERMINACION

Se toman 5 c.c. del reactivo en un tubo de 50 c.c. de capacidad y se agregan de 1 a 5 c.c. dependiendo de la cantidad de azúcar presente en la mezcla clarificada. Si se agregan menos de 5 c.c., se agrega suficiente agua hasta hacer un volumen de 10 c.c. Al mismo tiempo se lleva una prueba en blanco con 5 c.c. de agua y 5 c.c. del reactivo. Se tapan los tubos con tapones de corcho para evitar una posible oxidación y se calientan 15 minutos en agua hirviendo. Se enfría, se agregan 5 c.c. de H_2SO_4 N se agita bien y se deja reposar un minuto; se agrega entonces solución 0.005 N de tiosulfato de sodio y unas gotas de almidón como indicador.

Se continúa la titulación hasta que el color azul característico del yodo ha desaparecido.

Para conveniencia en la titulación es posible obtener mgr. de azúcar directamente de la diferencia en la titulación entre la muestra y la prueba en blanco.

Cuando se toma 1 c.c. del cultivo para esta determinación se aplicará lo descrito anteriormente; para muestras que contengan hasta 0.2% de glucosa. Si el porcentaje de azúcar es más alto, es necesario entonces diluir la muestra. Para muestras que contengan 0.5% de azúcar la dilución más cómoda es 1:0.

CAPITULO IV.

CONCLUSIONES.

1.—Las preparaciones amilásicas bacterianas usadas dieron una liquefacción satisfactoria del grano de cereal cocido cuando se empleó un peso de la preparación amilásica de bacterias análogas al peso de malta usado en las pruebas de control.

2.—Todas las preparaciones crudas de amilasa de hongo utilizadas, fueron eficientes factores de conversión. En este caso la eficiencia de conversión fué tan alta como la conversión obtenida con malta y, en consecuencia, los rendimientos en alcohol obtenidos usando como agente de conversión preparaciones crudas de amilasas de hongos fueron similares a los obtenidos cuando el agente de conversión usado fué malta.

3.—Cuando el agente de conversión usado fué un extracto en agua de la preparación amilásica de hongos se obtuvo una magnífica conversión, la cual mejoró cuando como agente de conversión se usó el producto obtenido de la extracción con alcohol de la preparación de amilasa de hongos ya que en esas condiciones se obtuvo una conversión análoga a la de la malta con un peso tres y cuatro veces menor.

4.—Haciendo el cocimiento del grano con tres partes de HC1 1.19 de densidad parece ser que se obtiene el método más eficiente para la liquefacción del almidón.

5.—Un ligero aumento en el rendimiento de alcohol que experi-

mentalmente se comprobó varía de 1 a 2% se debe a la adición de la amilasa de hongos a intervalos.

Los resultados obtenidos indican que las preparaciones de amilasa pueden ser usadas como buenos agentes de conversión de almidones, ya que en términos generales los rendimientos así obtenidos son similares a los rendimientos obtenidos con malta como agente de conversión amén de una competencia desde el punto de vista económico.

CAPITULO V.

BIBLIOGRAFIA.

- The Yeast. ALEXANDRE GUILLIERMOND. D. S.c. Traducida al inglés por
Fred Wilbur Tanner. MS. Ph. D 1920.
- Enzyme Technology. HENRY TAUBER. Ph. D. 1943.
- Enzyme Chemistry. HENRY TAUBER. Ph. D. 1937.
- Química Orgánica. Chemical Reviews. PERKINS Y KIPPINGS. *Wilkins, Williams y Compañía*. 1927.
- Química Orgánica. VICTOR VON RICHTER. 1941.
- Revista "Industrial and Engineering Chemistry". Volumen 37. Junio 1945.
- Revista "Industrial and Engineering Chemistry". Volumen 15. Julio 1943.
- Fundamentals of Distillery Practice.
- HERMEN F. WILLKIE Y JOSEPH A. PROCHASKA. Editado por *Joseph E. Seagraves y Co.*
- Food for Thought. HERMAN F. WILLKIE Y PAUL KOLACHOV. Editado por *Indiana Farm Bureau*. 1942.