

7-1-49  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICAS

---

**Determinación Comparativa de la Actividad  
Alfa y Beta Amilásica en las Maltas de  
Trigo, Maíz, Arroz, Cebada y Centeno**

**ESTE LIBRO NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**TESIS**

que presenta

**MARCOS CHAVEZ AZUELA**

para su examen profesional de

**QUÍMICO**

**MEXICO, D. F.**

**1949**

**1381**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*En recuerdo a mi madre  
Sra. Teresa Azuela de Chávez,  
a quien sigo queriendo y extrañando.*

*A mi padre  
Sr. Marcos Chávez Elizondo  
con todo cariño.*

*A Ma. de Lourdes, Carlos, Con-  
cepción, José y Dolores.*

*A mis tíos José L. Mandujano,  
Josefina E. de Mandujano y sa-  
milia, con la gratitud que les debo y  
el afecto que les conservo.*

*A la memoria de mi tío  
Dr. Sabino Elizondo  
con la misma sinceridad de mi padre.*

*A la memoria de mi maestro  
Ing. Quím. Eduardo Paz Herrera  
que sugirió este tema de tesis y diri-  
gió su desarrollo casi totalmente.*

*A mi tía Anita, a mis demás fami-  
liares, a todos quienes fueron mis  
maestros.*

*Agradezco todas las atenciones de  
aquellas personas que en cualquier  
forma facilitaron mi trabajo.*

**DETERMINACION COMPARATIVA DE LA ACTIVIDAD ALFA Y  
BETA AMILASICA EN LAS MALTAS DE TRIGO, MAIZ,  
ARROZ, CEBADA Y CENTENO**

- I.—Materias primas.—Las empleadas hasta ahora en la fabricación de malta y aplicaciones industriales de ésta en nuestro país.—Capacidad productiva de México para los cereales indicados.—Sus caracteres químicos.
- II.—Consideraciones sobre el almidón: características, demolición y cambios químicos generales provocados por actividad enzimática.
- III.—Caracteres y propiedades generales de las amilasas.—Métodos para determinar las actividades alfa-beta-amilásicas y poder licuefaciente.—Selección del más adecuado.
- IV.—Malteado del trigo, maíz, arroz, cebada y centeno en Proceso de Laboratorio y a igualdad de condiciones.—Determinación de la actividad alfa y beta amilásica, antes y después de germinar.
- V.—Conclusiones.

## CAPITULO I

### **M A T E R I A S   P R I M A S**

#### **a.—LAS EMPLEADAS HASTA AHORA EN LA FABRICACION DE MALTA Y APLICACIONES INDUSTRIALES DE ESTA EN NUESTRO PAIS**

Los cereales con germinación controlada producen malta pero sólo la cebada ha dominado como verdadera materia prima. Su preferencia no disminuye, sin embargo, la posibilidad de que otros granos con características determinadas sean considerados con un valor idéntico o análogo. Sobre el particular se efectúan diversas investigaciones y ya en 1663 John Winthrop proponía una técnica especial (2) para maltear el maíz y ponderaba las cualidades de la bebida que obtenía.

Indudablemente, la principal propiedad de la malta estriba en el valor de su actividad enzimática que aprovecha la Industria Cervecera que, por ser tan extensa, retiene para sí la aplicación primordial de aquélla. México ha conservado con los demás países ese aspecto un tanto tradicional de fabricar malta a base de cebada y dedica su producción, casi en exclusivo, a ese mercado (2, 13) y en orden decreciente de importancia a las industrias de licores, de panificación, de galletas y pastas alimenticias. La malta verde y las raicillas se ocupan en la fabricación de levaduras. Por la demanda industrial, no se ha presentado la oportunidad de ocuparla ampliamente en la economía ganadera, donde reportaría todos los beneficios de su valor nutritivo.



Algunos países evaporan una infusión de malta para obtener una especie de concentrado que, hecho polvo, se emplea en la industria textil para el desalmidonado o desengomado de las telas; y también, en la preparación de ciertos tipos de alimentos. Este último aspecto está completamente desarrollado y son muchos los productos que incluyen malta sobresaliendo los destinados a regímenes de alimentación infantil y algunos medicinales.

Los cereales motivo de este estudio, trigo, maíz, arroz, cebada y centeno, son bastante conocidos. En México, los tres primeros forman parte de la alimentación popular y el conocimiento del conjunto se remonta a épocas completamente primitivas.

Sin embargo, no se ha precisado el origen del trigo (10) y se cree que en tiempos prehistóricos haya crecido como hierba común cuyo cultivo se desarrolló posteriormente; se dice que es nativo del Asia Menor. Por lo que hace a sus transformaciones, la molienda queda en primer término y se ha concluido que la practicaban pueblos clásicamente antiguos, como los Romanos. Pero tal vez, los Egipcios quedan a la cabeza en este arte y en el de la panificación misma; entre ellos, el pan constituía no sólo su principal alimento sino también parte de su sistema monetario junto con una bebida de cierta semejanza con la cerveza; en sus tumbas, se han encontrado muestras de pan bien conservado, a veces con restos de levadura. Son citas que no se refieren específicamente al origen del trigo, pero que sirven para fijar una idea de relación.

El maíz, es un grano completamente familiar para nosotros y aunque se ha discutido su origen, todo parece indicar que pertenece a América. Los conquistadores Españoles lo encontraron en los diferentes puntos del continente descubierto y según Humboldt vegetaba desde Pensilvania hasta la costa más meridional de Chile. Entre los aborígenes, el maíz no sólo era conocido y cultivado sino que ya lo empleaban en algunas de las formas que típicamente se han conservado, y expresaban a sus Divinidades la gratitud que les debían por cosechas abundantes. Cortés, dice Humboldt, describía a Carlos V entre los artículos del mercado indio una miel de caña de maíz (4).

Los escritores Europeos sobre asuntos agrícolas nunca mencionaron al maíz dentro de sus obras, ni el Dr. Ebn-el Awan (4) que escribió en el siglo XII cuanto se sabía de la agricultura de los

Arabes en España y lo que sabían los Persas y Caldeos. Y De Candolle arguye en pruebas del exotismo del grano en el antiguo mundo, que no ha tenido un nombre propio en las lenguas del mismo.

El arroz, de acuerdo con las tradiciones y leyendas es originario de la China e India. Aquí y en Japón, su producción responde a una necesidad de primer orden. Se cree que en el curso de su propagación pasó de la costa Africana del Mediterráneo a España e Italia. Los Españoles, que desde el principio de su conquista se apresuraron a importar de su país todos aquellos alimentos a que estaban acostumbrados, trajeron entre otros granos el arroz e iniciaron su cultivo. Las semillas llegadas de China y Filipinas a la costa del Pacífico, se extendieron por toda ésta. (11).

También el origen de la cebada se desconoce con precisión y seguramente que se remonta a la misma época de los otros cereales. Su empleo en la fabricación de malta data de la época de los Egipcios, Tracios, Griegos y Germanos de quienes se dice que en el año 30 ó 40 A. C., elaboraban una bebida a base de esta gramínea. Cultivada y empleada en el continente Europeo, desde entonces, adquirió una importancia muy especial en la fabricación de malta y atrajo toda la atención debida; en 1890, Suecia se dedicó al estudio técnico y científico del asunto, a quien siguieron Francia en 1901 y los Estados Unidos de Norte América en 1904. Principalmente, se preocupaban por seleccionar variedades que respondieran con eficacia a las necesidades de la industria cervecera que empleaba la malta con ellas fabricada. A México llegó el cereal en la época de la Colonia y el establecimiento de la primera fábrica en 1906 originó mayor interés por la cebada. El Gobierno, a falta de Laboratorios especializados del tipo de los Suecos o Franceses, otorgó concesiones a cambio de la introducción de cebadas importadas de buena calidad para aclimatarlas en territorio nacional. En 1930 y 1931 se establecieron otras dos industrias para satisfacer la demanda de malta provocando, de paso, una intensificación en el cultivo de la cebada.

El centeno ofrece en cuanto a sus antecedentes históricos menos datos que los granos anteriores. Posiblemente su empleo en las diferentes épocas se ha reducido a suplir al trigo en aquellos lugares donde éste prospera con alguna dificultad, ya que su cultivo es menos exigente y más adaptable a condiciones diversas.

Principalmente, han sido trigo y centeno la base de la fabricación de pan.

## b.—CAPACIDAD PRODUCTIVA DE MEXICO PARA LOS CEREALES INDICADOS

México es un país esencialmente agrícola y sus posibilidades son amplias a pesar de las causas que de manera tan sensible han desequilibrado nuestra producción. Los reportes oficiales presentan el siguiente cuadro en lo que toca a los cereales que incluye este trabajo.

**TRIGO.**—A partir de 1925 la curva de producción no ha sido estable ni ha tendido al aumento; las altas de consideración sólo las hubo en 1931, 40 y 41 y la estimación para 1945 llegaba a valores inferiores de los de 1927. El promedio de producción de 1925 a 1942 fué 389,509 Tons. (519,041 Ha.); de 1942 a 1945, 377,430 Tons. (520,484 Ha.); de 1945 a 1948, 388,118 Tons. (12-a).

Directamente se consume poca cantidad. Su harina se emplea en panificación y en las industrias de galletas, pastas alimenticias y levaduras; el salvado, en la de alimento para animales y algo también en panificación.

Sólo Nayarit, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo, no produjeron trigo durante el período que comprende 1942 a 1945. En el mismo, el primer lugar (50,000 a 100,000 Tons.), le correspondió a Ccahuila, Sonora y Guanajuato; el segundo (25,000 a 50,000) a Michoacán y México; el tercero (10,000 a 25,000) a Chihuahua, Jalisco, Durango y Puebla; la producción mínima (menos de 100) a Guerrero, Baja California (territorio Sur) y Distrito Federal.

**MAIZ.**—Las cifras son más o menos comparables en los años de 1926, 28, 31, 41 y 45; solamente 1944 ofrece un dato mayor pero los puntos intermedios son inferiores. Los promedios de 1925 a 1942 son 1,839,969 Tons. (3,124,001 Ha.); de 1942 a 1945, 2,094,279 Tons. (3,383,250 Ha.); de 1945 a 1948, 2,479,586 Tons. (12-b).

El necesitado por la industria queda más o menos distribuido en la siguiente forma: la proporción mayor en las fábricas de almidón y alimentos para animales; después, en las de licores, levaduras y otros usos menos importantes. Las cervecerías ocupan una

fuerte proporción de granulado y maimilo. Los productos del maíz se ocupan en gran escala en las industrias de panificación, de galletas, pastas y levaduras.

Por Decreto (7) del 7 de septiembre de 1943. se prohibió la fabricación de whiskies y licores o de cualquiera otra bebida que ocupara maíz como materia prima; sólo concedía el empleo de grano importado.

Se cultiva en el país de una manera muy generalizada; el primer lugar (100,000 a 300,000 Tons.), correspondió en el período de 1942 a 1945 a Jalisco, Guanajuato, México, Oaxaca, Michoacán, Veracruz, Guerrero, Puebla, Zacatecas. El segundo (50,000 a 100,000), a Chiapas, Sinaloa, San Luis Potosí, Durango, Nayarit, Tamaulipas e Hidalgo y el mínimo (abajo de 5,000), a Baja California (los dos territorios), y Quintana Roo.

**ARROZ.**—Conservó su producción más o menos estable desde 1929 hasta 1937; subió de 1937 a 39, se mantuvo hasta 43 y subió en 1945 a poco más del doble de 1929. Los promedios son: de 1929 a 1941, 55,126 Tons. (39,632 Ha.); de 1942 a 1945, 89,929 Tons. (62,457 Ha.) de 1945 a 1948 140,322 Tons. (sólo el último es dato para arroz palay) (12-c).

La mayor cantidad se emplea en cervecería; la menor, en su molienda y beneficio y en la fabricación de levaduras. La camiseta se ocupa como combustible.

Sólo quince Estados lo producen: en primer lugar (25,000 a 50,000 Tons.), Sonora y Morelos; en segundo (10,000 a 25,000) Michoacán. La zona mayor sólo de 1,000 a 5,000 y la producción mínima (menos de 1,000) corresponde a Nayarit, México, Campeche y San Luis Potosí.

**CEBADA INDUSTRIAL.**—Su producción fué aumentando hasta 1936; bajó aproximadamente en una tercera parte, de 1937 a 39; aumentó algo en 1940 y en 1941 casi duplicó la producción de 35; en 1942, tuvo otra baja. Los datos promedio son: de 1935 a 1940, 9,944 Tons. (10,512 Ha.); de 1941 a 1942, 18,901 Tons. (19,111 Ha.); de 1945 a 1946 30,683 Tons. (12-d).

La industria de la malta consume casi toda su producción; sólo se muele una pequeña parte para usos diversos.

El primer lugar (10,000 Tons. o más) corresponde al Territorio Norte de la Baja California; el segundo (1,000 a 5,000) a Nuevo

León y Coahuila; el tercero (100 a 1,000) a Hidalgo, Guanajuato, Tlaxcala, Puebla, México y Michoacán. El resto, produce menos de 100.

**CENTENO.**—Por tratarse de una planta de poca utilidad industrial o doméstica, su cultivo está muy restringido y no se dispone de estadísticas que den informes al respecto. Se le obtiene sólo en determinadas zonas de los Estados de Puebla y Tlaxcala. Lo consumen las fábricas de Chihuahua, Nuevo León y Distrito Federal, para la elaboración de whiskey. Su harina es de calidad inferior a la de trigo, pero se le ocupa en la fabricación de pan especial. (5).

### c.—SUS CARACTERES QUÍMICOS

**TRIGO.**—Reino vegetal, sub-reino Fanerógamas, tipo Angiospermas clase Monocotiledóneas, familia Gramináceas, género Triticum; especie vulgare o sativum, durum, etc.

Existen muchas variedades difíciles de distinguir por su gran semejanza. Se las agrupa según su consistencia y color; según la estación del año en que germinen o desarrollen y también de acuerdo con la ausencia o presencia de barbas en la espiga (5).

Se le ha señalado la siguiente estructura física (10):

La epidermia forma	0.5 %
El epicarpio	1.0 "
El endocarpio	1.5 "
La testa	2.0 "
La membrana del embrión	3.0 "
El germen o embrión	2.0 "
El endospermo	90.0 "

Algunos investigadores citan los siguientes análisis (1) de algunas variedades:

Análisis	%	Ingléses	Ingléses	Rusos	Canadienses	Argentinos
Agua	"	10.74	13.56	12.77	13.97	12.29
Proteínas	"	11.98	12.42	17.26	12.48	13.12
Grasas	"	1.29	1.73	1.59	1.57	1.43
Minerales	"	1.37	1.84	1.71	1.73	1.58
Celulosa	"	2.26	2.38	2.13	2.88	2.73
Almidón,						

azúcares,					
gomas y					
dextrinas	"	72.15	67.69	64.38	67.17
Indeterminados	"				68.60

El principal constituyente del endospermo es el almidón que se presenta en forma de gránulos de proporciones y caracteres más o menos precisos con la capa periférica de su membrana constituida de celulosa (O.Masche).—Se observan gránulos grandes (Diám. 15 micras) intermedios (Diám. entre 7.5 y 15 micras) y pequeños (Diám. menor de 7.5 micras) de los cuales se obtendrían por cuenta (Grewe y Bailey) 12.75, 6 y 81.25% y por peso (Stamberg) 93, 2.9 y 4.1%, respectivamente. No existe entre los varios tamaños una diferencia marcada en el contenido de iósforo ni en la proporción de amilopeptina a amilosa. Los gránulos grandes afectan la forma de esferoides o discos y los chicos, son más o menos esféricos. A la luz polarizada puede apreciarse que algunos pierden en su centro algunos cruzamientos y que otros, no muestran líneas (9). Sjostrom ha notado que a bajas temperaturas (65-70°C.) los gránulos se transforman en una especie de bolsa, pero que cerca del punto de ebullición adquieren una forma curva característica.

J. R. Katz al estudiar (14) las propiedades del almidón de trigo con el agua, concluyó que el hinchamiento y endurecimiento de aquél en ésta, era un proceso de equilibrio que depende de la temperatura y de la cantidad relativa de agua presente.

Es el almidón de trigo, el menos higroscópico (W. Nossian). En las experiencias sobre la viscosidad (Rask y Alsberg) se observó que a 25° las lecturas respectivas decrecían sucesivamente y a 90° eran prácticamente constantes; lo que se atribuyó a efectos plásticos a las más bajas temperaturas. Los almidones de trigo de invierno exhiben viscosidades más altas que los de verano.

Sus gránulos se rompen menos rápidamente que los de centeno por acción de hidróxido de potasio diluido; lo cual podría aprovecharse para cuanteos o diferenciaciones.—No se colora con rojo neutro, azul de metileno o vesuvina. (Schuetz y Wein).

**MAIZ.**—Reino vegetal, sub-reino Fanerógamas, tipo Angiospermas, clase Monocotiledóneas, familia Gramináceas, género Zea, especie maíz. Sus variedades son excesivamente numerosas. Se

le agrupa atendiendo a la semejanza de caracteres de los granos ya sea en su naturaleza misma como en la división de Foex (5) con siete variedades o bien de acuerdo con el tamaño del tallo y mazorca, distribución y color de los granos como en la Heuze (4) con dos clases y un total de treinta y cinco variedades. La división de Sturtevant (4) con ocho grupos y ochocientas variedades se basa en la transparencia de la semilla y composición del endospermo.

Las partes del maíz, tallos y olotes, dedicados a forrajes o alimentación de animales en general, deben su valor nutritivo a la no escasa proporción de proteínas e hidratos de carbono que contienen.

El grano consta de las partes siguientes (3):

- 1.—La corteza o tegumento delgado externo. Es fibra.
- 2.—Una ligera capa de gluten rico en proteínas (50%), algo de almidón (35%) y aceite (5%).
- 3.—A los lados del grano y entre la capa de gluten, una mezcla de éste y almidón, aproximándose un poco hacia el centro.
- 4.—Ocupando el extremo de la corona, arriba del germen y rodeando a éste hacia su extremidad inferior, se encuentra el almidón que también contiene trazas de aceite y 5 a 8% de proteínas.
- 5.—El germen, que se encuentra en la parte anterior del grano hacia la punta. Generalmente se extiende hasta la mitad o dos tercés partes de la longitud de la semilla. Contiene proteínas, mucho aceite y gran cantidad de minerales.

Químicamente, del 15 al 20% de la semilla es agua y el resto acusa la siguiente composición (Corn Industries Research Foundation):

Almidón y otros carbohidratos	80.0 %
Proteínas	10.0 "
Aceites	4.5 "
Fibra	3.5 "
Cenizas	2.0 "

Las cenizas las forman sales de calcio, magnesio, aluminio, fierro, sodio, potasio y cloro.

Osborne, Chittenden, etc., estudiaron las proteínas del maíz y en términos generales son albúminas (solubles en agua, precipitables por sales neutras en disolución saturada), globulinas (insolubles en agua, solubles en disoluciones diluidas de sales neutras, precipitables por sulfato amónico a semi-saturación) y prolaminas o gliadinas (solubles en alcohol de 70 a 80%, ricas en prolina y ácido glutámico; Zeína). (8).

Los gránulos que provienen de la corona o parte harinosa de la semilla son prácticamente redondos y los de la zona córnea, poligonales. El tamaño varía, pero para ambos puede darse como valor promedio 15 micras. Los límites superiores son 25-26 micras y en los almidones de manufactura moderna son pocos los gránulos con menos de 5 micras. La mezcla de éstos tipos, es rara. Observados en la propia semilla presentan un núcleo circular pero en los almidones molidos y secados se reemplaza por una cavidad de la cual parten fisuras radiadas. El eje de polarización aparece en el núcleo o centro geométrico (9).

Se le ha escogido para investigar los constituyentes no carbohidratos del almidón por ser común y por su relativamente alta proporción de ácidos grasos combinados (0.61%.—Taylor y Nelson).

Los ácidos grasos no saturados asociados con el almidón de maíz son palmítico, oleico y linoleico; los dos últimos, identificados por sus productos de oxidación (Taylor y Lehrman; Jour. Am. Chem. Soc. 1926; v.48 p.1739).

La temperatura de gelatinización se encontró variando entre 64° y 71° de acuerdo con la variedad.

A 90° la viscosidad de una suspensión de almidón de maíz al 5% fué alrededor de 30 veces mayor que a 25 (Alsberg y Rask. Cer. Chem. 1924; p.107).

**ARROZ.**—Reino vegetal, sub-reino Fanerógamas, tipo Angiospermas, clase Monocotiledóneas, familia Gramináceas, tribu Orizeas, género Oriza, especie sativa, denudata, etc. Las variedades son numerosas y como en los casos anteriores, los grupos se han formado de acuerdo con la semejanza de los caracteres externos que convencionalmente se adoptan como referencias (6).



La composición química del arroz, en su valor medio, es más o menos la siguiente (11):

Agua	13.17 %
Substancias nitrogenadas	8.13 "
Grasas	1.29 "
Almidón y otros carbohidratos	75.50 "
Celulosa	0.88 "
Cenizas	1.03 "

Los gránulos de este almidón son los más pequeños de todos los comerciales y su tamaño varía entre 3 y 8 micras; por lo cual, sus propiedades características tales como núcleo, estrías y líneas a la luz polarizada no pueden apreciarse. Son poligonales y a veces se agrupan afectando la forma de racimos o de cuerpos redondos.

**CEBADA.**—Reino vegetal, sub-reino Fanerógamas, tipo Angiospermas, clase Monocotiledáneas, familia Gramináceas, género *Hordeum*; especie vulgar: *hexastichum*, *zeocriton*, *distichum*, etc. Incluye muchas variedades y razas. Comúnmente se la divide según el número de espiguillas fértiles que tenga la espiga o por la disposición de los granos en la misma.

La paja es de composición variable y la mayor parte (A. S. Norman) es celulosa, hemicelulosa y lignina; la cantidad de substancias nitrogenadas llega apenas de 2 a 4%.

El grano consta de la siguientes partes:

- 1.—La cubierta, formada de tres capas de células de diferente forma, debajo de la cual existe una película que encierra apretadamente el grano y que forma el pericarpio que tiene adherido el tegumento de la semilla.
- 2.—El endospermo o masa feculenta que constituye la mayor parte.
- 3.—El embrión o germen que se encuentra en la parte más baja; da lugar al tallo y a las hojas y lo rodea el escutelo que lo divide del endospermo. Entre éste y aquél, existe una zona definida que la constituye el epitelio secretor; lo forman células que generan algunos de los enzimos, ya que otros se desarrollan en las de aleurona.

Contiene de 10 a 20% de humedad y el análisis es el siguiente:

ite:

Almidón ..	60.0 - 80.0 %
Pentosanos	8.0 - 12.0 "
Celulosa	4.0 - 5.0 "
Lignina	4.0 "
Substancias nitrogenadas	7.0 - 14.0 "
Extracto etéreo	2.0 - 3.0 "
Cenizas	2.0 - 3.0 "
Sacarosa	1.5 - 2.5 "
Invertina	0.1 - 0.5 "
Pectina	0.5 - 1.0 "

Las cenizas, a su vez, están constituidas por (Wolff):

$K_2O$	23.3 %	$CaO$	7.2 %
$Fe_2O_3$	1.1 "	$SO_3$	51.0 "
$Na_2O$	3.5 "	$MgO$	2.6 "
$P_2O_5$	4.2 "	$Cl$	3.2 "

Los carbohidratos principales corresponden a celulosa, almidón, dextrinas, maltosa, sacarosa, rafinosa, dextrosa y levulosa.

Por lo que respecta a las grasas se encontró (Stellwaq):

Acidos grasos	13.62 %	Lecitina	4.24 %
Grasa neutra	77.78 "	Colesterina	6.08 "

Las proteínas se estiman representadas en las siguiente forma (Osborne):

Leucosina (albúmina)	0.30 %
Albumosa, Edestina (Globulinas),	1.95 "
Hordeína (Gliadina o Prolamina)	4.00 "
Albuminoides insolubles	4.50 "

Las capas externas de la mayoría de los cereales producen al madurar, algunas materias resinosas que a causa de su relativa insolubilidad protegen el interior del grano.

Generalmente, el almidón de la cebada se presenta formando una mezcla de gránulos grandes y pequeños, de aspecto circular o elíptico cuyas medidas varían de 20 a 35 micras y de 2 a 6, respectivamente. No se distinguen núcleo, fisuras o estrías aún

en los gránulos grandes. A la luz polarizada aparecen uniformemente iluminados y sin líneas (9).

**CENTENO.**—Reino vegetal, sub-reino Fanerógamas, tipo Angiospermas, clase Monocotiledóneas, familia Gramináceas, género *Secale*, especie cereal. Sus variedades son muchas y sus divisiones bajo la misma base de las anteriores.

El que sigue es un análisis de centeno común:

Humedad	11.0 %
Cenizas	2.0 "
Proteínas (N x 6.25)	11.6 "
Extracto etéreo	1.7 "
Fibra cruda	2.0 "
Pentosanos	8.5 "
Azúcares totales	4.0 "
Otros carbohidratos	59.2 "

Sus gránulos se rompen más rápidamente que los de maíz o trigo por acción del hidróxido de potasio diluido (Baumann) y se hinchan, también con más facilidad que otros almidones, en las soluciones de salicilato de sodio (W. Lenz).

Como el trigo, tampoco se tiñe con rojo neutro, azul de metileno, vesuvina o tionina.

## REFERENCIAS

- 1.—**AMOS, PERCY A.**—Processes of flour manufacture. Londres, Longmans Green & Co. 1920.
- 2.—**BROWNE, CHARLES A.**—Chronica Botanica. Waltham Mass., The Chronica Botanica Co., III, I: 80.1944.
- 3.—**CORN INDUSTRIES RESEARCH FOUNDATION.** Corn in Industry. 1944.
- 4.—**CHAVEZ, EDUARDO.**—Cultivo del maíz. Secretaría de Fomento. 1913.
- 5.—**ESCOBAR, ROMULO.**—Enciclopedia agrícola y de conocimientos afines. C. Juárez, Chih., Escuela Particular de Agricultura. I:313, 691-709; II: 636. 1942.
- 6.—**Estación Agrícola Central, México.** Explotación del arroz. 1911.
- 7.—**JIMENEZ, ANTOLIN.**—Leyes de alcoholes: 172. 1946.
- 8.—**KARRER, PABLO.**—Tratado de Química Orgánica. Ed. Manuel Marín. 352. 1941.
- 9.—**RALPH W.**—Chemistry and Industry of Starch. New York Academic Press Inc. 1944.
- 10.—**MILLAR, ANDREW.**—Wheat and its products. Isaac Pitman and Sons. 1916.
- 11.—**RUIZ VELASCO, C.**—El cultivo del arroz. México, Ed. Agr. Trucco: 10. 1941.
- 12.—**SECRETARIA DE AGRICULTURA, México.** Estadísticas de confronta. Boletín 227: 1. Monografías comerciales. Boletín 229: 16-36, 230: 6-7. 1945.
  - a.—1924-42 Trigo, series estadísticas. Boletín 227.  
1944 Idem. Boletín 234.  
1945-46 Idem. Boletín 263.
  - b.—1925-41 Maíz; superficie, rendimiento, producción, etc.  
1943 Idem. Boletín 222.  
1944 Idem. Boletín 234.  
1945-47 Idem. Boletín 268.
  - c.—1929-43 Arroz limpio, producción. Boletín 224.  
1945 Idem. Boletín 244.  
1945-47 Arroz palay, cosechas.  
1948 Idem. Boletín 269.
  - d.—1935-46 Cobada para malta, series estadísticas.
- 13.—**SECRETARIA DE LA ECONOMIA NACIONAL, México.**—Tercer censo industrial de los Estados Unidos Mexicanos: Almidón y alimentos para animales: 7-20. Beneficio, molienda y preparación del arroz: 7-16. Levaduras y maltas: 7-21. Molienda y preparación de maíz, cebada, etc.: 17-18. Panaderías y pastelerías: 7-23. Vinos y licores: 7-33. 1940.  
Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos: 682. 1941.  
Anuario estadístico del comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos: 474-503. 1941.
- 14.—**WALTON, ROBERT P.**—A Comprehensive Survey of Starch Chemistry. New York, The Chemical Catalog Co.: I. 1928.

## CAPITULO II

### CONSIDERACIONES SOBRE EL ALMIDON: CARACTERISTICAS, DEMOLICION Y CAMBIOS QUIMICOS GENERALES PRO- VOCADOS POR ACTIVIDAD ENZIMOTICA

Se dejó dicho en el capítulo anterior que el principal compuesto de los granos en estudio es el almidón y se describieron algunas de las características que más o menos podrían diferenciar el que cada uno de ellos contiene.

Por otra parte, las amilasas actúan sobre substratos de almidón provocando cambios y transformaciones que se ocupan para medir su actividad.

Ya sea pues como constituyente del grano en que se operan los desarrollos enzimáticos que origina la germinación o como materia de ataque para el enzimo, el almidón forma un compuesto químico de interés.

Durante los últimos años han sido muchas las investigaciones dedicadas a formalizar la estructura química del almidón y la magnitud de su molécula. Las técnicas de separación de las partes constitutivas, su precipitación por alcoholes, sus análisis ópticos y de rayos X, la adsorción selectiva sobre celulosa según los métodos iniciados por Tanret, las titulaciones potenciométricas con yodo, los trabajos contemporáneos de Irvin, Haworth, Hanes, Myrback, Richardson, Staudinger, Freudenberg, Meyer, Kerr, etc. sólo forman parte de los estudios que se realizan para el objeto mencionado. Saussure interpretó, hace alrededor de 130 años, la formación de glucosa por reacción hidrolítica del almidón y aisló la maltosa como producto intermedio..

Independientemente de las discrepancias estructurales, se ha aceptado la idea de que la molécula de almidón está compuesta de dos carbohidratos, polímeros de la glucosa, de propiedades y constitución marcadamente diferentes. El de menor proporción, la amilosa, parece estar formado por cadenas lineares de 200 a 300 alfa-D-glucopiranosas unidas por ligaduras en posición 1-4 y con un grupo final no reductor por molécula. La otra fracción, la mayor, se ha designado como amilopectina; se supone una molécula grande (unas 1.000 glucosas con un grupo final no reductor par cada 20 o 30), compleja, ramificada con inserciones unidas por ligaduras 1-6. En algunos casos, el 50% de la molécula lo forman las cadenas laterales insertadas a la porción principal de la estructura; y en otros, ésta se complica por la presencia de fosfatos esterificados aparentemente unidos a los oxhidrilos del átomo de carbón 6.

A la amilosa se señalan las siguientes características:

- 1.—Se adsorbe fuertemente sobre la celulosa (algodón o papel filtro) obteniéndose una separación de componentes.
- 2.—La beta-amilasa prácticamente agota el 100%.
- 3.—Da con el yodo un color azul oscuro.
- 4.—Absorbe grandes cantidades de yodo isopotenciamente.—La titulación potenciométrica constituye una manera práctica de determinar el almidón o sus fracciones. Al agregar yodo a una amilosa se alcanza un valor constante mientras se toma un peso aproximadamente igual al 18.7% de la amilosa; en este punto, al adicionar más yodo se observa una elevación rápida porque se toma a potenciales más altos.—El potencial característico es función de la longitud de la cadena y disminuye cuando ésta aumenta.
- 5.—Prácticamente cristaliza en su totalidad con butanol u otros agentes.
- 6.—Alta viscosidad; poca estabilidad de la solución, a concentraciones acuosas ordinarias.

Y estas otras para la amilopectina:

- 1.—No es adsorbida por la celulosa.
- 2.—La beta-amilasa sólo transforma el 50 %.
- 3.—Da con el yodo un color rojo púrpura o rojizo.
- 4.—No absorbe yodo isopotencialmente.
- 5.—No forma un complejo cristalino con el butanol pero da los tipos "A" (que se obtiene por evaporación de las pastas entre 80° y 90° C.; representa a los almidones de los cereales), "B" (que se obtiene por evaporación a temperatura ambiente o retrogradación; representa a los almidones de los tubérculos) o "V" (Verkleisterungspektrum, que se obtiene por precipitación con alcoholes u otros agentes; de estructura más simple que las formas "A" o "B" indicando un agrupamiento más simétrico de la molécula; su característica principal es la capacidad para tomar grandes cantidades de vapor de yodo).
- 6.—Completamente estable; es decir, baja tendencia a retrogradar.

Los almidones sintéticos preparados del éter de Cori (glucosa 1 fosfato) por acción de las fosforilasas, son homogéneos en contraste con los naturales. El que sintetiza la fosforilasa de la papa natural tiene menos de una cuarta parte. El peso molecular del glicógeno según Bridgman varía entre 4 y 14 millones; es decir, con 25,000 a 90,000 unidades de glucosa.

La rotación específica del almidón en la mayoría de sus valores se ha encontrado oscilando entre  $[\alpha]_D = + 180 - 220^\circ$ .—Meyer obtuvo para la amilasa  $[\alpha]_D = 220^\circ \pm 5^\circ$ .—El de la amilopectina se puede tomar como  $[\alpha]_D = + 200^\circ$  y para las dextrinas de alto peso molecular, el valor  $[\alpha]_D = + 190 - 200^\circ$ . Lo opaco de las soluciones de almidón representa dificultad para medir su rotación específica; por lo cual, se acostumbra determinarla en soluciones alcalinas que son relativamente claras.

Beckman y Landis estiman que el tamaño molecular de la amilosa de maíz es de 300 a 400 glucosas y la amilopectina 1,000 veces más grande. Coles indicó que el peso molecular de la amilosa de papa es 185,000 y el de la amilopectina 1,000,000.

Las amilosas de papa y tapioca se solubilizan a temperaturas más altas, tal vez porque su estructura es más compleja que las cristalinas. Lógicamente se cree que la solubilidad de estos componentes no sólo depende de la forma en que estén unidos dentro de la molécula de almidón, sino también de su asociación a otros restos de carbohidratos y a otros compuestos como los ácidos grasos.

La dispersión del almidón, sin que degrade, se mantiene al emplear cloral, hidracina, etilendiamina, etc., como solventes.

El cloruro de sodio en pequeñas cantidades abate la viscosidad de la amilosa hasta un 10% o menos de su valor original. No se trata de un agente degradante y el efecto se cree debido a un cambio en la configuración de la molécula.

Por hidrólisis ácida se obtiene la amilodextrina, cadena de aproximadamente 25 glucosas unidas en la forma típica del almidón y con pocas o ninguna ramificaciones.

Las soluciones de almidón, expuestas durante mucho tiempo a la temperatura ambiente o a más bajas, retrogradan y lo mismo puede acontecer aún al estado sólido (se cree que el enranciamiento del pan sea un proceso de este tipo). La pasta se agrega progresivamente y forma precipitados microcristalinos insolubles (tipo B). La agregación la hace perder su utilidad al ataque enzimático. Algunas preparaciones de amilopeptina manifiestan esta tendencia, pero en la amilosa pura es muy pronunciada. El fenómeno se contrarresta por acción de los agentes de hinchamiento, conservando las preparaciones a temperaturas más altas de la ambiente, o eliminando la humedad.

Según Meyer, con agua caliente (70° C.) se extrae del 5 al 20% del almidón total; en el extracto queda la amilosa (para el maíz se le ha obtenido con pureza de 70 - 80%) y en los gránulos residuales la amilopeptina.

Se ha encontrado que el butanol y pentanol precipitan selectivamente a la amilosa dejando en solución a la amilopeptina; la fracción precipitada se separa por adsorción sobre celulosa y la amilopeptina se obtiene por cristalizaciones sucesivas con butanol y metanol. El peso molecular de esta amilosa es considerablemente más alto que el de la extraída con agua, lo que tal vez se deba a una impureza de alto peso molecular o a que en este caso la amilosa de alto peso molecular se extrae más lentamente.



te. Con esta técnica de precipitación alcohólica se ha dicho que los almidones de maíz, papa y tapioca contienen un 22% de fracción lineal y 78% de ramificada.

Algunos almidones (arroz, sorgo, maíz, cebada) conocidos como "plásticos, cerosos o glutinosos", al igual que el glicógeno, se supone que carecen de constituyentes lineares; por cuya razón, dan con el yodo coloraciones anormales. El almidón de arroz sólo tiene un 17%; los de maíz y trigo 21 y 24%.

Siendo el almidón una unión de glucosas la molécula puede romperse en cualquiera de las ligaduras, por hidrólisis de ácidos o enzimas, dando lugar a la formación de azúcares como productos finales y a una serie de dextrinas de diferente magnitud como intermedios.

La molécula contiene oxhidrilos alcohólicos, primarios y secundarios, igual que grupos aldehídicos y puede oxidarse en uno o varios de estos puntos. La oxidación del almidón tiene interés científico como medio para indagar sobre su estructura, e industrial para obtener almidones comerciales, empleando hipocloritos de sodio o calcio, perborato de sodio, persulfato de amonio, peróxidos alcalinos, etc., como agentes oxidantes.

Los halógenos pueden dar lugar: a la oxidación de los grupos aldehídicos a carboxilos; a la de los grupos alcohólicos primarios a carboxilos, como en el caso del ácido amilodextrínico de Syniewski; a la de los secundarios para dar cetonas; a la de los grupos glicólicos (los oxhidrilos 2 y 3 en las anhidro-glucosas funcionan como tales) convirtiéndose en aldehidos y rompiéndose el anillo entre los carbonos 2 y 3.

Los oxhidrilos pueden esterificarse por acción de los ácidos orgánicos e inorgánicos o por los cloruros de ácido y los anhídridos. De acuerdo con la estructura considerada, hay de 2 a 4 oxhidrilos aprovechables. Los acetil-derivados se preparan: a) por acción de los ácidos acético y sulfúrico y del anhídrido acético, b) por gelatinización con piridina y acetilación (con anhídrido), separando agua como mezcla azeotrópica agua-piridina; c) por el empleo de una mezcla de anhídrido y ácido, a la temperatura de reflujo; d) por tratamiento del almidón finamente dividido con agentes acetilantes, bajo condiciones especiales; e) por el empleo de acetona.

Existen otros constituyentes, no carbohidratos, tales como di-

versas cantidades de ácidos grasos, substancias nitrogenadas, sílice, etc., que dan lugar a ciertas variantes en el comportamiento físico-químico de los almidones. Se cree que los que contienen funciones ácidas (aminoácidos) al combinarse con algunos de los oxhidrilos forman ésteres; presentando en el caso, resistencia a la actividad específica y sistemática de los enzimos. Las moléculas esterificadas con ácidos grasos son más solubles en solución alcalina y tienden a ser insolubles, cuando menos en principio, en solución neutra o ácida. El ácido silícico combinado, sirve para medir la insolubilidad de las fracciones de almidón; tiende a gelificar en medio neutro o ácido y provoca una resistencia al ataque enzimático.

En cuanto al contenido en fósforo Samec llegó a proponer que la diferencia entre la amilosa y la amilopectina podría explicarse sobre la base del fosfato esterificado y Myrback sugirió que ciertas fracciones de almidón no eran completamente degradadas por la beta-amilasa porque la glucopiranososa esterificada con fosfato, formaba una constitución anómala. Según Posternak el fósforo en el almidón de trigo se presenta en la forma de un fosfolípido, como impureza o como mezcla física simple. Lo cierto es que puede existir en unión química con algunas moléculas de almidón, particularmente con la amilopectina de papa y tal vez con las de algunos tubérculos; sin embargo, se cree que su comportamiento general no se deba a esta causa sino más bien a variaciones fundamentales de la estructura. Las cadenas sintóticas de glucopiranosas están formadas por glucosa 1 fosfato; si en la misma forma se efectuara la síntesis natural la esterificación no se localizaría en el átomo 6 de carbón, como acontece, a menos que se supusiera la presencia de una fosfoglucomutasa que dejara a la glucosa 1 fosfato en su forma más estable: glucosa 6 fosfato.

Algunos almidones contienen compuestos grasos tan estrechamente asociados que no se les puede separar por medios físicos o mecánicos. Otros, principalmente los de cereales, tienen un compuesto resistente a la acción del enzimo de la cebada sin germinar; tal resistencia es mayor en los almidones de tapioca y papa. Su análisis indicó 0.83 y 0.98% de  $\text{SiO}_2$  concluyéndose que el producto llamado amilohemicelulosa es una sal de un éster de la amilosa con el ácido silícico. Sin embargo, la eliminación de la si-

lice por ácido fluorhídrico no impide la formación de la amilohemicelulosa; lo cual indica que la sílice se presenta como impureza de las fracciones menos solubles.

Tomando en cuenta que se dificulta eliminar el nitrógeno de ciertos almidones (trigo y maíz) se supuso la combinación química de algunas moléculas con pequeñas cantidades de proteínas o sus productos de degradación. La idea se desechó más tarde para aceptar una unión física coloidal entre el almidón y la proteína.

Indudablemente, la reacción más interesante del almidón es la que se desarrolla con el yodo para formar un color azul característico. Su descubrimiento se atribuye a Claubry en 1814. La coloración desaparece al calentar, pero reaparece por enfriamiento. Según Phol se debe a una mayor afinidad del agua caliente para el almidón que la del yodo; siendo a su vez, mayor la del yodo que la del agua fría. Según Payen, a una expansión de los agregados del almidón al calentar y a un reacomodo de los mismos, al enfriar. La sensibilidad se aumenta con los ácidos, yoduro de potasio o sulfato de sodio, pero se inhibe con los álcalis y el hidrato de cloral.

Para estudiar la formación del color azul se han supuesto fenómenos de adsorción y formación de complejos. Se han obtenido curvas típicas de adsorción (Lottermoser) basadas en la determinación de un potencial eléctrico para el sistema yodo libre-yodo iónico de acuerdo con la ecuación de Nernst. Se han empleado técnicas físico-químicas para determinar la presión osmótica y abatimiento del punto de congelación, métodos colorimétricos y medidas de conductividad, con el mismo objeto.

Según Hanes y Cattle, la molécula del almidón contiene grupos que adsorben el yodo originando el color; la hidrólisis por la beta-amilasa los disminuye y entonces, acontecen los cambios del azul al rojo púrpura.

Bermann y Ludewig sugieren que los oxígenos que forman los puentes de la molécula de almidón, constituyen los centros de adsorción.

Las fracciones de amilopectina parecen tomar cantidades de yodo muy pequeñas, por absorción o adsorción, pero las de amilosa las toman considerablemente creyéndose que las ligeras diferencias que pudieran encontrarse en sus moléculas no afectan el

porcentaje de yodo que pueda unirse para formar el complejo.

Para explicar la teoría del mecanismo de esta reacción French y Rundle establecieron que la alfa-dextrina de Scharfinger es una molécula en forma de anillo ( $14 \text{ \AA}$  de diámetro); contiene 6 glucopiranosas mutuamente unidas por ligaduras 1-4 y dos ejes de simetría. En la forma cristalina, las moléculas de yodo se colocan dentro de los anillos de dextrina con su eje principal a lo largo de los dos de ésta. El dicroísmo que presenta la dextrina, está de acuerdo con esta estructura; el dicroísmo indica que los ejes principales de las moléculas de yodo y las moléculas de almidón son paralelos. En el caso de las configuraciones helicoidales sugeridas para la molécula de almidón, los ejes de la de yodo se colocan paralelamente o coincidiendo con los de aquél, originándose la coloración al situarse el yodo de manera análoga a como acontece en los anillos de las dextrinas de Scharfinger. Se cree que la coloración azul formada por la amilosa y el yodo, se produce porque las cadenas extendidas tienden a formar su configuración alrededor de la molécula de yodo; al calentar, se provoca una distorsión que elimina la orientación del yodo y desaparece el color.

El aldehído fórmico y otros aldehídos producen una reacción compleja con el almidón: éste pierde su habilidad de teñirse con yodo, dependiendo de las concentraciones que de aquél se agreguen. El efecto es similar al provocado por enzimas y ácidos y hasta se ha creído que se trata de una dextrinización hidrolítica; inconsistente, por el hecho de precipitar con alcohol en la misma forma que el almidón original. El color puede restaurarse agregando acetato de amonio para separar del medio el aldehído, con formación de hexametileno-tetraamina. Algunas veces, cuando las condiciones de reacción (concentración baja de formaldehído, temperatura ambiente) no son muy drásticas, basta diluir bastante con agua. Otras, la presencia de un ácido facilita la recoloración.

Según Samec y Meyer se forma un complejo (tal vez un producto de adición) ampliamente hidratado, de igual magnitud molecular a la existente antes del tratamiento.

De acuerdo con Classen el almidón tratado con formaldehído a altas temperaturas forma un compuesto insoluble en agua caliente (estable aún a  $180^\circ$ ) con una constitución aparente de una molécula de formaldehído por una de almidón.

El mecanismo de la reacción se cree que acontece de la ma-

nera siguiente: en el momento inicial, el aldehído se coloca dentro de la orientación original del gránulo formando un complejo con los oxhidrilos donde la ligadura del hidrógeno es más débil o donde no existe. Cuando prosigue, la estructura tiende a aumentar de tamaño por la asociación de un número suficiente de oxhidrilos con el aldehído y porque, además, las moléculas de agua pueden entrar en el interior de estas orientaciones. Al asociarse las cadenas lineares con los grupos aldehídicos disminuye su capacidad de formar configuraciones helicoidales alrededor de las moléculas de yodo y simultáneamente, la intensidad de su coloración con éste.

La aplicación de este comportamiento del almidón con el aldehído fórmico ha dado lugar a muchas patentes (Classen: almidón antiséptico para la ropa de cirugía; Blumer: adhesivos solubles e insolubles en agua; plásticos, etc.).

— — — — —

La mayoría de los trabajos efectuados para deducir la estructura del almidón se han basado en la metilación de los oxhidrilos libres, con sulfato o yoduro de metilo, seguida de una hidrólisis. En cualquiera de los 6 átomos de la glucosa en que estos grupos no se encuentren se supone el apoyo de la ligadura entre las moléculas de aquella o el carbón que toma parte en la formación del anillo.

Irvine, al obtener 2-3-6-trimetilglucosa sugirió glucosas unidas por ligaduras 1-5 en la forma de anillos de furanosa (hemiacetal entre los carbonos 1-4). Haworth cree que la glucosa existe predominantemente en la forma de glucopiranososa (puente de oxígeno entre los carbonos 1-5) y que las ligaduras unitarias se sitúan en posición 1-4. Se cree que la forma cristalina ordinaria de la glucosa es la alfa-d-glucopiranososa. Al extender su técnica al almidón, obtuvo los mismos productos que cuando metiló maltosa (2-3-6-trimetilglucosa y 2-3-4-6-tetrametilglucosa) en la proporción de más de 90 y de 4 a 5% respectivamente; sugiriendo que las unidades de glucosa en el almidón se unen como en la maltosa; es decir, entre los carbonos 1-4 y que el 4 a 5% de ellas forman los grupos finales no reductores.

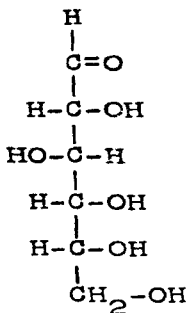


Fig. I  
d - glucosa (forma aldehydica).

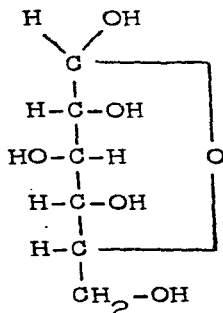


Fig. II  
 $\alpha$  - d - glucopiranososa

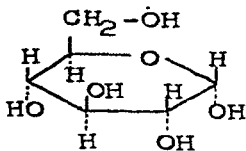


Fig. III  
 $\alpha$  - d - glucopiranososa

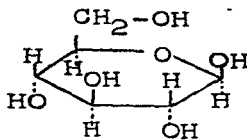


Fig. IV  
 $\beta$  - d - glucopiranososa.

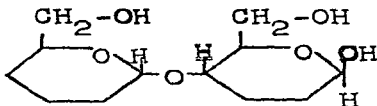


Fig. V  
Maltosa.

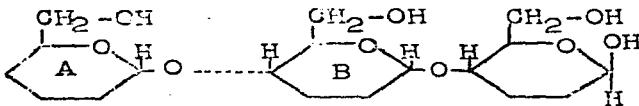


Fig. VI  
Almidón (fracción lineal).

La fracción A forma 2-3-4-6-tetrametilglucosa; la B 2-3-6-trimetilglucosa. Dedujo, entonces, que por cada 20-25 glucopiranosas (B) hay una del tipo A y que la longitud mínima de la cadena es de aproximadamente 24 a 30 glucosas con un peso molecular de alrededor de 5,000. Tal estructura, típicamente aceptada como lineal, no concuerda con el débil poder reductor del almidón; con el tamaño aparentemente enorme de la molécula como lo demuestra su viscosidad, presión osmótica y sedimentación; con el efecto del ataque enzimático. El mismo Haworth indicó que las cadenas unitarias se agregaban dentro de otra unidad de magnitud mayor interfiriendo el poder reductor de las aldosas terminales y que las dextrinas, producto de la hidrólisis enzimática, están formadas por cadenas de 12 glucosas o sean el 40% de una cadena de 30 estimada como de longitud básica; lo cual concuerda con la observación de que los enzimas transforman a maltosa, aproximadamente el 60% del almidón.

Los trabajos de Richardson y colaboradores parecen sostener el punto de vista de que el almidón se forma por macromoléculas, en lugar de agregados de pequeñas moléculas, cuyo peso es muchas veces mayor que el de la cadena unitaria postulada por Haworth. Según aquél, la longitud de la cadena es de 1,000 unidades de glucopiranosas.

Staudinger estima correcta la magnitud molecular propuesta por Richardson y encuentra por determinaciones de viscosidad y de presión osmótica 1,500 unidades de glucosa y también supone la existencia de macromoléculas proponiendo una estructura simétricamente ramificada (Fig. VII).

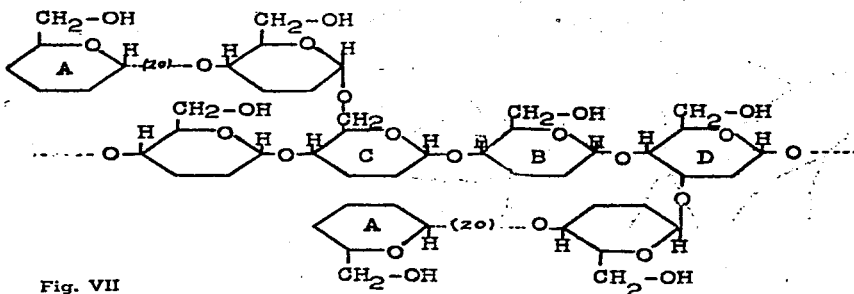


Fig. VII

Las unidades A producen 2-3-4-6-tetrametilglucosa.

Las unidades B producen 2-3-6-trimetilglucosa.

Las unidades C producen 2-3-dimetilglucosa.

Las unidades D producen 2-6-dimetilglucosa.

Esta fórmula reúne las ideas de Haworth y Richardson. Si la ramificación existe a través de las ligaduras de las valencias primarias, la estructura puede contener 1,000 ó más unidades de glucopiranosas y formar la proporción de tetra a trimetilglucosa encontrada por Haworth; es decir, se mantendría la relación 1:23 de unidades A terminales a B intermedias. La ramificación anotada es por medio de ligaduras glucosídicas y si es simétrica a través del carbón 6 por un lado de la cadena (unidad C) y por el 3 en el otro (unidad D) se obtienen ciertas cantidades de 2-3 y 2-6-dimetilglucosa.

Se cree que la combinación de estas dos estructuras: amilosa (Fig. VI) y amilopectina (Fig. VII), sea la mejor idea para representar la molécula de almidón. El maíz, por ejemplo, tendría 30% de la primera y 70% de la segunda; y el maíz glutinoso sería casi exclusivamente de este tipo.

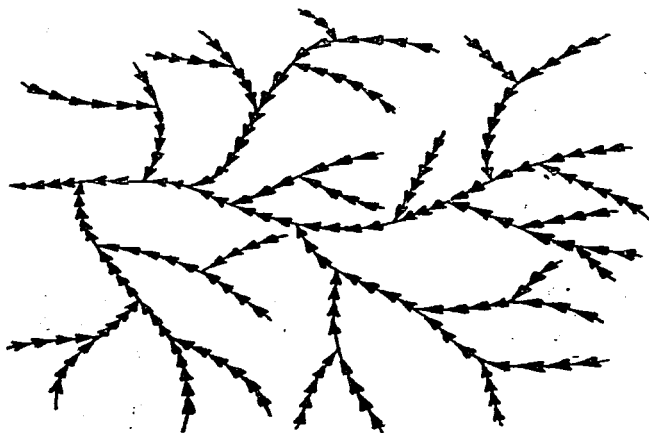


Fig. VIII



Todas estas hipótesis suponen en común cierta regularidad aún para las moléculas ramificadas. Es decir, que su estructura se repite. Staudinger expresó la opinión de que las cadenas laterales de su fórmula podrían, a su vez, ramificarse; lo que desarrollaría una fórmula con ramificación múltiple, un poco irregular, del tipo de la propuesta por K. H. Meyer (Fig. VIII).

En todas las fórmulas ramificadas deben distinguirse las cadenas finales por contener un grupo final no reductor y las cadenas interiores por quedar entre dos puntos de ramificación.

—oOo—

Sin tomar en cuenta las condiciones que favorecen la eficiencia de la reacción "enzimo-substrato de almidón", éste puede sufrir las modificaciones siguientes

- 1.—Licuar o solubilizarse sin llegar a una degradación total de la molécula (enzimos amiloclásticos). La licuefacción se considera como una disgregación del gránulo en unidades físico-químicas más pequeñas que permanecen dispersas por más tiempo que las del almidón gelatinizado sin tratamiento. Por regla general la gelatinización y licuefacción se suceden simultáneamente y ésta no se efectúa en extensión apreciarle, si antes no se ha modificado, por gelatinización, la estructura del grano.
- 2.—Transformarse por degradación, en productos clasificados como dextrinas con sólo pequeña formación de azúcares (amilasas dextrinogénicas). La dextrinización se interpreta como la formación de ciertos compuestos, polímeros del almidón, pero menos complejos; los cuales, según su magnitud, dan con el yodo toda una serie de colores entre el azul del almidón y el incoloro del totalmente hidrolizado.
- 3.—Hidrolizarse a un alto porcentaje de azúcares reductores como maltosa o dextrosa (amilasas sacarogénicas). Corresponde a la máxima degradación que puede tenerse para el almidón.
- 4.—Romper su molécula por introducción de agrupamientos diferentes de los del agua (fosforilasa).

5.—Romper su molécula con un posible reagrupamiento de las unidades formadas (amilasas del Bacilo macerans que forman las dextrinas de Schardinger).

Las tres primeras transformaciones son las más importantes y su probable mecanismo puede seguirse de acuerdo con la idea postulada por Karl Myrback. Se basa en las "dextrinas límites" y su hipótesis se expresa en la siguiente forma:

- 1.—Las amilasas sólo atacan las ligaduras 1-4-alfa-glucosídicas en los restos de glucosa unidos entre sí como en la fórmula original de Haworth.
- 2.—La mayoría de las ligaduras en el almidón son de este tipo; pero a ciertos intervalos se presentan anomalías que pueden serlo ligaduras de uno diferente, substitución de una glucosa con ácido fosfórico, etc.
- 3.—Las amilasas tienen poca o ninguna acción sobre estas ligaduras anómalas, o sobre aquéllas que en cualquier forma se alejan de la fórmula de Haworth.
- 4.—Cuando la amilasa actúa sobre el almidón, aquellas partes de la molécula cuya estructura coincide con la de Haworth se sacarifican, pero las porciones vecinas a las anomalías son inatacables por los enzimos y constituyen las "dextrinas límites".

**Acción de la beta-amilasa.**—Descompone en maltosa todos los polisacáridos constituidos por restos de glucosa unidos con ligaduras 1-4-alfa-glucosídicas. Transforma en tal producto el 60% del almidón y el 40% en una "dextrina límite" de alto peso molecular conocida como alfa-amilodextrina. Se cree que ésta provenga de la amilopectina.

El enzimo ataca las cadenas a partir del grupo final no reductor, dejando libre una maltosa tras otra; es decir, que sacarifica las cadenas finales pero cesando su acción al encontrar la primera ramificación. La alfa-amilodextrina representa, por tanto, la parte ramificada de la molécula de amilopectina. Si de ésta sólo se sacarifica el 50% por acción de la beta-amilasa y si la hipótesis es correcta, se concluye que en la amilopectina cerca del 50% de las glucosas se sitúan en las cadenas finales.

La fórmula de Staudinger con una cadena principal corta y numerosas cadenas laterales a ciertos intervalos, parecería en

este caso no estar de acuerdo con la acción de la beta-amilasa. Pero si se modificara para suponer una cadena principal más larga con cadenas laterales más cortas (10-12 unidades) a mayores intervalos (8-10 unidades) sí puede acoplarse la acción de este enzimo. La "dextrina límite" sería aproximadamente lineal con cadenas muy cortas (1 ó 2 unidades).

Cualquier fórmula irregular del tipo de la de K.H. Meyer estaría de acuerdo con esto, si se supone que en las cadenas finales están alrededor del 50% de las glucosas.

**Acción de la alfa-amilasa.**—**1a. fase:** una dextrinización caracterizada por una hidrólisis rápida de cerca del 17% de las ligaduras glucosídicas formando productos de bajo peso molecular (menos de 3,000) y sólo una pequeña cantidad de azúcares fermentes cibles. El almidón (amilosa y amilopectina) se rompe en estas dextrinas. Las de almidón de cebada tiene un peso molecular de 1,400 con una longitud promedio de 9 unidades, aunque varía ligeramente de 6 a 13. Alrededor del 50% de estas dextrinas tienen de 6 a 7. Las de otros almidones se aproximan a esa composición.

**2a. fase:** hidrólisis mucho más lenta por un período considerable, en el cual se aumentan los azúcares (maltosa, glucosa) y se forma la "dextrina límite". Es la sacarificación post-dextrinización. Si las dextrinas anteriores se tratan con beta-amilasa, todas las fracciones con 6 ó 7 unidades se sacarifican total o casi totalmente; lo que da lugar a concluir que se trata de sacáridos contienen sólo "ligaduras maltosa" y a considerarlas como "dextrinas normales". Las fracciones con más de 8 unidades se sacarifican incompletamente, contienen las anomalías de la molécula de amilopectina (puntos de ramificación, etc.), y constituyen los "dextrinas anómalas".

Cuando la alfa-amilasa actúa sobre el almidón ordinario conteniendo 20 a 25% de amilosa, forma de ésta y de las cadenas finales de amilopectina las "dextrinas normales"; es decir, de aquellas partes del almidón que se convierten a maltosa cuando se tratan con beta-amilasa.

Las "dextrinas anómalas", por su parte, se derivan de los núcleos fuertemente ramificados de la molécula de amilopectina por ruptura de las cadenas interiores, entre los puntos de ramificación.

## REFERENCIAS

- GILMAN, HENRY.**—*Organic Chemistry*. New York, John Wiley and Sons Inc. II: 1553-56. 1944.
- GORTNER, ROSS AIKEN.**—*Outlines of Biochemistry*. New York, J. Wiley and Sons: Cap. XXVI. 1938.
- HERSTEIN, K. M. AND JACOBS, M. B.**—*Chemistry and Technology of Wines and Liquors* D. Van Nostrand Co. Inc.: 11. 1948.
- KERR, RALPH W.**—*Chemistry and Industry of Starch*. New York, Academic Press Inc.: Caps. VII, VIII, X, XV, XVI, XVII. 1944.
- MYRBACK, KARL.**—*The structure of starch*. Wallerstein Laboratories Communications 11,34: 209-219. 1948.
- PIGMAN, W. W. AND WOLFROM, N. L.**—*Advances in Carbohydrate Chemistry*. I:247-277. 1945.
- WALTON, ROBERT P.**—*A Comprehensive Survey of Starch Chemistry*. New York, The Chemical Catalog Co. I: 25-32, 77-86. 1928.

## CAPITULO III

### a.—CARACTERES Y PROPIEDADES GENERALES DE LAS AMILASAS

Hay una relación estrecha entre las posibles transformaciones del almidón, ya indicadas, y las propiedades de los enzimos que las provocan. En este caso especial se necesita la referencia a unas y otras, por ser básicas en las técnicas desarrolladas para valorar la actividad de las amilasas que se cree ocupen todas las plantas superiores y los animales en sus procesos fisiológicos.

Lo enzimos se definen como biocatalizadores; es decir, como agentes orgánicos con propiedades específicas para acelerar o aún iniciar reacciones sin que necesariamente tengan que alterarse como consecuencia de ello. Se les supone proteínas o agrupamientos específicos asociados íntimamente con proteínas. La nomenclatura adoptada consta de un prefijo que indica el substrato que atacan y de la terminación "asa" que denota enzimo. De tal modo, los que degradan almidón se conocen como "amilasas".

Su importancia ha ido en aumento a partir del descubrimiento de la "diastasa" por Kirchhoff en 1815 y de los trabajos de Fäy y Persoz en 1833 sobre la preparación de tal "diastasa", de las dextrinas y sus aplicaciones industriales. Desde 1879 Marcker postuló la existencia de "dos fermentos diastásicos" en la malta a los que Wijsman llamó en 1890 "dextrinasa" y "maltasa" (productores de dextrinas y de maltosa) y Kuhn, en 1925, alfa y beta-amilasas para significar la reformation de alfa y beta maltosa, respectivamente. Tal denominación se emplea hasta ahora sólo que no en el mismo sentido sino para entender por "alfa-

**amilasa un enzimo licuefaciente y dextrinificante" y por "beta-amilasa un sacarificante".**

Han sido varios los estudios emprendidos sobre las amilasas y Walton ha recopilado alrededor de 900 trabajos en el periodo de 1798 a 1925 comprendiendo gran diversidad de temas: características generales, purificación, activación e inactivación, temperaturas óptimas, efectos de la luz, rayos ultravioleta y Roentgen; determinación de actividad, fuentes de obtención, etc. En la actualidad investigadores como Kneen, Hads, Sandstedt, Olson, Evans, Dickson, Hollenbeck, Blish, Landis, etc., representan las ideas del momento sobre estos asuntos.

Casi simultáneamente con el desarrollo de un conocimiento más amplio sobre las amilasas ha ocurrido una gran expansión de su empleo no sólo a las industrias de fermentación, típicas en el caso, sino a otras ahora importantes.

Las amilasas se han clasificado bajo dos puntos de vista: a) basándose en el tipo de degradación que efectúan sobre el almidón (licuefacción, dextrinificación, sacarificación) y b) de acuerdo con la fuente de la amilasa (obtenida de plantas superiores, de microorganismos o de animales). La primera, es más útil para propósitos industriales y la segunda representa más valor para el productor que para el consumidor de amilasas.

Las propiedades generales de las amilasas pueden resumirse en las siguientes:

- 1.—Inactivación irreversible por altas concentraciones de ácidos, alcalis y temperaturas de ebullición. Las condiciones para la retención máxima (90 a 100%) de la alfa-amilasa con inactivación de la beta son: presencia de iones calcio, pH relativamente alto (6-7) y 70° C. Para la beta con inactivación de la alfa: ausencia de calcio, pH relativamente bajo (3.0) y 30° C.
- 2.—No atraviesan las membranas de celofán.
- 3.—Solubles en agua o en soluciones diluidas de etanol.
- 4.—Precipitables por altas concentraciones (los investigadores varían ligeramente en sus datos) de sulfato de amonio o de etanol; en formas que son activas redisueltas en agua. La precipitación con sulfato de amonio (originalmente empleada por Osborne en 1895) substituyó a la de etanol por objetarse que la actividad se pierde progresivamente si el enzimo está en contacto con el alcohol por mucho tiempo.

- 5.—Velocidad de reacción influenciada por varias sales, productos derivados de las proteínas, lípidos y otras sustancias clasificadas como activadores (aumentan la solubilidad o estabilidad de la amilasa disminuyendo la velocidad con que perdería su actividad; caso de los iones calcio) o inhibidores (pueden serlo los mismos productos de la actividad amilásica y ciertas sustancias solubles o insolubles de naturaleza proteica como las del trigo, centeno o sorgo). El ácido ascórbico (Purr) activa la beta-amilasa animal e inhibe a las amilasas de las plantas; la forma oxidada no afecta a la beta, pero inhibe a la alfa de éstas; así se explica su inactivación al final del período de desarrollo.
- 6.—El pH óptimo para la actividad o estabilidad del enzimo depende del tiempo y de la temperatura de reacción.
- 7.—A temperaturas bajas (20-30° C.) la velocidad de reacción se duplica por cada elevación de 10° C.; pero a altas, el incremento disminuye hasta inadvertirse porque la pérdida de amilasa se equilibra con el aumento en actividad de la restante. La pérdida de enzimo o aún del poder amilolítico se acentúa por elevaciones posteriores de la temperatura.
- 8.—No existe una temperatura óptima general. La fijan las condiciones de trabajo. La termoestabilidad difiere con la amilasa.
- 9.—Existe la estabilidad propia del enzimo y la conferida por las las sustancias del medio.
- 10.—De las tres funciones de la malta sólo la licuefacción parece deberse a un sólo componente: el alfa. La dextrinificación a ambos: alfa y beta. La sacarificación casi exclusivamente al beta, con poca influencia del alfa.  
Es muy probable que la beta-amilasa sea una exo-amilasa que se asocia a grupos libres finales no reductores de cadenas normales; su única acción es la ruptura del penúltimo ligamento de éstas. La alfa, una endo-amilasa que se asocia fácilmente a cadenas normales lejos de grupos finales, puntos de ramificación u otras anomalías que protegen a los ligamentos vecinos contra la actividad enzimática.  
Frederick J. Di Carlo y Sutton Redfern al estudiar el efecto de algunos inhibidores (ion plata, ácidos nitroso y oxálico) so-

bre las actividades licuefacientes y dextrinificantes de la alfa-amilasa del *Bacillus subtilis*, concluyeron que los dos procesos son funciones del mismo enzimo. Antes, en 1944, Sutton Redfern y Quick Landis en un estudio comparativo entre la actividad de las alfa-amilasas de la malta, bacterianas y de hongos (contrariamente a la idea expresada entonces por Hollenbeck y Blish) opinaban que existe diferencia al determinarlas por las técnicas de licuefacción y dextrinificación. Generalmente, un poder amilolítico elevado se asocia a valores altos de alfa y beta-amilasas pero no necesariamente a una relación igual de alfa a beta.

Las propiedades especiales de las amilasas de las diferentes fuentes, se expresan en el cuadro No. I.

Existen, además, otros enzimos con propiedades similares a las amilasas y entre los cuales se tienen:

- 1.—**Amilofosfatasa:** se considera licuefactor del almidón con mucha semejanza a la alfa-amilasa tanto en propiedades como en comportamiento.
- 2.—**Fosforilasa:** su acción es reversible en contraste con los sistemas amilolíticos en general; hidroliza en hexosa fosfato el almidón o sintetiza un carbohidrato similar de la hexosa 1 fosfato, según las condiciones. Se le encuentra en los tejidos animales, en las semillas de chícharo y en los tubérculos de papa. De gran importancia fisiológica en el metabolismo de los carbohidratos.
- 3.—**Amilocitasa:** hidroliza la capa externa, resistente, de los granulos de almidón sin tratamiento, como paso previo a la degradación. Se le supone presente en la malta y se cree que cuando menos en ésta, su acción no es separada de la alfa-amilasa.
- 4.—**Glucosidasas:** se les ha supuesto para explicar el comportamiento de algunas amilasas sobre el almidón. Entre éstas se cuentan:  
**Maltasa:** desdobra a la maltosa y acompaña a las amilasas.  
**Alfa-Glucosidasa:** importante en la sacarificación debida a las amilasas de los hongos. Se cree que el azúcar formado en los últimos momentos de su ataque se debe a otros enzimos de este tipo; lo mismo se dice de los obtenidos en la post-dextrinización sugiriendo un enzimo capaz de desdoblar las



dextrinas o "dextrinasa", nombre aplicado en un estudio sobre la malta de sorgo. Tal efecto se supone a la alfa-glucosidasa de la levadura como complementario de la acción de la beta-amilasa.

- 5.—**Amiloquinasa:** activador específico obtenido de los extractos de malta por Waldschmidt, Leitz y Purr. Su formación en el desarrollo del grano activa a la amilasa presente. No aumenta la actividad de las amilasas purificadas pero parece separar los inhibidores en las preparaciones originales de enzimos.
- 6.—**Peroxidasa:** enzimo formado por un anillo de hematina con un átomo central de fierro. Cataliza la oxidación de ciertos compuestos fenólicos por peróxido de hidrógeno con formación de agua y agregando el oxígeno separando, al compuesto orgánico. Se le encuentra en muchos tejidos animales y en la mayoría de las plantas superiores. Su contenido en el trigo y la cebada es alto y se aumenta unas tres veces al maltear. El maíz y el arroz son bajos pero se aumentan unas diez veces. En las plúmulas y radículas de todos estos granos se nota una actividad considerable. Notable termoestabilidad. pH óptimo cercano a 4.6. Su actividad se destruye al secar, en sólo un 30%.

AMILASAS

CEREALES

NO GERMINADAS

En general, actividad amilolítica baja o carencia casi total. Microcantidades o huellas de alfa-amilasa. Cantidad variable de beta. Mayor extracción con papaina.

Cebada

**Alfa-amilasa:** Licúa y dextriniza el almidón gelatinizado. Forma pocos azúcares con aumento eventual. Soluble en agua y en soluciones salinas diluidas (25-30% de sulfato de amonio la precipitan) o en etanol de menos de 60%. Termoestable. pH 5 óptimo para la actividad. pH óptimo para la estabilidad 7. Inactivación rápida a pH bajos. Inestable en soluciones diluidas. Se estabiliza con iones calcio. Entre pH 6-7 y en presencia de calcio la pérdida de actividad es baja a 70° C.

GERMINADAS

Trigo  
y  
Centeno

**Alfa-amilasa:** Menos termoestable que la de cebada. Se precipita con etanol de 50% pero sólo se completa con de 70%. pH 4.43 óptimo para la actividad. Déxtr. en el trigo. Otras propiedades similares con variantes por influencia de sustancias extrañas. Se supone en el trigo un "activador" o "contra-inhibidor" que no precipita con sulfato amónico a ninguna concentración y un "inhibidor" que precipita junto con la amilasa al saturar. Su separación retarda la hidrólisis. El activador contrarresta el efecto del inhibidor pero no acelera el proceso en ausencia de éste.

Maíz  
y  
Arroz

**Beta-amilasa:** Más termoestable que la de cebada.  
**Alfa-amilasa:** Degrada de manera similar a la de cebada hasta las dextrinas de peso molecular bajo, con mayores valores en la sacarificación post-dextrinización. Solubilidad, pH óptimo para la actividad y termoestableidad, comparables a la de cebada.

NO CEREALES

Frijol soya

**Alfa-amilasa:** Pequeñas cantidades.  
**Beta-amilasa:** Similar a cereales. Más termoestable.

Papa

Amilasa similar a la beta.

MICROBIANAS

Hongos

*Aspergillus*. *Mucor*. *Penicillium*. *Rhizopus*.  
**Aspergillus oryzae:** **Alfa-amilasa:** actividad similar a la de malta con sacarificación post-dextrinización rápida y a veces elevada. Solubilidad en etanol y en soluciones salinas, también parecidas. Estabilización con iones calcio. Inactivación rápida a 70° C. pH 5 óptimo para la actividad. Por licuefacción, su actividad máxima se mide entre 15 y 50% de abatimiento en la viscosidad. El producto más conocido es la "Takadiastasa".

Bacterias

Grupo del *Bacillus subtilis*.  
**Bacillus macerans:** **Alfa-amilasa:** licúa y dextrinifica con bajo poder de sacarificación pero se cree pueden obtenerse preparaciones con potenciales de sacarificación mayores de los comunes para la alfa. Es típica la formación de dextrinas de Schardinger. Solubilidad similar a las otras. Muy termoestable (se inactivan poco arriba de 70° C.); pH 7 óptimo para la actividad.

ANIMALES

Pancreáticas

Del tipo alfa.—Licúan y dextrinizan con sacarificación baja. Muy sensibles a las sales neutras necesiéndolas para extraerse mejor. Precipitaciones salinas y con etanol, similares a las otras. El ion calcio obra como estabilizante. Termoestableidad baja parecida a la de hongos. Se ha indicado para la de cerdo un peso molecular de 45,000.

Salivares.  
Sanguíneas.  
etc.

Similares a la anterior.

OBTENCION

Las plantas superiores al madurar depositan en sus órganos de reserva carbohidratos complejos y proteínas en asociación estrecha con la beta-amilasa. Extracción con papaina y precipitación alcohólica.

Al germinar se favorece la formación de la alfa-amilasa y el desarrollo de la beta en los granos que ya la contenían. Extracción y purificación de acuerdo con sus propiedades.

Selección de especies según su potencia. Desarrollo sobre medios sólidos o semisólidos (cocimiento de partes iguales de salvado de trigo y agua) a pH 4 para evitar contaminaciones bacterianas y a 30-35° C. con aereación. Empleo tal cual o extrayendo, precipitando con alcohol y secando. Formación máxima en 2-3 días antes de esporulación abundante.

Selección del cultivo. Medios líquidos con pH casi neutro, altos en nitrógeno y bajos en carbohidratos. Desarrollos a 30° C., con aereación regular. Pueden emplearse harinas de soya o cacahuete previamente hidrolizadas. Empleo tal cual o separando la especie por centrifugación antes de precipitar la amilasa.

De las glándulas pancreáticas del ganado (generalmente cerdos o caballos) secando al vacío y separando la grasa. Se purifican por extracción y precipitación con sales neutras ocupando fosfato de sodio, almidón, azúcar o harina de trigo, como vehículo del concentrado.

## b.—METODOS PARA DETERMINAR LAS ACTIVIDADES ALFA. BETA-AMILASICAS Y PODER LICUEFACIENTE

Una de las características principales de cualquier técnica analítica debe ser su especificidad para la determinación que se intenta.

Sumner y Northrop han establecido que si los enzimos son entidades químicas con moléculas de naturaleza proteica, principalmente, su "unidad" quedaría representada por una molécula al estado de pureza (alrededor de 35,000 g.); o en todo caso, por una micromolécula. Las dificultades obvias para que así pudiera ser, originó, desde hace tiempo, el empleo de métodos que miden la actividad enzimática bajo unidades sujetas a un conjunto de condiciones que determinan el valor de las relaciones encontradas. Es así como se han desarrollado una serie de métodos en los que varían: la temperatura, según conveniencias particulares; la concentración de enzimo, para lograr un ajuste en el tiempo; la del sustrato, con el mismo objeto o para obtener características diferentes del punto final según obliguen las circunstancias especiales de trabajo y de allí que las "unidades" se definan según las peculiaridades de cada técnica, pero sin descuidar la condición en principio anotada.

Las alfa y beta-amilasas se encuentran en ese caso y la expresión de sus respectivas "unidades" quedarán indicadas en la serie de métodos descritos a continuación:

1.—Determinación del poder sacarificante.—Método de Linnér.—(4).—El principio original se basa en la proporcionalidad directa, con respecto a la dilución, de dos preparaciones que en igual

tiempo producen transformaciones idénticas; lo que haría clasificarlo en una categoría de "equivalencia por superposición".

La "escala Lintner asigna un valor diastásico de 100 a la malta que con sólo 0.005 g. (equivalente a 0.1 ml. de un extracto al 5%) reduce 5 ml. de solución de Fehling al actuar sobre almidón soluble al 2% a 21° C. durante 1 hora".

**Reactivos:** solución de almidón soluble al 2%. El almidón se prepara según la especificación de Lintner: mezclar almidón de papa de pureza elevada con HCl al 7.5% y dejar en reposo por 6 días a 17-20° C. Separar el exceso de ácido por lavados y neutralizar el remanente con pequeña adición de NaHCO<sub>3</sub>. Lavár otra vez y secar en corriente de aire caliente. Solución de Fehling.

**Técnica:** Extraer 25 g. de la muestra finamente molida con 500 ml. de agua a temperatura ambiente por 5 horas. Filtrar.

En 10 tubos de ensaye colocar 10 ml. de la solución de almidón a cada uno. Agregarles, respectivamente, 0.1 a 1.0 ml. del extracto filtrado y agitar. Colocarlos en baño de agua a 21° C. durante 1 hora. Adicionarles, al final, 5 ml. de la solución de Fehling y llevarlos a un baño de agua hirviendo por 10 minutos. Después de que los precipitados sedimenten, escoger 2 tubos: aquél en que hubo reducción completa del cobre y el inmediato anterior (presencia o ausencia de color azul o usar ferrocianuro como indicador); la cantidad de malta necesaria se estima entre los dos.

$$\frac{10}{A} = \text{°Lintner}$$

A, ml. del extracto de malta al 5% necesarios para la determinación.

Se debe corregir la reducción debida al almidón (5 ml. de solución de Fehling, 10 de almidón y 10 de agua. Calentar a ebullición. Medir los ml. necesarios para desaparición de color. Calcular en la forma anterior y restar del valor previamente encontrado).

Lintner empleó esta técnica para determinar la actividad de las "preparaciones diastásicas" sólo que expresadas en términos de "una diastasa" de la que necesitaba 0.12 mg. para formar los azúcares suficientes para reducir 5 ml. de Fehling. Se prepara una

disolución valorada de la muestra, se procede como antes y se calcula por la fórmula:

$$\frac{0.12 \times 100}{A} = \text{°Lintner ("escala diastásica")}$$

A. mg. del enzimo (de acuerdo con la disolución) necesarios para la determinación.

2.—**Determinación del "poder diastásico" de la malta. American Society of Brewing Chemists y Association of Official Agricultural Chemists. (1)**

Da valores sobre la escala Lintner a 20°C. y 30 min. de reacción, pudiendo tomarse como una modificación del anterior.

#### Reactivos:

a).—Solución buffer de acetato: 68 g. de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en 500 ml. de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  N. y completar con agua a 1 litro.

b).—Solución de Fehling. Modificación de Soxhlet.

c).—Solución alcalina de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  0.05 N.

d).—Solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.05 N.

e).—Solución de ácido acético: 200 ml.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 70 g.  $\text{KCl}$  y 20 g. de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  por litro.

f).—Solución de yoduro de potasio: al 50% + 1 gota de  $\text{NaOH}$  (1 + 1) por cada 100 ml.

g).—Solución de almidón soluble: 2 g. secos en 100 ml.—Suspender en agua fría y verter en agua hirviendo con agitación constante y sin cesar la ebullición.—Hervir 2 min. más; agregar agua destilada, transvasar a un matraz aforado, enfriar a 20°C., agregar el tampón (2 ml. por cada 100) y aforar.

Especificaciones del almidón: solubilidad en agua caliente 1:50 Dextrinas o reductores menos de 0.75%.—Humedad 10-12% pH de la solución fresca, sin tamponar, 4.5-5.5.—Se pueden emplear almidones que no originen desviaciones mayores de 5°L. respecto de éste.

• **Técnica:** Extraer 25 g. de la muestra molida con 500 ml. agua durante 2.5 hs. a 20°C. agitando cada 20 min.—Filtrar (papel CS y S No. 588 de 30-32 cm.), regresando los primeros 50 ml. y recogiendo lo filtrado hasta 3 hs. después de iniciada la extracción.

Diluir 20 a 100 ml. del extracto anterior; 10 ml. de la dilución en un matraz aforado de 250 se llevan a 20° C.—Agregar 200 ml. de la solución de almidón y mantener la temperatura a 20° C. por 30 min. contados desde el momento en que se agregó.—Adicionar 20 ml. de NaOH 0.5 N. y aforar.

El poder reductor se calcula:

a).—Con solución de Fehling.—Hervir 10 ml. y 10 de agua en un Erlenmeyer de 200.—Agregar la solución de almidón transformado necesaria para titular (lectura A).—Titular un testigo en la misma forma excepto que la NaOH 0.5 N. se agrega al extracto antes del almidón (lectura B).—Aplicar la fórmula:

$$\frac{5,000 \times B}{A \times A} = \text{°Linter (base húmeda)}$$

$$\frac{\text{°L. (base húmeda)} \times 100}{(100 - \% \text{ humedad})} = \text{°Lintner (base seca)}$$

°L.  $\times$  4 = Maltosa equivalente (M. E.) (“gramos de sustancias reductoras expresadas como maltosa y producidas por 100 g. de malta en  $\frac{1}{2}$  hora sobre almidón soluble a 20° C. y bajo las condiciones que se especifican”).

b).—Con solución de ferricianuro de potasio.—Se procede como en la técnica 11-b. en la parte correspondiente.—Fórmula:

$$\text{°Lintner (base húmeda)} = (B - A) \times 23$$

B, ml. de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.05 N. empleados en la titulación testigo.

A, ml. de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.05 N. empleados en la determinación.

### 3.—Determinación de los “poderes diastáticos relativos” de la malta.—F. C. Silbernagel.—(19).

Es una técnica que pretende preservar la escala Lintner y relacionar con el efecto licuefaciente de la malta sobre el almidón de papa gelatinizado, durante 30 min. a 21° C.

Emplea extracción al 5% durante 2 hs. a temperatura ambiente. Almidón de papa gelatinizado al 2%, tamponado a pH

4.8 con acetato de Walpole y NaOH 0.1 N. para inactivar al concluirse los 30 min. de reacción.

Se determina por el volúmen (y) de la solución de almidón transformado, necesario para reducir completamente el cobre de 2 ml. de solución de Fehling en las mismas condiciones que para el método de Lintner.

Calcula de acuerdo con la fórmula de Ling (Allen's Commercial Analysis; v-I p. 137) basada en la escala Lintner y la cual, con las modificaciones precisas para adaptarla a las concentraciones empleadas se expresa del modo siguiente:

$$\text{"Poder diastático"} = \frac{800}{y}$$

#### 4.—Modificación gravimétrica del método de Lintner.—Sykes y Mitchell.—(4)

Se tratan 100 ml. de almidón soluble al 2% con 1 de extracto de malta al 5% a 21°C. por 1 hora.— Se agregan 50 ml. de solución de Fehling y se calienta en baño de agua hirviendo durante 7 min.—El peso de cobre reducido entre 0.438 (g. de cobre en 50 ml. de Fehling) y multiplicado por 100 da el "poder diastático" en grados Lintner.

#### 5.—Modificación polarimétrica del método de Lintner.—Gore (4).

Solución de almidón soluble al 2%.—Extracto al 5%.

Se determina la polarización (°V.) de la siguiente mezcla: 50 ml. de almidón, 0.5 ml. de amoníaco y 0.5 de la preparación de enzimo en tubo de 40 cm. a 21°C.

Se dejan reaccionar a 21°C. 100 ml. de almidón y 1 de la preparación de enzimo durante un tiempo tal que la polarización no disminuya en más de 3°V.—Se toma una fracción de 50 ml.; se agregan 0.5 ml. de amoníaco y se polariza después de 25 min. (°V').—Se aplica la fórmula:

$$^{\circ}\text{Lintner} = \frac{100 (^{\circ}\text{V} - ^{\circ}\text{V}')}{2.18 t}$$

t, tiempo (medido en horas) necesario para obtener el valor (°V - °V'). 2.18, valor de polarización en 1 hora cuando se emplea una malta de 100°L.

**6.—Determinación del "poder sacarificante" de la amilasa de la malta.—Adaptación del método de Hagedorn y Jensen.— H. C. Gore y H. K. Steele. (5).**

El micrométodo de Hagedorn y Jensen se indicó para la determinación de azúcar en la sangre.—

Se basa en la reducción del ferricianuro.

**Reactivos:** solución buffer, acetato Walpole, pH 4.6 (102 ml.  $\text{CH}_3\text{COOH}$  N. y 98 ml. de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  N. por litro).—Soluciones 0.4 N. de NaOH y HCl.—Soluciones 0.05 N. de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  y  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .—

**Soluciones:** de ácido acético (200 ml. de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial, 70 g. de KCl y 20 g. de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  por litro).—De KI (50 g. por 100 ml. más 1 gota de NaOH).—Indicador de almidón (al 1% en solución salina al 30%).

Extracción acuosa al 5% por 1.5 hs. a temperatura ambiente. Dilución 1:10.—Solución de almidón soluble: calentar a cerca de ebullición 750 ml. de agua destilada; agregar 22 g. de almidón soluble Lintner.—Enfriar, agregar 50 ml. de solución buffer y diluir a 1 litro a temperatura ambiente.

**Técnica:** agregar a 10 ml. del extracto diluido a 20°C., 100 de la solución de almidón a la misma temperatura, la cual se mantiene por 30 min. desde el principio de esta adición.—Suspender la actividad con 20 ml. de NaOH 0.4 N. y neutralizar con 20 de HCl 0.4 N., aforando posteriormente a 200.

A 25 ml. de esta solución agregar 50 del ferricianuro; calentar en baño de agua hirviendo por 15 min.—Enfriar a temperatura ambiente, agregar 125 de ácido acético, 5 de yoduro y titular con tiosulfato (lectura A).

La determinación testigo se efectúa mezclando 10 ml. de extracto diluido, 20 de NaOH 0.4 N., 20 de HCl 0.4 N., y 100 de almidón; aforar y determinar el poder reductor de una alícuota de 25 ml. (lectura B).

Cálculos:

$$^{\circ}\text{Lintner} = 8.092 F.$$

$F = B - A$ , volumen de ferricianuro 0.05 N. consumido.

La fórmula se obtiene de la escala de Lintner para maltas.—Según Browne:



50 ml. de solución de Fehling = 438 mg. cobre = 493.1 mg.  $\text{Cu}_2\text{O}$   
Por extrapolación de las tablas de Munson y Walker:

493.1 mg  $\text{Cu}_2\text{O}$  = 408.3 mg. de Hidrato de maltosa.

Es decir, las substancias reductoras que principalmente son maltosa, equivalentes en poder reductor a 408.3 mg. de hidrato de maltosa, se forman en condiciones uniformes por 50 mg. de malta de 100° L.

Una alícuota de 25 ml. del almidón sacarificado corresponde a 6.25 mg. de muestra que si fuera de 100°L. y actuara sobre almidón en condiciones normales a 21°C. produciría 51.04 mg. de reductores por hora.

Se estima que el aumento de actividad Lintner por 1°C. es aproximadamente de 8%.

Por lo tanto a 20°C. en vez de 21°C. sólo produciría el 92% del valor anterior o sea 46.96 mg./hora y 23.48 por 30 min.— Al aceptar la ley de proporcionalidad de Kjeldahl se puede escribir:

$$^{\circ}\text{Lintner} = \frac{100 \text{ m}}{23.48}$$

m. mg de substancias reductoras reconocidas como hidrato de maltosa.

Experimentalmente se ha encontrado que la relación de mg. de hidrato de maltosa en 25 ml. a ferricianuro alcalino 0.05 N. reducido queda expresada por el factor 1.9.—Es decir:  $m = 1.9 F$ .

$$\therefore ^{\circ}\text{L.} = \frac{100 \text{ m}}{23.48} = \frac{100 \times 1.9 F}{23.48} = 8.092 F.$$

**7.—Valoración de maltas para la producción de alcohol de trigo.—C. B. Thorne, R. L. Emerson, W. J. Olson, W. H. Peterson.—(23).**

En la producción de alcohol con substratos amiláceos la actividad enzimática de una malta es de valor informativo pero no decisivo para su estimación completa, ya que otros factores indeterminados son también importantes.

Sin embargo, el valor Lintner o bien las actividades alfa y beta no deben descartarse totalmente.—No todos los trigos con-

tienen la amilasa suficiente para una autolicefacción íntegra y la cantidad de malta agregada para favorecer el proceso queda ligada significativamente con sus alfa y beta-amilasas cuando se emplean bajas concentraciones con tiempos grandes en la fermentación; o con su alfa-amilasa, factor que en el caso se sugiere más importante, para concentraciones más altas y tiempos más cortos.

Lo mejor, será pues, agregar a estos datos el que se obtenga por la cantidad de alcohol producido en una fermentación con esa malta.

Si se supone que la práctica industrial tiene 48 hs. como período de fermentación, las maltas pueden clasificarse como excelentes, buenas, medianas y pobres. De acuerdo con ésto, se han indicado como las mejores condiciones una concentración de malta menor del 8% y un tiempo de fermentación menor de 72 o aún 48 hs.

Las "actividades amilásicas" se determinan en °Lintner o en maltosa equivalente por el método A. A. C. C. (Cereal Laboratory Methods, 1941) o algún otro y las unidades alfa y beta por el de Kneen, Sandstedt y Blish o alguna de sus modificaciones.

**Técnica:** preparar 7 litros de una suspensión con 22.25% de harina, en agua (equivalente a 22.25 g. de granos secos por 100 ml. de medio).—Extraer durante 15 minutos a temperatura ambiente.—Ajustar el pH a 5.6 con  $H_2SO_4$ , 1 N.—Calentar por 1 hora en baño de agua hirviendo con agitación continua y enfriar poniendo rápidamente las pérdidas por evaporación.—Esterilizar en autoclave a 15 lb./pulg.<sup>2</sup>, alícuotas de 600 ml. en matraces de 1 litro agregadas de 5 gotas de Vegifat Y para evitar espuma.

(En los experimentos efectuados por los autores se siguió este procedimiento, excepto que al trigo de invierno se le agregó desde un principio 1% de malta, a fin de completar la licuefacción.—El de primavera contuvo suficiente amilasa para provocarla).

Para sacarificar el medio, enfriar los matraces hasta 65° C. y agregar a cada uno la cantidad deseada de malta (finamente molida y en suspensión al 10%); agitar vigorosamente y enfriar en el chorro del agua.—Ajustar el pH a 4.8 con  $H_2SO_4$  y agregar 10 ml. de la suspensión de levadura (estrias de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de la planta Lawrenceburg de Joseph E. Sea-

gram and Sons, resemebrada de agar a un tubo con 10 ml. de un medio conteniendo: 3% de extracto de tallitos de malta y 5% de glucosa, con desarrollo de 24 hs. a 30°C.—Del tubo, pasar a 200 ml. del mismo medio y desarrollar 24 hs. a 30°C.; centrifugar al cabo de este tiempo y suspender el sedimento en 20 ml. de agua de los cuales 10 sirven para inocular un matraz).—Diluir a 750 ml. para tener un equivalente de 17.8 g. de trigo por 100 ml.—Tomar alícuotas de 350 ml. y colocarlas en un Erlenmeyer de 500 con un depurador (un tubo de vidrio unido a un tubo de ensaye de 20 cm. con 3/4 partes lleno de agua) a fin de recuperar el alcohol arrastrado por el desprendimiento de bióxido de carbono.—Incubar a 30°C. por el tiempo necesario, agitando de vez en cuando.

Al término del período de fermentación diluir los contenidos de cada matraz a 500 ml. con el agua del depurador y algo más si se necesita.—Tomar una alícuota de 200 y destilar alrededor de 95 ml.; completar a 100 con agua y determinar el contenido alcohólico en una balanza de Westphal por medio de una curva obtenida con soluciones conocidas o empleando tablas ya calculadas.

Los valores se indican como galones (proof) de alcohol etílico por 100 lbs. de granos secos. Los resultados de los experimentos duplicados checan, normalmente, con diferencias de 0.05 galones (proof) de alcohol por 100 lbs. de granos secos.

Se toma como relación para valorar las fermentaciones, el dato de 10 galones (proof) de alcohol por 100 lbs. de granos secos.

8.—**Método de Wohlgemuth.**—(3, 4, 13). Mide la dextrinización producto de la acción combinada de las alfa y beta-amilasas y no representa una medida real de la beta.

Se aprecia por la desaparición del color azul con yodo, después de agregar el enzimo al almidón soluble y se basa en la regla de Osterhout o "de tiempo y concentración inversas" (el tiempo requerido para producir un grado determinado de conversión es inversamente proporcional, dentro de ciertos límites, a la concentración del enzimo).

Se expresa como el "número de ml. de una solución de almidón soluble al 1% que pueden convertirse por 1 ml. ó 1 g. de la preparación de enzimo en 30 min. a 40° C".

Se determina tratando fracciones de 5 ml. de solución de almidón Lintner al 1% con cantidades variables (ml.) de la preparación

de enzima a 40° C. por 30 min. Diluir hasta un mismo volumen y agregarles 1 gota de solución 0.1 N. de yodo seleccionando el tubo en que no se obtiene coloración azul, como el que satisface los requisitos del método.

9.—**Determinación de las amilasas de la malta por los métodos de Nebraska (recopilados, modificados y comentados por Eric Kneen).** (11).

α.—**Determinación de la actividad alfa-amilásica.—Sandstedt-Kneen - Blish, con liegras modificaciones.** (11-α).

#### **Preparación de extracto de malta.**

Extraer 5 g. de malta finamente molida con 100 ml. de agua destilada por 1 hora a 30° C., mezclando por rotación cada quince minutos; centrifugar el extracto por 5 minutos y filtrar por algodón. Tomar 10 ml. del filtrado y diluir a 100 con solución de  $\text{CaCl}_2$  al 0.2%. Antes de proceder a determinar la actividad, colocar el matraz con el extracto diluido en un baño a 30° C. para llevarlo a la temperatura de reacción.

Cuando no sea posible centrifugar dejar que la harina sedimente antes de que finalice el tiempo de extracción y filtrar, decantando, por papel Whatman No. 4 en un embudo de 60°. El extracto suficiente para la determinación se tiene en menos de 5 minutos. Las primeras gotas del filtrado se desechan.

#### **Reactivos:**

**Solución original de yodo:** diluir con agua a 250 ml. 5.5 g. de yodo en cristales y 11 g. de yoduro de potasio. Guardar en frasco oscuro y renovar cada mes.

**Solución de yodo (A) (para standard):** diluir con agua a 200 ml. 15 ml. de la solución original de yodo y 8 g. de yoduro de potasio. Guardar en frasco oscuro y renovar cada semana.

**Solución diluida de yodo (B):** diluir con agua a 500 ml. 2 ml. de la solución original de yodo y 20 g. de yoduro de potasio. Al efectuar las comparaciones, esta solución deberá estar a la temperatura de reacción (30° C.).

**Solución de Dextrina:** diluir con agua a 1,000 ml. 0.6 g. de dextrina "Reactivo" Merck (12% de humedad); es decir, 0.528 g. de dextrina seca. Preparar una suspensión de dextrina y transva-

sar cuantitativamente en agua hirviendo. Enfriar y aforar saturando con toluol. Guardar en refrigerador. Esta solución puede conservarse casi indefinidamente pero conviene renovarla cada mes o menos.

**Solución buffer:** diluir con agua a 1,000 ml. 120 de ácido acético glacial y 164 g. de acetato de sodio anhidro.

**Substrato tamponado de dextrina (alfa-amilodextrina):** preparar una suspensión de 10 g. (peso seco) de almidón soluble Merck (especificación Lintner y especial para determinaciones de actividad amilásica) y verter lentamente en agua hirviendo, agitando por 1 ó 2 minutos. Enfriar y agregar 25 ml. de solución buffer y 250 mg. de beta-amilasa "especial" (generalmente los 0.250 g. de beta-amilasa se disuelven en una poca de agua y se transvasan cuantitativamente al almidón). Aforar a 500 ml. saturando con toluol y conservar a 30° C., por no menos de 24 ni más de 72 horas.

**Nota:** la cantidad de beta-amilasa se agrega calculada sobre la base de 50 mg. de una preparación con actividad de 2,000°L., por 100 ml. de substrato final. Si se emplea una preparación de beta-amilasa de mayor o menor actividad, puede hacerse un ajuste apropiado de la cantidad necesaria. Se observarán las mayores precauciones para que la preparación de beta-amilasa sea como lo especifica el Comité de Valoración de Maltas. Al aumentar la proporción, no deberán variar en más de 5% los tiempos de dextrinización de un extracto de malta standard cuando se comparen los substratos de uno a tres días. En otras palabras, un substrato preparado con doble adición de la cantidad de beta-amilasa indicada, no debe desviarse más del 5% de aquél que se preparó con 50 mg. de beta-amilasa de 2,000 °L., por 100 ml. de volumen.

#### **Técnica:**

**Preparación del standard:** medir con pipeta 5 ml. de la solución de yodo (A) y verter en un tubo de comparación (como tales pueden servir los Pyrex de 15 ml. cónicos, para centrifuga; o también los de ensaye Pyrex de 12.5 x 100 mm.). Agregar 1 ml. de la solución de dextrina y homogeneizar. Al efectuar las compara-

ciones de color, esta solución deberá tener la temperatura de reacción (30°C.). El standard debe renovarse diariamente.

**Determinación de la alfa-amilasa:** transvasar 20 ml. del substrato tamponado de dextrina a un Erlenmeyer de 50 y llevar a baño de agua a 30° C. (puede colocarse en la base del matraz una lámina de plomo para hacerlo bajar). Después de unos cuantos minutos agregar 10 ml. del extracto de malta diluido (con malta de actividad alta sólo se necesitarán 5 a fin de que el tiempo de dextrinización sea entre los 15 y 60 minutos. En este caso, se agregan al substrato 5 ml. de agua antes de llevarlo a la temperatura de reacción). Para reducir los errores inherentes a la lenta mezcla del enzimo con el substrato, se soplará por la pipeta al desalojar el extracto.

A intervalos apropiados verter aproximadamente 1 ml. de la mezcla hidrolizante en 5 ml. de la solución de yodo diluida (B) contenidos en un tubo de comparación; homogeneizar y comparar el color con el standard. Estas comparaciones se efectúan fácilmente ante una pantalla luminosa de 100 Watts y con bulbo de "luz del día". Se recuerda que el standard y la solución diluida de yodo deberán estar a la misma temperatura (30° C.), al compararse. Cuando esté próximo el punto final, la adición de la mezcla reaccionante a la solución de yodo deberá hacerse cuidadosamente valiéndose de una pipeta exacta de 1 ml.

Del tiempo necesario para la dextrinización y el peso de malta representado por la alícuota de extracto, se calculan las unidades de alfa-amilasa.

**"Unidad de alfa-amilasa es el número de gramos de almidón soluble que en presencia de un exceso de beta-amilasa son dextrinizados por 1 g. de malta en 1 hora a 30° C".**

Por ejemplo, si 10 ml. del extracto diluido (0.05 g. de malta) dextrinizan 20 ml. del substrato (0.4 g. de almidón) en 20.5 minutos, la actividad alfa-amilásica estará representada por:

$$\frac{0.4 \times 60}{0.05 \times 20.5} = 23.4 \text{ Unidades de alfa-amilasa (base húmeda)}$$

Este valor, multiplicado por 100 y dividido entre el contenido porcentual de materia seca de la malta, dará las unidades de alfa-amilasa sobre base seca.

De igual manera, si una alícuota de 5 ml. dió un tiempo de dextrinización de 20.5 minutos, la actividad será:

$$\frac{0.4 \times 60}{0.025 \times 20.5} = 46.8 \text{ Unidades de alfa-amilasa (base húmeda).}$$

b.—**Determinación de la actividad sacarificante.**—E. Kneen y R. M. Sandstedt, con modificaciones. (11-b).

### Preparación del extracto de malta

De la misma manera que para la actividad alfa-amilásica (11-a): Generalmente se emplea el mismo extracto para ambas determinaciones.

### Reactivos

**Solución de almidón al 2% tamponada:** preparar una suspensión con 10 g. (peso seco) de almidón soluble Merck (especificación Lintner) en agua destilada y verter en 350-400 ml. de agua hirviendo, agitando fuertemente por uno o dos minutos después de agregado todo el almidón. Enfriar y agregar 25 ml. de la solución buffer y completar con agua a 500 ml. Este almidón deberá renovarse diariamente.

**Solución de ácido sulfúrico (1% en volumen):** diluir con agua a 1,000 ml. 10 de  $H_2SO_4$  concentrado.

**Solución alcalina 0.1 N. de ferricianuro:** 33 g. de  $K_3Fe(CN)_6$  puro, seco y 44 g. de  $Na_2CO_3$  anhidro, por litro.

**Solución 0.1 N. de tiosulfato:** 24.82 g. de  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  y 3.8 g. de bórax ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) por litro.

**Mezcla de sal y ácido acético:** 200 ml. de  $CH_3COOH$  glacial, 70 g. de KCl y 40 g. de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  por litro.

**Solución combinada de 2% de almidón soluble y 50% de yoduro de potasio:** preparar una suspensión con 2 g. (peso seco) de almidón soluble en una pequeña cantidad de agua fría y verter lentamente en agua hirviendo, con agitación constante. Continuar calentando y agitando por unos cuantos minutos; enfriar y agregar 50 g. de KI completando con agua a 100 ml. y agregando 1 gota de solución saturada de NaOH.

## Técnica

Medir con pipeta 20 ml. de la solución de almidón al 2%, tamponada y verter en un Erlenmeyer de 100-125 colocándolo en baño a 30° C. Cuando el contenido ya tenga esta temperatura agregar 10 ml. (equivalente a 0.05 g. de malta) del extracto diluido. Con maltas de actividad alta sólo se agregarán 5 (equivalente a 0.025 g.); en este caso se agregan, además, 5 ml. de agua a los 20 de almidón antes de llevar a la temperatura de reacción. Para maltas de actividad baja y para extractos de cebada son suficientes los 10 del extracto diluido (las razones son obvias: el grado de conversión del almidón en el período que se hace reaccionar no debe exceder al 40% a fin que se preserve la ley de proporcionalidad de Kjeldahl). La alícuota de extracto deberá desalojarse de una pipeta exacta, soplando. El error que pueda cometerse es considerablemente menor que el causado por una lenta introducción del enzimo.

Permitir que la reacción se efectúe por 15 minutos exactos a 30° C. y agregar con agitación vigorosa 20 ml. de la solución de ácido sulfúrico al 1% medidos con una pipeta exacta. Inmediatamente después de esto, transvasar una alícuota de 5 ml. a un tubo de ensaye conteniendo 10 de la solución alcalina 0.1 N. de ferricianuro; mezclar y colocar en baño de agua hirviendo por 20 minutos exactos (pueden emplearse tubos Pyrex, con labio, de 25 x 200 mm.).

Al terminarse los 20 minutos entriar el tubo en una corriente de agua fría (2 a 4 minutos) y ya frío transvasar su contenido a un matraz (Erlenmeyer de 125). Agregar 25 ml. de la solución de sal y ácido acético al tubo de ensaye y vaciarlos en el matraz, mezclando el contenido (al introducir la solución de mezcla en el tubo se deja escurrir por sus paredes para arrastrar el resto de ferricianuro). Agregar ahora 1 ml. de la solución de almidón y yoduro de potasio; mezclar y titular con la solución 0.1 N. de tiosulfato.

Hacer una determinación testigo adicionando 20 ml. de la solución de ácido sulfúrico al 1% a 20 del almidón **seguida** de una alícuota del extracto de malta (10 ó 5 ml. del diluido según el caso). 5 ml. de esta solución se calientan con ferricianuro y se continúa como antes.



De la titulación testigo restar la encontrada para la reacción con malta a fin de encontrar los ml. de ferricianuro 0.1 N. reducido. Empleando la tabla No. I de Kneen y Sandstedt o más convenientemente una gráfica preparada para el objeto, calcular los mg. de maltosa equivalentes al ferricianuro reducido. Multiplicar este dato por 10 para dar la cantidad de maltosa en el total de la mezcla reaccionante.

**"La actividad sacarificante en unidades K-S se define como el número de gramos de almidón soluble convertidos a maltosa por 1 g. de malta, en 1 hora a 30° C."**

El número de mg. de maltosa producidos durante la reacción, multiplicados por 0.95 (para convertir a almidón) dividido entre 1,000 (conversión a gramos) multiplicado por 4 (60/15 para dar el valor hora) y dividido entre el peso de malta empleado (g. en la alícuota), da el valor unitario.

Ejemplo: si la titulación testigo menos la titulación de la reacción dió una lectura de 4 ml. de ferricianuro reducido por 10 del extracto diluido (0.05 g. de malta) la actividad sacarificante será:

$$\frac{118.3 \times 0.95 \times 60}{1,000 \times 0.05 \times 15} = 8.99 \text{ Unidades K-S (base húmeda)}$$

Este valor, multiplicado por 100 y dividido entre el contenido porcentual de materia seca de la malta, dará las unidades sobre base seca.

**c.—Determinación de la actividad beta-amilásica.—E. Kneen y R. M. Sandstedt. (11-b).**

**"La unidad de beta-amilasa se define como el número de gramos de almidón soluble convertidos a maltosa por la beta-amilasa de 1 g. de malta, en 1 hora a 30°C."**

Las alfa y beta-amilasas tienen propiedades aditivas de sacarificación y la actividad sacarificante de la alfa puede calcularse con facilidad (en función de su actividad dextrinizante según el método descrito) para determinar la actividad beta-sacarogénica absoluta. Se procede de la manera siguiente:

1.—Determinar los minutos requeridos para la dextrinización por la alfa-amilasa de acuerdo con el método de Sandstedt, Kneen y Blish.

2.—Encontrar el total de miligramos de maltosa producidos en 15 minutos (de acuerdo con la técnica 11-b) tomando la precaución de que la concentración de malta usada no hidrolice al almidón en cantidad mayor del 40% (los datos varían de 0.01 g. para maltas de actividad elevada, a 0.05 para las bajas).

3.—Calcular en minutos recíprocos, el tiempo de dextrinización para la cantidad de alfa-amilasa presente en la muestra de malta empleada para sacarificar. Este valor se obtiene multiplicando el recíproco del tiempo (en minutos) en contrato en la determinación de la alfa-amilasa, por el factor:

Malta equivalente empleada para sacarificación (g).

Malta equivalente empleada para alfa-dextrinización (g).

Si la actividad alfa se registra en unidades de Sandstedt, Kneen y Blish, los minutos recíprocos deseados para la cantidad de alfa-amilasa que actúa en la sacarificación, pueden obtenerse multiplicando tales unidades por el factor:

Malta equivalente empleada para sacarificación (g).

0.4 x 60

4.—Usando la tabla No. II que relaciona las actividades sacarogénicas y dextrinogénicas de la alfa-amilasa, encontrar la maltosa que corresponde al valor de los minutos recíprocos para la alfa-amilasa que toma parte en la sacarificación. Restar esta cifra del total de miligramos de maltosa producidos en los 15 minutos de sacarificación. La diferencia representa los miligramos de maltosa producidos por la beta-amilasa de la muestra.

5.—Las unidades de beta-amilasa pueden, entonces, calcularse de acuerdo con la definición.

**Ejemplo:** los datos necesarios son:

Contenido de materia seca .....	93.07 %
Tiempo de alfa-dextrinización para un equivalente de 0.05 g. ....	14 min.
Sacarificación por un equivalente de 0.03 g.; ferri-cianuro 0.1 N. reducido por alícuota de 5 ml. (tes-tigo-titulación) .....	4.26 ml.

Cálculos:

Maltosa producida por equivalente de 0.03 g. (Tabla I) ..... 126.5 mg.

Tiempo de alfa-dextrinización para equivalente de 0.05g.

$$\frac{0.03}{0.05} \times \frac{1}{14} = 0.0429 \text{ minutos recíprocos.}$$

Maltosa debida a la actividad alfa (Tabla II). ..... 13.6 mg.

Maltosa debida a la actividad beta:

126.5 - 13.6 ..... 112.9 mg

Almidón convertido a maltosa por la beta-amilasa en 15 minutos de sacarificación:

$$112.9 \times 0.95 = 107.3 \text{ mg.}$$

Almidón convertido en 1 hora:  $\frac{60}{15} \times 0.1073$  ..... 0.429 g.

Peso seco de malta equivalente empleada para la sacarificación:

$$\frac{93.07}{100} \times 0.03 = 0.0279$$

Almidón convertido a maltosa por la beta-amilasa de 1 g. de malta en 1 hora a 30° C. (unidades de beta-amilasa).

$$\frac{0.429}{0.0279} = 15.38 \text{ g.}$$

Es decir, la malta tiene una actividad beta-amilásica de 15.4 unidades.

Para todo objeto práctico y dentro de las variedades normales de maltas, el valor beta-amilásico puede obtenerse por la fórmula:

$$\left( \text{Unidades sacari-} \right) - \frac{\text{Unidades alfa-amilasa}}{20} = \text{Unidades K-S de beta-amilasa}$$

En el mismo ejemplo:

Unidades alfa para 14 minutos y 0.05 g. ....	34.29
Unidades sacarificantes K-S para 0.03 g. (126.5 mg. maltosa equivalente) .....	16.02

$$\text{beta-amilasa} = 16.02 - \frac{34.29}{20} = 14.31 \text{ Unidades base húmeda.}$$

$$\text{beta-amilasa} = \frac{14.31 \times 100}{93.07} = 15.38 \text{ Unidades base seca.}$$

**Notas relativas a los métodos 11-a y 11-b:** la beta-amilasa libre de huellas de actividad alfa (especificaciones del Malt Evaluation Committee) se puede obtener en The Wallerstein Company, 180 Madison Avenue, New York 16, N. Y.

El almidón soluble Merck (especificación Lintner, especial para determinaciones de actividad amilásica) y la Dextrina "Reactivo" Merck se puede obtener de P.W.R. Export Corporation (distribuidores de exportación de Merck & Co. Inc. de Rahway, New Jersey) 161 Avenue of the Americas New York 13, N. Y. y en México, D. F., de Drogas Begne S. A., Orizaba No. 7.

**10.—Determinación de las actividades alfa y beta-amilásicas "totales".—Métodos de Nebraska. (11).**

Frecuentemente se desea tener conocimiento de la cantidad "total" de amilasas presentes en una malta o en una cebada. La extracción para este objeto se efectúa agregando 0.5 g. de una papaína activa a 5 g. de malta de cebada finamente dividida y extraer con solución de cloruro de calcio al 0.2% y determinar las actividades de la manera acostumbrada. Para la actividad alfa-amilásica "total" de las maltas, pueden emplearse las mismas alícuotas que para la "libre"; es decir, 10 ml. para una malta baja y 5 para una alta. Para la beta, sería aproximadamente la mitad de la empleada para la actividad "libre": 5 ml. para una malta baja y 2 ó 3 para una alta.

**11.—Micrométodo para determinar la actividad alfa-amilásica.—Kneen-Sandstedt-Hollenbeck. (10).**

Sin constituir desviación de la técnica de Kneen-Sandstedt-Blish, se aplica para determinar cantidades muy pequeñas del enzimo.

Dejar actuar una cantidad de extracto equivalente a un peso más o menos elevado de la muestra (0.1 a 1.0 g. según la actividad) sobre 20 ml. del almidón Lintner al 2% (tratado con beta-amilasa) por 16 a 18 hs. a 30° C. Al final de este período agregar a la muestra y a otra porción del mismo almidón (determinación testigo) igual cantidad de un extracto de malta.

Medir los tiempos de dextrinización de ambas según la técnica general. Cualquier disminución del tiempo de dextrinización "en blanco" es proporcional al grado de dextrinización que tiene lugar bajo la acción prolongada en la muestra problema; ésta a su vez, proporcional a la cantidad de alfa-amilasa que contiene. El cálculo se efectúa como sigue:

$$\frac{24}{\left( \begin{array}{c} \text{peso del material} \\ \text{empleado} \end{array} \right)} \times \left( \begin{array}{c} \text{Tiempo total de} \\ \text{reacción} \end{array} \right) \times \frac{T}{T - T'}$$

T = tiempo de dextrinización en el testigo.

T' = tiempo de dextrinización en el problema.

Ejemplo: el equivalente de 0.1 g. de muestra actuó sobre el substrato por 18 hs. Al final de este tiempo se agregaron cantidades equivalentes de malta a la muestra y al substrato que servía de testigo. El tiempo de dextrinización "en blanco" fué de 20 min., y el del problema 10 min. Su actividad alfa será:

$$\frac{24}{0.1 \times 1,080 \times 20} = 0.11 \text{ unidades.}$$

$$\frac{24}{20-10}$$

18 hs. x 60 min. = 1,080 min.

## 12.—Micrométodo para determinar la actividad beta-amilásica.—Kneen.—(12).

Se desarrolló al estudiar los sistemas amilásicos de la malta de sorgo, basándose en el hecho de que entre sus extractos calentados y no calentados existe una diferencia marcada en cuanto a su capacidad para formar azúcares fermentescibles, debido a la inactivación que de la beta-amilasa se provoca. En los extractos no calentados la sacarificación es propiedad aditiva de los dos

enzimos; en los calentados, la escasa proporción de azúcares reductores o fermentescibles sólo provienen de la actividad del alfa-enzimo.

La técnica se reduce, por tanto, a igualar dos curvas fermentativas, bajo las mismas condiciones: la obtenida por el extracto de la muestra en estudio y la que resulta de agregar al extracto precalentado, cantidades variables de beta-amilasa pura, cuya actividad se conoce.

La fermentación se sigue durante 24 hs. por el desprendimiento de bióxido de carbono determinado en mm. de mercurio en un "medidor de presión" diseñado por Sandstedt y Blish (Cereal Chemistry 11; 368-383; 1934) con ese objeto.

El medio de cultivo se coloca en ese aparato especial y se prepara de la manera siguiente:

10 ml. (equivalente a 600 mg. de almidón) de una solución de almidón soluble al 6%.

0.5 g. de levadura comprimida.

0.5 g. de activador seco para levadura (especial para las fermentaciones de maltosa).

El pH se ajusta a 6.0 con fosfato (los productos de la fermentación lo bajan hasta 4 después de 24 hs.).

Se agrega el volumen necesario de extracto y se completa con agua hasta 20 ml.

Los extractos se preparan durante 1 hora de extracción a 30° C.

La inactivación de la beta-amilasa se provoca calentando este extracto a 70° C., por 15 minutos.

Se debe ajustar el tiempo de dextrinización de los dos extractos, considerando que la pequeña cantidad de beta-amilasa presupuesta no afecta la cantidad de alfa activa; es decir, no afecta la actividad de este enzimo.

Para obtener la equivalencia de las dos curvas se agregan cantidades crecientes de una beta-amilasa, libre de alfa, con actividad conocida. Generalmente se emplean concentraciones que varían entre 0.005 y 0.05 mg. (pesos secos) que en todo caso deben ser insuficientes para variar el tiempo de dextrinización o la formación de azúcares reductores durante la dextrinización.

En las dos muestras, la actividad alfa es la misma porque así se han ajustado las condiciones; luego para obtener una curva de fermentación igual a la de la muestra (alfa y beta del extracto no calentado) se necesita: además de esa cantidad de alfa, los "X" mg. de beta-amilasa que se agregaron al extracto calentado. Como se conoce la actividad de aquélla, se puede saber la que corresponde a los "X" mg., que será igual a la del extracto en determinación. Relacionando con la alícuota empleada, se obtiene el valor final.

**13.—Estimación de la actividad de la beta-amilasa.—Noelting y Bernfeld.—(16).**

Incluye la determinación fotométrica de la maltosa formada, empleando como substrato una amilopectina preparada de acuerdo con Scoch. La maltosa produce una reducción cuantitativa de ácido 3-5-dinitrosalicílico obteniéndose una coloración café. El método es también útil para la alfa-amilasa.

**14.—Estimación de la alfa-amilasa.—Caldwell y Hildebrand.—(4).**

Se basa en la velocidad a la cual la preparación de enzimo hace que el almidón soluble pierda sus propiedades de precipitación con alcohol etílico y se cree más preciso si en su lugar se emplea una solución de eritrogranulosa.

**15.—Modificaciones de los métodos de Kneen y Sandstedt para determinar las amilasas alfa y beta en la malta de cebada.—W. J. Olson, Ruth Evans y Allan D. Dickson.—Universidad de Wisconsin y Departamento de Agricultura de E. U. (17).**

Emplea el método de Sandstedt Kneen y Blish para determinar la alfa-amilasa, con las modificaciones siguientes:

- a.—Su temperatura de reacción es 20° y no 30° C.
- b.—Extrae con los Métodos de Laboratorio para Cereales (Cereal Laboratory Methods, 4a. ed. 1941) en la técnica que indica para "poder diastásico".
- c.—Compara con un standard inorgánico (que a su vez es modificación del sugerido por Landis) que sustituye a la dextrina. Se prepara con 25 g. de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 3.84 g. de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , por

100 ml. de HCl 0.01 N. El sugerido por Landis (18) se forma con 20 g. de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 3 g. de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 10 ml. de HCl 0.1 N. y c.b. de agua para 100 ml.

- d.—La comparación se efectúa entre 6 ml. del standard indicado y 6 del problema (formados por la mezcla hidrolizante y el yodo) observados perpendicularmente sobre una lámpara fluorescente de "luz del día" de 15W. Se usan tubos de 10 cm. cuya variación en el nivel del contenido no debe ser mayor de 2 mm.

Determina la actividad sacarificante como el "poder diastásico" de Cereal Laboratory Methods (4a. ed. 1941) y la beta-amilasa en función de las propiedades de sacarificación aditivas de los dos enzimos (alfa y beta) de acuerdo con los cálculos siguientes:

- 1.—Actividad sacarificante de la malta ("poder diastásico") P.D., expresado en equivalentes de maltosa sobre base seca:

$$\text{P.D.} = \frac{(\text{Tit. testigo} - \text{Tit. muestra}) \times 144 \times 100}{(100 - \% \text{ humedad})}$$

cuando se emplean: 1 ml. de extracto (equivalente a 0.05 g. de malta) y 5 ml. de la mezcla hidrolizante para determinar el poder reductor.

- 2.—Actividad sacarificante de la alfa-amilasa (A) expresada en equivalentes de maltosa sobre base seca.

Se determina el tiempo en minutos, necesario para la dextrinización y en función del tiempo recíproco (1/min.) se obtiene el equivalente de sacarificación (valor K de la tabla No. III). Se aplica la fórmula:

$$A = \frac{K \times 100}{(100 - \% \text{ humedad}) \times \text{ml. extracto en dextrinización}}$$

- 3.—Actividad de la beta-amilasa (B) expresada en equivalentes de maltosa. Se obtiene por la diferencia entre la actividad sacarificante de la malta y la sacarificante de la alfa-amilasa.

$$B = (\text{P.D.}) - A$$



Ejemplo:

$K_3Fe(CN)_6$  0.05 N. reducido por 5 ml. de mezcla  
hidrolizante empleando 1 ml. de extracto (0.05 g.) 5.0 ml.

Humedad ..... 5.0 %

"Poder diastásico" (P.D.):

$$P.D. = \frac{5.0 \times 144 \times 100}{95} = 758.0 \text{ E.M.}$$

ml. de extracto empleado en la dextrinización ..... 2.0

Tiempo de dextrinización ..... 20.0 min.

1/tiempo de dextrinización (1/20) ..... 0.05

Valor "K" correspondiente a 0.05 min. recíprocos  
(tabla III) ..... 75.0

Actividad sacarificante de la alfa-amilasa:

$$A = \frac{75 \times 100}{95 \times 2} = 40.0 \text{ E.M.}$$

Actividad de la beta-amilasa:

$$B = 758 - 40 = 718.0 \text{ E.M.}$$

Es decir: la malta tendría una actividad alfa de 40 equivalentes de maltosa; una beta de 718 y un "poder diastásico" de 758.

16.—Estimación de las alfa y beta-amilasas.—A.K. Balls, W. S. Hale, W. G. Rose, I. W. Tucker, B. Axelrod, S. Schwimmer, J.J. Peruzzi y M. K. Walden. (2).

Es una modificación del Dr. Schwimmer a los métodos conocidos. Se basa en que la beta-amilasa transforma el almidón de papa en una amilodextrina resistente a cualquier acción posterior del mismo enzimo pero sí atacable por el día. La amilodextrina da con el yodo un color rojo púrpura que desaparece al actuar la alfa-amilasa. Midiendo su velocidad de desaparición en un almidón totalmente atacado por un exceso de beta-amilasa y comparando al observado con saliva que es casi alfa-amilasa pura se obtiene la estimación de la alfa.

Expresa la "unidad de alfa-amilasa como la cantidad de enzimo (en saliva) que hizo que la solución de almidón produjera con yodo un color standard (lectura colorimétrica de 40 en un aparato de prismas neutros) en 10 minutos a 20° C."

La beta-amilasa la determina por reducción del ferricianuro de potasio y se expresa como "la cantidad de enzimo que reduce 100 mili-equivalentes de ferricianuro en 10 minutos a 20° C."

17.—Determinación del poder licuefaciente de la malta. S. Jozsa y H. C. Gore. (6).

Consiste en determinar "el peso de almidón licuado en 1 hora por 1 parte de malta, cuando 10 ml. de su extracto conteniendo 10 mg. actúan sobre 100 g. de una pasta de almidón (con 4.211 g. de almidón seco) a 21° C. durante 1 hora".

Se basa en la observación de que las pastas frías de almidón fluyen en capas no uniformes demostrando aún a bajas concentraciones la estructura de un líquido viscoso que no se rompe por agitación débil pero sí por una vigorosa, originando un líquido con una viscosidad inicial constante. Bajo tal principio se relaciona la viscosidad con el porcentaje de almidón licuado en cualquier momento de la actividad amilásica.

Se prepara una pasta de almidón (del grado B.K.M.F., Joseph Morningstar and Co. New York, N.Y.), totalmente licuada (que además se ha hervido para destruir enzimos); con ésta y la original, se obtienen una serie de mezclas a las que se determinan su tiempo de flujo para formar una curva en función de sus porcentajes de abatimiento y la cantidad de almidón licuado. Bajo condiciones uniformes puede saberse la cantidad que de éste se tiene por la actividad del enzimo, mediante una comparación.

La curva será esencialmente la misma aun cuando difiera para pipetas diversas; pero una vez determinada para una de ellas, resulta más fácil obtener la proporción de almidón licuado por actividad enzimática y sólo basta saber el tiempo de flujo después de que el enzimo actuó durante el tiempo especificado. La temperatura se controla con cuidado y los resultados se obtienen, directamente, en términos de enzimo y sustrato.

Las pastas se preparan por cada día de trabajo. Puede emplearse algún tipo de viscosímetro pero la pipeta resulta más simple. No sólo puede medirse la viscosidad al final de 1 hora sino

también dentro de cualquier período que se desee, para observar más completamente la actividad licuefaciente.

**18.—Determinación de la alfa-amilasa.—Método de licuefacción de S. Jozsa y W. R. Johnston. (7).**

Se basa en la acción licuefactora de la alfa-amilasa sobre el almidón gelatinizado; no es sino una revisión del método de Jozsa y Gore en donde se introduce un nuevo tipo de unidad enzimática, el "liquefón" y se normaliza la curva de licuefacción.

El "liquefón" se define como "la cantidad de enzimo que licúa el almidón con capacidad para convertir una pasta standard a 25 mg. de almidón seco, por minuto, en el tiempo 'coro' bajo las condiciones experimentales".

El valor en el tiempo "cero" es directamente proporcional a la concentración de enzimo; por lo cual, el número de "liquefons" por gramo de preparación, se considera como una medida exacta del contenido alfa-amilásico y de su poder licuefaciente.

La curva representa la relación fundamental entre la viscosidad y el grado de licuefacción de la pasta y se dijo en la técnica anterior que era característica de la pipeta empleada. Sin embargo, de comparaciones efectuadas con el viscosímetro de Ostwald (no se emplearon viscosímetros del tipo Stormer por la pronunciada acción desintegrante de la copa de rotación) para comprobar la curva obtenida con la pipeta empleada por los autores y otras pipetas, se encontró que los valores de éstas sólo se desviaban un 4 ó 5% de los de aquella. De allí que al darla como standard indicaren que podría aplicarse a cualquier pipeta que se aproximara en 5% a las condiciones de la prescrita. Las especificaciones de ésta son: vaciarse de aforo a aforo entre 165 y 190 segundos con una solución de glicerina a 21° C. (haciendo circular agua a temperatura constante, por la cubierta de la pipeta).

Para el empleo de esa curva es necesario ajustar el tiempo de agitación que de lugar a un flujo correcto (el de la pipeta calibrada) y usar cantidades apropiadas de las preparaciones enzimáticas, según el caso, a fin de obtener una licuefacción que os-

cile entre el 50 y 90% de abatimiento en la viscosidad; este margen se considera como seguro para determinaciones precisas.

Una de las modificaciones consiste en el empleo de NaCl como estabilizante de las preparaciones de enzimo pero como también disminuye la viscosidad de las pastas de almidón, se necesita emplearlo en la determinación testigo.

Se cree que los productos variables de la reacción, formados por sistemas amilásicas diferentes, no afecta la aplicación general de la curva porque las desviaciones no se exceden de 0.5 segundos.

Se considera una pasta satisfactoria, cuando mezclada con el 10% de su peso, en agua conteniendo 250 mg. de NaCl por cada 100 ml. y agitando por 1 minuto da, a 21° C., el mismo tiempo de flujo ( $\pm$  10 a 15 segundos) que la solución de glicerina.

**19.—Determinación de la alfa-amilasa.—Método de licuefacción.—Quick Landis (+) y Sutton Redfern. (14).**

Es un método calibrado para la alfa-amilasa de la malta de cebada en "unidades liquefón". La diferencia esencial con los dos anteriores consiste en el empleo de un agitador especial (Warin Blender) y un viscosímetro Ubbelohde modificado.

**Reactivos**

**Acido acético 3 N.:** diluir 172 ml. de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial a 1 litro, con agua destilada.

**Hidróxido de sodio 2.25 N.:** disolver 90 g. en agua destilada y diluir a 1 litro.

**Solución 0.025 M. de cloruro de calcio:** disolver 11.1 g. de  $\text{CaCl}_2$  anhidro en agua destilada y diluir a 4 litros.

**Solución de cloruro de sodio al 2.5%:** disolver 25 g. en agua destilada y diluir a 1 litro.

**Almidón:** de papa, refinado, marca Aroostocrat (Morningstar Nicol Inc., 650 West 51st. Street, New York, N. Y.), con humedad conocida (determinarla secando una muestra durante 2 horas a 130° C. en estufa con corriente de aire).

## Viscosímetro

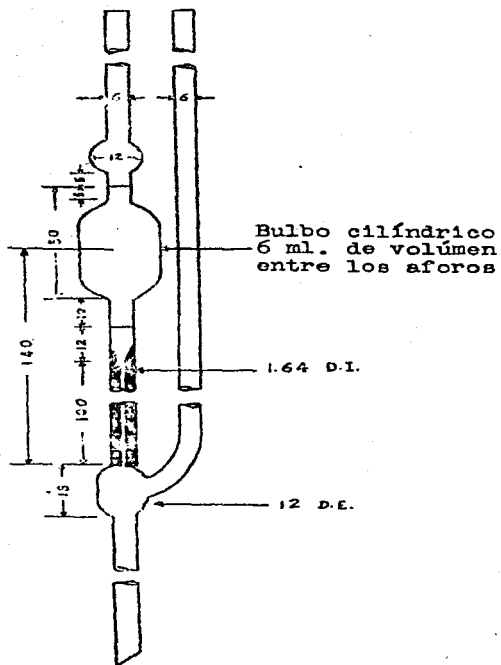


Fig. IX

de flujo, a 30° C., de una solución de sacarosa al 60% para calcular la constante del aparato de la ecuación:

$$N = K t d \quad (1)$$

N = viscosidad en "centipoises".

K = constante del viscosímetro.

t = tiempo de flujo.

d = densidad de la solución.

Modificación del Ubbelohde con dimensiones normalizadas según lo indica la figura. Se coloca dentro de una cámara por la que circula agua a 30° C. Se puede adquirir de Ace Glass Company, Vineland N. J. EE. UU. con especificación del catálogo V-1039 G. (Fig. IX).

Para emplearlo, introducir la punta en la mezcla de almidón y hacer que ésta suba colocando el dedo en el extremo superior del tubo lateral. Destapar los dos tubos simultáneamente para formar el "nivel suspendido" y medir el tiempo que tarda para pasar de aforo a aforo.

El viscosímetro se calibra para normalizar la viscosidad inicial de la pasta y calcular el tiempo de flujo para cuando está totalmente licuada. Se ajusta midiendo el tiempo

La viscosidad y densidad de esa solución se dan como 34.07 "centipoises" y 1,284, respectivamente, a 30° C. (Bates). Su concentración debe medirse refractométrica o densimétricamente porque un error de sólo 0.1% provoca cambios considerables en la viscosidad. La que corresponda a tal concentración puede obtenerse en las tablas de Bates (Polarimetry, Saccharimetry and the Sugars. Circular C-440, Washington U.S. Government Printing Office).

Las dimensiones del viscosímetro son tales que su constante es aproximadamente 0.4.

#### **Preparación de la pasta standard de almidón al 5%, tamponada:**

Pesar 42.5 g. de almidón (base seca). Llenar con agua a 50-55° C., el recipiente del mezclador (Waring Blendor) para llevarlo a esa temperatura. Calentar a ebullición 420 ml. de agua destilada y 360 ml. con 10 de ácido acético 3 N. a sólo 50-52° C. Al principiar a hervir los 420 ml., tirar el agua del recipiente; dejar en su lugar el almidón y la porción de 360 ml. a 52° C. Conectar sucesivamente el interruptor del mezclador para lograr una suspensión del almidón; conectarlo en firme y verter, lo más rápido que se pueda, los 420 ml. de agua hirviendo.

Tomar el tiempo de gelatinización de la mezcla (rápidamente se vuelve en extremo espesa y de apariencia translúcida) y limpiar las paredes del recipiente con un agitador. Después de agitar 3 min., agregar 10 ml. de NaOH 2.25 N., para neutralizar y taponar a pH 5.2. Agitar 30 segundos más después del periodo previamente determinado. Ajustar con agua el peso neto a 850 g. y agitar 30 segundos. Transvasar el substrato caliente a un Erlenmeyer de 1 litro y enfriar a chorro de agua aproximadamente a 30° C. Dividir (con un embudo de separación de 1 litro) en alícuotas de 30 g. que se hacen contener en Erlenmeyers de 50 ml. los que una vez taponados se colocan a baño de agua a 30° C. Puede usarse para pesar las alícuotas una balanza con sensibilidad de 0.01 g.

A cada aparato se le debe ajustar su tiempo de agitación para que la pasta resultante reúna las características de la standard (80-90 centipoises de viscosidad inicial bajo las condiciones prescritas). Se ha encontrado que tales tiempos varían entre 5 y 20

min., para los diferentes mezcladores del mismo tipo; pero en el caso de ser inferiores a 5 puede reducirse el voltaje, a fin de aumentarlo hasta ese valor que permite acoplar los pasos necesarios en la preparación del sustrato.

### Preparación de las soluciones de enzimo

Malta de cebada: extraer 3 a 5 g. de la malta finamente molida por 1 hora a 30° C., con 100 ml. de solución de NaCl al 2.5%, agitando de vez en cuando. Filtrar, regresando la primera porción y ajustar la dilución apropiada con la solución de CaCl<sub>2</sub>.

Jarabe de malta y otras preparaciones de origen microbiano: se diluye, directamente, con la solución de CaCl<sub>2</sub>.

En casos excepcionales, puede sustituirse la solución de CaCl<sub>2</sub> con una de NaCl al 0.25%.

La tabla No. IV da, en términos generales, las concentraciones que permiten una aplicación correcta del método.

### Técnica

Previamente, llevar a 30° C., el sustrato y el enzimo. Medir 3 ml. de éste y verter sobre 30 g. de aquél escurriendo por la pared del matraz de modo que no se mezclen y haya formación de capas distintas. Taponar el matraz y homogeneizar inmediatamente por agitación vigorosa durante 0.1 min. contado desde que se empezó a agitar. Llevar al baño de agua a 30° C. Después de 58-59 min. determinar el tiempo de flujo procurando que llegue al aforo superior muy cerca de los 59 con el objeto de tomar en cuenta la licuefacción que ocurra durante la medida. El tiempo nominal de reacción es 1 hora. Cuando se analizan una serie de muestras, el viscosímetro se lava, previamente, con la mezcla hidrolizante.

La viscosidad inicial, o en blanco, se determina agregando 3 ml. de la solución de CaCl<sub>2</sub> a 30 g. de sustrato y midiendo el tiempo de flujo después de tener aproximadamente 1 hora a 30° C. Se calcula usando la ecuación (1) con el valor apropiado de la constante y una densidad de 1.015.

Al pipetear la solución de enzimo se necesita no introducir saliva; para ello se coloca un algodón en la parte superior.

## Cálculos

En función del tiempo de flujo se calcula el porcentaje en el abatimiento de la viscosidad por la fórmula:

$$P = \frac{t_0 - t}{t_0 - t_r} \times 100 \quad (2)$$

P = porcentaje de abatimiento en la viscosidad.

$t_0$  = tiempo de flujo inicial.

t = tiempo de flujo de la mezcla después de 60 minutos.

$t_r$  = tiempo de flujo calculado para el almidón totalmente licuado.

El substrato totalmente licuado tiene una viscosidad de 0.865 "centipoises" y una densidad de 1.015. Con estos valores y la constante del viscosímetro K, puede calcularse  $t_r$  de la ecuación (1).

Cuando se conoce el porcentaje de abatimiento en la viscosidad el contenido enzimático por 100 ml. de la solución de enzimo se obtiene en la tabla V. Sabiendo la concentración de la solución, se calcula el número de "liquefons" por gramo de muestra.

Ejemplo: si  $t_0$  = 215.4 seg.; t = 102 y  $t_r$  = 2.2.

$$P = \frac{215.4 - 102.0}{215.4 - 2.2} \times 100 = 53.2$$

A este valor le corresponden (tabla V) 4.89 "liquefons" por 100 ml. de la solución de enzimo equivalentes a 10 mg. de malta (en este caso); por lo tanto, la muestra original tiene un contenido enzimático de 489 "liquefons" por gramo.

La tabla de calibración puede usarse para preparaciones obtenidas de malta de cebada y sin mucha precisión, para alfa-amilasa bacteriana. Para la de hongos el porcentaje de abatimiento se limita entre el 15 y 45%.



**TABLA No. I**

Conversión de ferricianuro a maltosa para la determinación de la actividad sacarogénica. (Cereal Chem. v.18; p-240; 1941.—Aumentada).

Ferricianuro 0.1 N. redu- cido. —(ml.)	Maltosa mg.	Ferricianuro 0.1 N. redu- cido. —(ml.)	Maltosa mg
		3.00	8.79
0.10	0.29	3.10	9.09
0.20	0.58	3.20	9.39
0.30	0.88	3.30	9.68
0.40	1.17	3.40	9.98
0.50	1.46	3.50	10.28
0.60	1.75	3.60	10.59
0.70	2.04	3.70	10.90
0.80	2.34	3.80	11.21
0.90	2.63	3.90	11.52
1.00	2.92	4.00	11.83
1.10	3.21	4.10	12.14
1.20	3.50	4.20	12.46
1.30	3.80	4.30	12.77
1.40	4.09	4.40	13.09
1.50	4.38	4.50	13.40
1.60	4.67	4.60	13.71
1.70	4.97	4.70	14.03
1.80	5.26	4.80	14.34
1.90	5.56	4.90	14.66
2.00	5.85	5.00	14.97
2.10	6.14	5.10	15.29
2.20	6.44	5.20	15.61
2.30	6.73	5.30	15.93
2.40	7.03	5.40	16.25
2.50	7.32	5.50	16.57
2.60	7.61	5.60	16.90
2.70	7.91	5.70	17.22
2.80	8.20	5.80	17.55
2.90	8.50	5.90	17.87

TABLA No. I (Continuación)

Ferricianuro 0.1 N. redu- cido. —(ml.)	Maltosa mg.	Ferricianuro 0.1 N. redu- cido. —(ml.)	Maltosa mg
6.00	18.20	8.00	24.88
6.10	18.53	8.10	25.24
6.20	18.86	8.20	25.61
6.30	19.19	8.30	25.97
6.40	19.52	8.40	26.34
6.50	19.85	8.50	26.70
6.60	20.18	8.60	27.09
6.70	20.51	8.70	27.48
6.80	20.84	8.80	27.87
6.90	21.17	8.90	28.26
7.00	21.50	9.00	28.65
7.10	21.83	9.10	29.05
7.20	22.16	9.20	29.45
7.30	22.49	9.30	29.85
7.40	22.82	9.40	30.25
7.50	23.15	9.50	30.65
7.60	23.50		
7.70	23.84		
7.80	24.19		
7.90	24.53		

**TABLA No. II**

Relación de la actividad sacarogénica a la dextrinogénica de la alfa-amilasa (Cereal Chem. 18 No. 2, p-241 - 1941).

Actividad alfa-dextrinogénica	Actividad alfa-sacarogénica	Actividad alfa-dextrinogénica	Actividad alfa-sacarogénica
l/min.	mg. maltosa	l/min.	mg. maltosa
0.010	3.17	0.160	46.93
0.020	6.34	0.170	49.39
0.030	9.49	0.180	51.80
0.040	12.66	0.190	54.20
0.050	15.83	0.200	56.58
0.060	18.93	0.210	58.89
0.070	22.01	0.220	61.17
0.080	25.02	0.230	63.37
0.090	27.93	0.240	65.48
0.100	30.74	0.250	67.50
0.110	33.52	0.260	69.42
0.120	36.31	0.270	71.33
0.130	39.05	0.280	73.25
0.140	41.74	0.290	75.17
0.150	44.38	0.300	77.02

**TABLA No. III**

Equivalentes de sacarificación "K" (equivalentes de maltosa) de cantidades diversas de alfa-amilasa, expresadas en minutos recíprocos (Cereal Chem. v. 12 No. 6-1944 p. 537).

Dextrinización l/min.	Sacarificación equiv. "K"	Dextrinización l/min.	Sacarificación equiv. "K"
0.020	21	0.065	103
0.025	30	0.070	111
0.030	39	0.075	121
0.035	48	0.080	130
0.040	57	0.085	139
0.045	66	0.090	148
0.050	75	0.095	157
0.055	84	0.100	165
0.060	93		

**TABLA No. IV**

Peso de muestra necesario para el análisis de diferentes preparaciones (Cereal Chem. 24 No. 3:157-1947).

Liquefons por gramo	Peso de muestra por 100 ml. de dilución final.
1 - 10	1,250 mg.
5 - 50	250 "
10 - 100	125 "
50 - 500	25 "
250 - 2,500	5 "
1,000 - 10,000	1.25 "

**TABLA No. V**

Determinación de la alfa-amilasa.—Método de licuefacción --- Landis y Redfern. (Cereal Chem. 24, No. 3:157-1947).

Porcentaje de abatimiento en la viscosidad	Liquefons por 100 ml. de solución enzimo	Porcentaje de abatimiento en la viscosidad	Liquefons por 100 ml. de solución enzimo
15	1.025	30	2.133
16	1.098	31	2.216
17	1.171	32	2.303
18	1.244	33	2.396
19	1.318	34	2.489
20	1.391	35	2.586
21	1.464	36	2.684
22	1.537	37	2.786
23	1.610	38	2.889
24	1.684	39	2.996
25	1.757	40	3.104
26	1.830	41	3.216
27	1.903	42	3.333
28	1.976	43	3.450
29	2.054	44	3.572

TABLA No. V (Continuación)

Porcentaje de abatimiento en la viscosidad	Liquefons por 100 ml. de solución enzimo	Porcentaje de abatimiento en la viscosidad	Liquefons por 100 ml. de solución enzimo
45	3.699	60	6.256
46	3.831	61	6.505
47	3.967	62	6.769
48	4.104	63	7.056
49	4.246	64	7.369
50	4.392	65	7.710
51	4.543	66	8.081
52	4.699	67	8.486
53	4.860	68	8.926
54	5.031	69	9.399
55	5.217	70	9.906
56	5.402	71	10.440
57	5.597	72	11.000
58	5.802	73	11.590
59	6.022	74	12.200
		75	12.830

c.—SELECCION DEL MAS ADECUADO

Entre las técnicas descritas figuran las más comunes; el conjunto, sólo es parte de las propuestas por diferentes investigadores según su criterio. Sin embargo, puede notarse la semejanza que existe entre muchas de ellas, y podrían dejarse bajo grupos especiales si se quisiera clasificarlas.

Corresponde a Lintner una escala que representa la primera idea establecida con más o menos precisión para interpretar la actividad de las maltas. El "valor Lintner" es una medida del llamado "poder diastásico"; es decir de las propiedades de sacarificación comunes a todos los enzinos con capacidad para formar azúcares reductores. No indicaría, en ningún caso, la que corresponde a cada uno y no representaría, tampoco, la actividad que se

les considera específica. Basadas en el método de Lintner y valorando con su escala se han descrito las técnicas de la American Society of Brewing Chemists, también adoptadas por la Association of Official Agricultural Chemists. La de F. C. Silbernagel que intenta establecer relación con la licuefacción del almidón. La de Sykes y Mitchel que se distingue por la determinación gravimétrica del cobre reducido y la de Gore, cuya diferencia estriba en la medida polarimétrica de la transformación provocada.

Exceptuando la última y la técnica del A.O.A.C., en que es optativo su empleo o el de ferricianuro de potasio, todas ocupan el cobre contenido en la solución de Fehling para medir la formación de reductores, producto de la hidrólisis, y establecer la relación que proceda según las variantes por cada cual adoptadas, para aplicar la idea del valor Lintner.

La "actividad sacarificante" representa un término equivalente al anterior; tal vez, más apropiado. Bajo tal denominación se propone el método de Gore-Steele y el de Nebraska que es una modificación del originalmente indicado por Kneen y Sandstedt. Ambos, determinan los reductores por su electo sobre el ferricianuro de potasio. Aquél, expresa valores Lintner y éste, adopta la unidad K-S (Kneen-Sandstedt) definida como "el número de gramos de almidón soluble convertidos a maltosa por 1 g. de malta en 1 hora a 30° C."

Con el método Wohlgemuth principian las transformaciones de técnicas con una tendencia a determinar la actividad de cada enzimo. Mide la dextrinización pero reúne, todavía, en un sólo dato, la que proviene de la acción combinada de las alfa y beta amilasas.

Entre las modificaciones del Wohlgemuth se tienen: la técnica de Kneen-Sandstedt-Blish (descrita con las ligeras variantes a su vez introducidas); determina la actividad alfa-amilásica en presencia de un exceso de beta-amilasa (para eliminar su influencia en la medida de la dextrinización), limitando la transformación para comparar con una dextrina tipo, permitiendo obtener un valor real de ese enzimo expresado en las unidades que establece. La de Kneen-Sandstedt-Hollenbeck que microdetermina la alfa-amilasa; se emplea en aquellos casos que resultan inferiores a la sensibilidad de la anterior, de la cual no constituye sino una ampliación ventajosa. La de Olson-Evans-Dickson; también mide la activi-

dad dextrinizante pero compara su grado de realización con un color inorgánico (obtenido según fórmula), lo que tal vez represente un inconveniente. La de Balls y colaboradores que al emplear saliva como fuente de alfa-amilasa, con la cual comparar la actividad dextrinizante de la malta, equipara una amilasa animal con una vegetal dando lugar a las desventajas inherentes.

Si a la alfa-amilasa se atribuye la principal función dextrinizante de la malta, resultaba lógico eliminar toda posible influencia de la beta al tratar de obtener valores reales de aquélla. De igual modo, si se atribuye a la beta-amilasa el efecto de la sacarificación mayor, también habrá que eliminar la contribución de la alfa, con el mismo objeto. Lo cual representa la base de las técnicas desarrolladas para medir la actividad beta-amilásica, al disminuir de la sacarificación total la que corresponde a la alfa, dejar exclusivamente la originada por la beta, y en función de ello interpretar sus unidades. A eso equivale la técnica de Kneen y Sandstedt (empleada por Nebraska), la de Olson-Evans-Dickson, la de Balls y el mismo micrométodo de Kneen aun cuando su forma de calcular difiera por diferir en otras condiciones y valores.

Otra de las funciones atribuidas a la alfa-amilasa es su capacidad licuefaciente, cuya determinación se sigue según las técnicas de Jozsa-Gore, Jozsa-Johnston y Landis-Redfern. Las dos primeras son clásicas para este objeto, pero resulta excesivamente complicado desarrollarlas porque requieren, además, cantidades muy grandes de sustrato y tiempos pronunciados para ejecutarlas. La última, es mucho más sencilla y económica en su manipulación y reduce en tal forma la cantidad de sustrato, que la pasta preparada en una vez es suficiente para cerca de 25 análisis. Además, emplea la misma unidad del Jozsa-Johnston, el "liquefón", estableciendo entre ambos una mejor relación.

Hay otras técnicas que sobresalen un poco de las anteriores y cuyas características pueden tomarse directamente. Entre ellas, figura la de Thorne para la producción de alcohol de granos, la de Caldwell-Hildebrand para la alfa-amilasa y la de Noelting-Bernfeld para la beta.

Este estudio pretende determinar, concretamente, las actividades alfa y beta-amilásicas de los granos propuestos. En consecuencia, ni el "poder diastásico" en grados Lintner, ni la "actividad sacarificante", por sí sola, en estas u otras unidades, lograrían

los resultados que se buscan. Todas las técnicas que incluyan tales valores, quedarían descartadas por la razón de no ser las específicas para el caso.

Los inconvenientes de algunas de las que sí darían una medida de las actividades alfa y beta, pueden apreciarse en la descripción anterior.

Los métodos de Kneen-Sandstedt-Blish para la alfa-amilasa; de Kneen-Sandstedt para la beta (con determinación previa de la actividad sacarificante) forman, tal vez, la mejor expresión de estas funciones amilolíticas y son, seguramente, los que más se han ocupado en este tipo de trabajos. Además, los micrométodos de ellos derivados permiten una probabilidad mayor de obtener cualquier margen de valores.

Tales métodos fueron los seleccionados y los aplicados en la totalidad de las determinaciones que figuran en el capítulo siguiente. Corresponden a las técnicas: No. 9 bajo el título de "Determinación de las amilasas de la malta por los métodos de Nebraska", No. 10 para las extracciones con papaina o "totales" y No. 11 para la microdeterminación de la alfa-amilasa en casos excepcionales. Sólo se exceptuó el empleo del micrométodo de Kneen para la beta, por la dificultad de obtener o adaptar parte del material (la levadura aclimatada y capaz de fermentar maltosa satisfactoriamente, el activador específico, el medidor de presión, etc.).

Como datos adicionales de importancia en cuanto a las ventajas de los métodos y sus probables desviaciones pueden citarse:

1.—Kneen, Beckord y Sandstedt (9) establecen la siguiente interequivalencia de unidades:

(Unidades sacarogénicas K-S) x 7.5 = °Lintner.

(Unidades alfa-dextrinogénicas) x 19 = Actividad licuefaciente en  
cas.—Kneen-Sandstedt-Blish) x 19 = liquefons por gramos a 30° C.

2.—Donald H. Nelson y Allan D. Dickson (15) encuentran:

a.—Sensiblemente el factor 7.5 para la conversión a grados Lintner.



b.—Que las extracciones acuosas de 1 g. en 100 varían, entre muestras duplicadas, de 2.8 a 12.4%; las de 5 g. en 100, de 0.0 a 1.9% con valores 10 a 20% más altos.

c.—Que las extracciones con iones calcio (concentración salina al 0.2%) dan valores 20% más altos que la acuosa de 5 en 100 y ninguna diferencia entre los duplicados a las diversas concentraciones (1 en 100 ó 5 en 100).

#### REFERENCIAS:

- 1.—ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS.—Official and Tentative Methods of Analysis: 166. 1945.
- 2.—BALLS, A. K., HALE W. S., ROSE W. G., TUCKER I. W., AXELROD B., SCHWIMMER S., PERUZZI J. J., WALDEN M. K.—Separation of diastase and protein from wheat through the action of sulphites. Albany, Cal., Agricultural Research Administration: 11. 1943.
- 3.—BLISH M. J., SANDSTEDT R. M., MECHAM D. K.—Action of wheat amylases on raw wheat starch. Cereal Chem. 14,5:605. 1937.
- 4.—BROWNE, CHARLES A. AND ZERBAN, F. W.—Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis. New York, J. Wiley and Sons: 1,150-1,163. 1941.
- 5.—GORE, H. C. AND STEELE, H. K.—Estimation of the saccharifying power of mal diastase. Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.) 7,5: 324. 1935.
- 6.—JOZSA, S. AND GORE, H. C.—Determination of Liquefying Power of malt diastase. Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.) 2,1: 26. 1930
- 7.—JOZSA, S. AND JOHNSTON, W. R.—Determination of alpha-amylase. Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.) 7,3: 143. 1935.
- 8.—KERR, RALPH WALDO EMERSON.—Chemistry and Industry of Starch. New York, Academic Press Inc.: Cap. XV. 1944.
- 9.—KNEEN ERIC, BECKORD O. C. AND SANDSTEDT, R. M.—The starch degrading properties of barley malts. Cereal Chem. 18,6: 753. 1941.
- 10.—KNEEN ERIC, SANDSTEDT R. M. AND HOLLENBECK, C. M.—The differential stability of the malt amylases. Separation of the alpha and beta components. Cereal Chem. 20,4: 401. 1943.
- 11.—KNEEN, ERIC.—Determination of malt amylases by the Nebraska Methods, recopiled, modified and comented by him. 1945.
- a.—KNEEN, ERIC AND BLISH, M. J.—A standardized Wohlgemuth procedure for alpha-amylase activity. Cereal Chem. 16: 712-723. 1939.
- b.—KNEEN, ERIC AND SANDSTEDT, R. M.—Beta-amylase activity and its determination in germinated and ungerminated cereals. Cereal Chem. 18,2: 237-252. 1941.

- 12.—KNEEN, ERIC.—Sorghum amylase. Cereal Chem. 22,2: 113. 1945.
- 13.—LANDIS, QUICK.—Methods for determination of alpha-amylases. I.—Classification of enzyme assay methods, standardization of samples, and calibration of modified procedures. Cereal Chem. 22,1: 1. 1945.
- 14.—LANDIS, QUICK AND REDFERN, SUTTON.—Methods for determination of alpha-amylase. III.—Improved starch liquefying method. Cereal Chem. 24, 3: 157. 1947.
- 15.—NELSON, D. H. AND DICKSON, A. D.—The application of the Kneen and Sandstedt Methods for alpha and beta amylase to malts from different barley varieties. American Society of Brewing Chemists. 1942.
- 16.—NOELTING, C. AND BERNFELD, P.—Estimation of the beta-amylase activity. Wallerstein Laboratories Communications, 11,35: 343. 1948.
- 17.—OLSON W. J., EVANS R. AND DICKSON, A. D.—A modification of the Kneen and Sandstedt methods for the determination of alpha and beta amylases in barley malt. Cereal Chem. 21,6: 533. 1944.
- 18.—REDFERN, S. AND LANDIS, Q.—Methods for determination of alpha-amylase. II—Liquefying and dextrinizing activities of alpha amylases from different sources. Cereal Chem. 23, 1: 1. 1946.
- 19.—SILBERNAGEL, F. C.—Determination of the relative diastatic powers of malt. Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.) 2,1: 31. 1930.
- 20.—TAUBER, HENRY.—Enzyme Chemistry. New York, J. Wiley and Sons. 1937.
- 21.—TAUBER, HENRY.—Enzyme Technology. New York, J. Wiley and Sons. 1943.
- 22.—THAYSEN AND GALLOWAY.—The Microbiology of Starch and Sugars. 1930.
- 23.—THORNE C. B., EMERSON R. L., OLSON W. J., PETERSON W. H.—Evaluation of malts for production of alcohol from wheat. Ind. Eng. Chem. (Ind. Ed.) 37,11: 1,142. 1945.

## CAPITULO IV

### a.—MALTEADO DEL TRIGO, MAIZ, ARROZ, CEBADA Y CENTENO EN PROCESO DE LABORATORIO Y A IGUALDAD DE CONDICIONES

Es una cosa aceptada que las propiedades amilolíticas de la cebada aumentan considerablemente con la germinación y se supone que lo mismo puede acontecer en los otros cereales.

Los investigadores concuerdan en que los enzimas proteolíticos que se desarrollan durante el proceso son los que provocan ese aumento, por formación o activación simultánea de los que dan lugar a esos efectos. Naturalmente, como en todos los casos, las condiciones que se impongan originan variantes que a veces satisfacen determinado objeto.

Si las alfa y beta-amilasas, sea que se formen o sólo se activen, son las que se aumentan, es lógico que la germinación del trigo, maíz, arroz, cebada y centeno se lleve en forma tal, que no produzca un efecto contrario por alteración fundamental de las propiedades de cada una.

El posible efecto de la variedad y lugar de desarrollo del grano (2) sobre el aumento o formación de amilasas, no se tomó en cuenta porque el número de muestras analizadas y la falta de sus datos necesarios, no permitirían fijar la conclusión correspondiente. Pero si se observaron los factores que más o menos podrían controlarse, de acuerdo con las consideraciones que siguen:

Kneen, Miller y Sandstedt (1) al germinar trigo a temperaturas diferentes y relacionar con las actividades alfa y beta, encontraron:

- a.—Que los cambios operados son similares a 20 - 15 - 10 y 5° C., pero que se necesitan, respectivamente, 4 - 6 - 10 y 24 días para obtener los mismos resultados.
- b.—Que el aumento en el peso verde (el de la muestra en germinación) se incrementa cuando la temperatura baja.
- c.—Que la disminución en el peso seco parece ser más alto a 20° C.

Eric Kneen opina que una temperatura de 16.5° C., que podría ser favorable para cereales de "clima frío", no resultaría óptima para germinar los del grupo de "clima cálido". Las temperaturas elevadas (30° C., o más) inhiben en aquéllos, especialmente, la formación de alta-amilasa y las bajas (14° C., o menos) provocan en los segundos el mismo efecto.

Por otra parte, las temperaturas elevadas favorecen el desecado de la muestra y la formación de hongos, aun cuando la velocidad de desarrollo del tallo sea más rápida y a ello pudiera relacionarse el aumento del enzimo.

Los tratamientos previos a la germinación, también deben tomarse en cuenta: el "remojado" de la semilla ha quedado establecido en la rutina de las fábricas de malta y se considera esencial para facilitar el principio de la germinación. El tiempo que deba durar puede ser variable y para este caso habrá que fijar algunos antecedentes: los periodos de 3 días empleados por Ohlsson y colaboradores parecen haber disminuido la beta-amilasa durante la germinación; Kneen, Miller y Sandstedt opinan (estudio sobre el trigo) que, para un remojado de 12 hs. el tratamiento se traduce en una absorción de agua, en ningún cambio en la beta-amilasa y en un ligero aumento de la alta, si acaso.

Si las diferentes muestras ocupadas se germinaran dentro de las condiciones más favorables para cada una, los resultados no serían comparables. Por esta razón, basándose en todo lo indicado y tomando en cuenta que la cebada, trigo y centeno se consideran como cereales de clima frío y el maíz y el arroz como de cálido, se fijaron condiciones de germinación que más o menos pudieran satisfacer a todas y se escogieron las que a continuación se señalan tratando de conservarlas durante el proceso, hasta donde lo permitió el material disponible. Tales fueron:

- 1.—Selección de la semilla sólo atendiendo a sus caracteres generales externos (granos grandes, llenos, etc.).
- 2.—Remojado durante 12 hs. con agua destilada, a temperatura ambiente y sin ningún tratamiento para prevenir desarrollos de hongos.
- 3.—Germinación a una temperatura media que trató de mantenerse entre los 16 y 18° C., y a un alto contenido de humedad (45%) controlado por determinaciones sobre la misma muestra en ensayos previos. Se germinó en embudos de 16 a 20 cm. de diámetro a los que se colocó una base perforada en el fondo del cono y debajo de la cual se dejaba agua; un tubo de hule en el vástago con una pinza de Mohr para dar salida al exceso de agua y una cubierta de cartón humedecido en la parte superior. Cada 12 hs. la muestra era cambiada de embudo con el objeto de aerear y al mismo tiempo humedecerla con agua atomizada por medio de una bomba de mano. Tales embudos, sólo se llenaban con grano hasta unas 2/3 partes para dejar lugar a la expansión por hinchamiento. Los embudos se colocaron dentro de una caja, aislada, en la cual se mantenía la temperatura por deshielo. En ningún caso se tuvo desarrollo de hongos.
- 4.—Secado en una corriente intensa de aire (con aspiradores) a 30° C. Generalmente bastaron de 24 a 36 hs. para que la muestra quedara con menos o el mismo contenido de humedad que antes de germinar. Se ocupó un secador experimental facilitado por la Cervecería Moctezuma, S. A.
- 5.—Cada 24 hs., a partir del momento en que se inició la germinación, fueron separadas las muestras de trigo, cebada y centeno para las determinaciones necesarias y cada 48, las del maíz. El arroz no llegó a germinar bajo tales condiciones y no se sujetó a otras, por la poca cantidad de muestra obtenida.

Después de separar raicillas y plúmulas y de moler finamente la muestra, se aplicaron los métodos de análisis indicados. Previamente, se ensayaron en una muestra de malta de cebada con valores de alfa y beta-amilasas determinados por los Laboratorios Wallerstein y la cual se obtuvo de los mismos, por cortesía de la Cervecería Moctezuma, S. A.

En la determinación de "valores totales" se ocupó Papaína. Lewis con actividad 1:350 obtenida de Drogas Begné, S. A.

**b.—DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ALFA Y BETA  
AMILASICA ANTES Y DESPUES DE GERMINAR**

Todos los resultados se expresan en las tablas Nos. VI a XIV, y en las gráficas correspondientes.

**REFERENCIAS:**

- 1.—KNEEN ERIC, MILLER B. S. AND SANDSTEDT R. M.—The influence of temperature on the development of amylase in germinating wheat. Cereal Chem. 19,1: 11. 1942.
- 2.—KNEEN ERIC, AND HADS H. L.—Effects of variety and enviroment on the amylases of germinated wheat and barley. Cereal Chem. 22,5: 407. 1945.

**TABLA VI (GRAFICA I)**

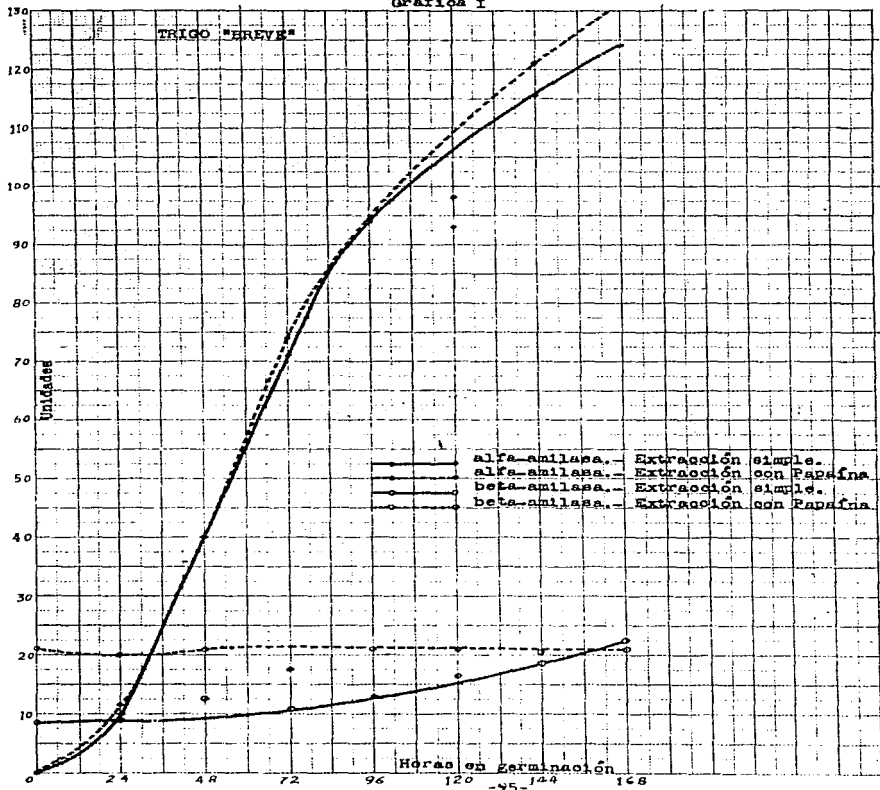
Trigo "Breve".—Aumento del contenido enzimático con la germinación.

Tiempo en germinación	Desarrollo plúmula	Desarrollo raicillas	Humedad	DETERMINACIONES SOBRE BASE SECA					
				Unidades Sacarificantes K.S		Alfa-amilasa Unidades		Beta-amilasa Unidades	
				Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína
0			11.72	8.72	21.07	0.00	0.00	8.72	21.07
24	2	3	8.81	9.47	20.40	10.12	11.44	8.96	19.83
48	5	10	10.71	14.39	22.96	39.83	39.83	12.40	20.97
72	9	15	10.28	14.27	21.19	71.33	73.80	10.70	17.50
96	15	24	10.13	17.59	26.04	93.70	93.70	12.91	21.36
120	25	28	9.50	21.35	25.91	93.05	98.22	16.70	21.00
144	30	33	9.74	24.52	26.54	115.61	120.86	18.74	20.50
168	36	37	9.80	28.70	27.57	124.00	131.30	-22.50	21.00

Eficiencia en germinación de la muestra 98%.

Cultivada en la región del Mayo, Son.—Obtenida en los Laboratorios de la Nacional Distribuidora y Reguladora.

Gráfico I





**TABLA VII. (GRAFICA II)**

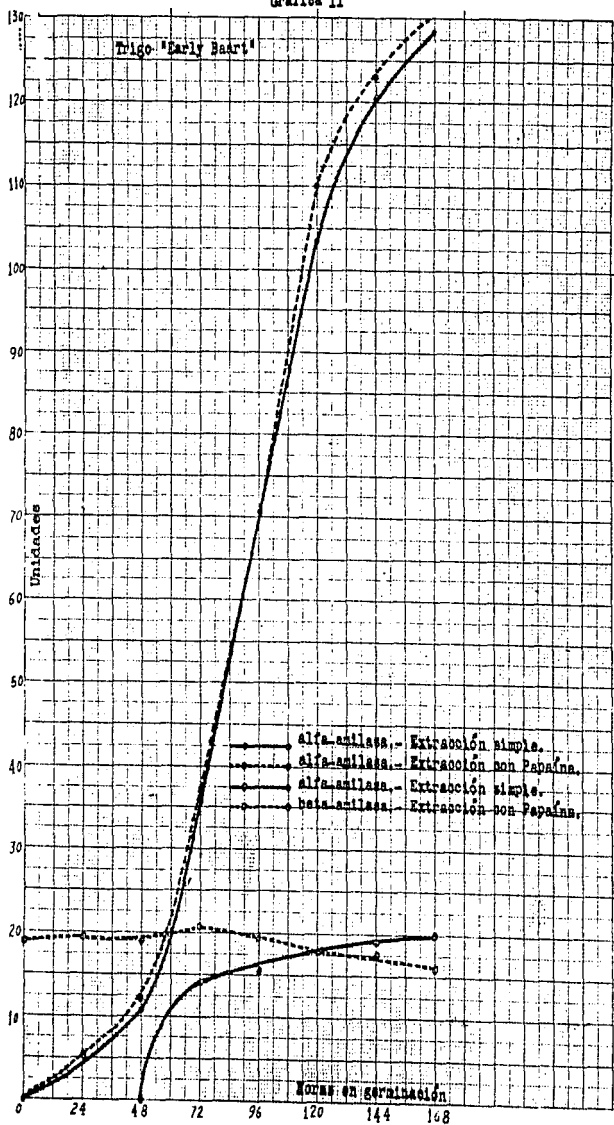
Trigo "Early Baart".—Aumento del contenido enzimático con la germinación.

Tiempo en germinación	Desarrollo plúmula	Desarrollo raicillas	Humedad	DETERMINACIONES SOBRE BASE SECA					
				Unidades Sacarificantes K.S		Alfa-amilasa Unidades		Beta-amilasa Unidades	
				Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína
0			10.27	0.25	18.66	0.00	0.00	0.25	18.66
24	1	3	11.19	0.26	19.70	5.40	6.00	0.00	19.40
48	3	6	11.21	0.26	19.71	10.81	12.01	0.00	19.11
72	7	9	10.63	16.02	22.50	35.81	37.04	14.23	20.65
96	10	15	9.41	19.13	23.02	70.65	70.65	15.60	19.49
120	18	20	9.10	23.25	23.77	103.54	110.01	18.07	18.27
144	28	24	10.00	25.03	23.65	120.50	123.00	19.00	17.50
168	37	35	9.60	26.43	22.40	128.50	130.50	20.00	16.00

Eficiencia en germinación de la muestra 97%.

Cultivada en la región del Mayo, Son.—Obtenida en los Laboratorios de la Nacional Distribuidora y Reguladora.

Gráfica II



**TABLA VIII (GRAFICA III)**

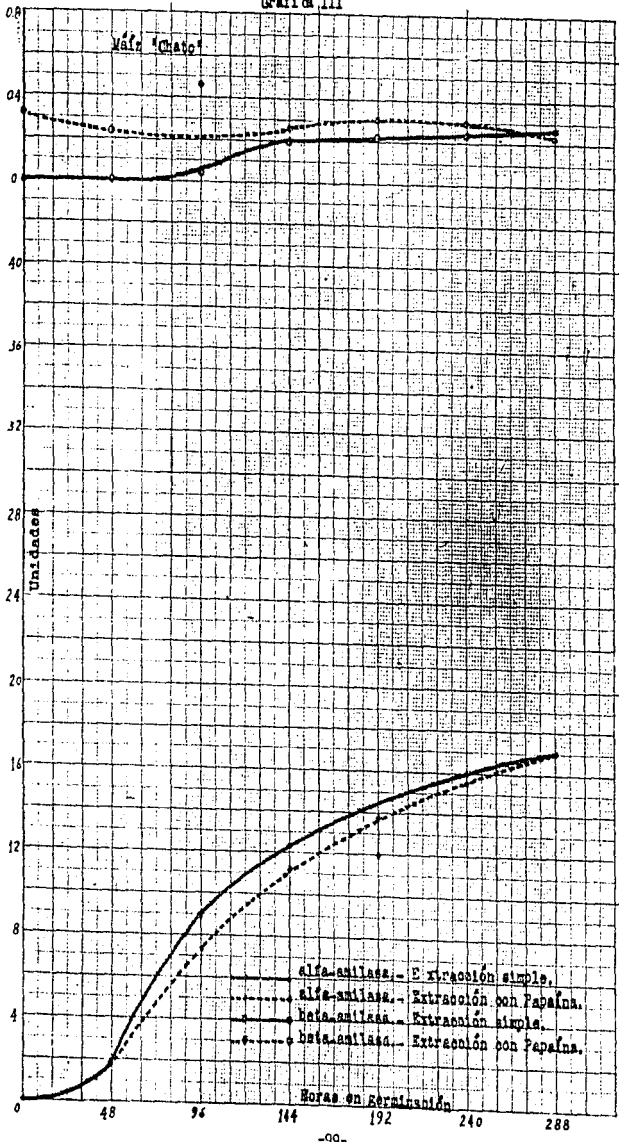
Maíz "Chato".—Aumento del contenido enzimático con la germinación

Tiempo en germinación	Desarrollo plúmula	Desarrollo raicillas	Humedad	DETERMINACIONES SOBRE BASE SECA					
				Unidades Sacarificantes K S		Alfa-amilasa Unidades		Beta-amilasa Unidades	
				Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína
Horas	mm.	mm.	%						
0			10.36	0.00	0.32	0.00	0.00	0.00	0.32
48		3	10.71	0.00	0.32	1.79	1.79	0.00	0.23
96	10	7	10.54	0.49	0.82	8.94	7.25	0.04	0.46
144	15	20	10.42	0.82	0.82	12.31	11.16	0.20	0.26
192	28	25	10.80	0.82	1.00	11.96	13.70	0.22	0.31
240	33	30	10.50	1.04	1.08	16.00	15.60	0.24	0.30
288	38	37	10.30	1.11	1.08	17.00	17.00	0.26	0.23

Eficiencia en germinación de la muestra 93%.

Cultivada en el Estado de México.—Obtenida en la Secretaría de Agricultura.

Gráfica III



**TABLA IX. (GRAFICA IV)**

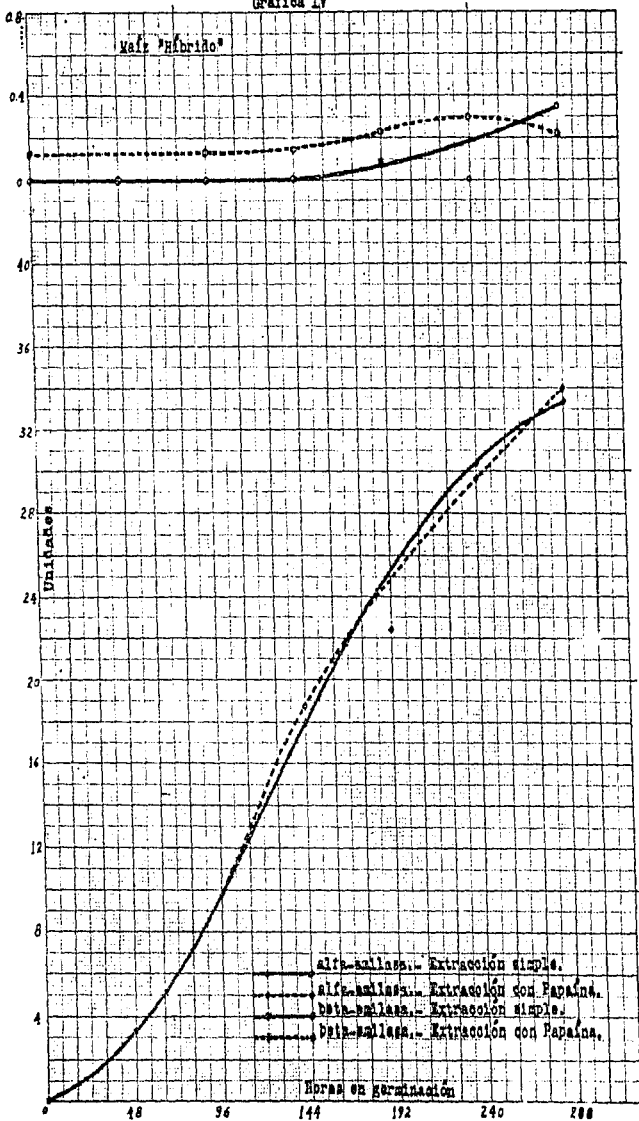
Maíz "Híbrido".—Aumento del contenido enzimático con la germinación.

Tiempo en germinación	Desarrollo plúmula	Desarrollo raicillas	Humedad	DETERMINACIONES SOBRE BASE SECA					
				Unidades Sacarificantes K-S		Alfa-amilasa Unidades		Beta-amilasa Unidades	
				Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína
Horas	mm.	mm.	%						
0			11.69	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.13
48		5	11.00	0.12	0.12	3.27	3.27	0.00	0.00
96	12	12	10.67	0.49	0.62	9.77	9.77	0.00	0.13
144	20	25	10.52	0.84	1.09	17.88	18.82	0.00	0.15
192	35	28	10.12	1.21	1.34	22.35	22.25	0.09	0.23
240	40	33	7.83	0.36	1.78	30.89	29.59	0.00	0.30
288	45	40	7.75	2.02	1.92	33.36	34.01	0.35	0.22

Eficiencia en germinación de la muestra 98%.

Tipo Celaya No. 2, cultivada en el Campo Experimental de Celaya, Gto.—Obtenida en el Banco Ejidal.

Gráfica IV



**TABLA X. (GRAFICA V)**

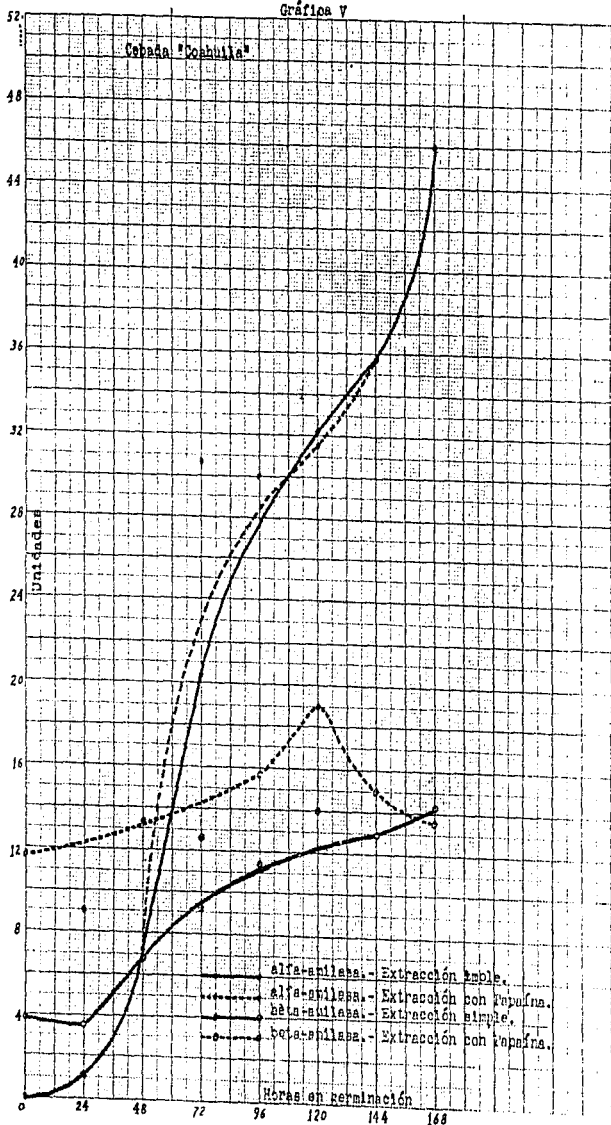
Cebada "Coahuila".—Aumento del contenido enzimático con la germinación.

Tiempo en germinación	Desarrollo plúmula	Desarrollo raicillas	Humedad	DETERMINACIONES SOBRE BASE SECA					
				Unidades Sacarificantes K-S		Alfa-amilasa Unidades		Beta-amilasa Unidades	
				Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína
0			9.10	3.88	11.71	0.00	0.00	3.88	11.71
24	2	1	8.90	4.13	10.64	1.10	1.10	3.58	9.09
48	4	3	8.80	7.11	13.72	7.26	7.02	6.75	13.37
72	9	7	7.96	10.20	14.14	20.45	30.68	9.18	12.61
96	20	14	6.68	12.90	17.16	29.90	30.26	11.40	15.65
120	30	27	6.38	15.61	20.58	32.04	31.65	14.01	19.00
144	35	30	6.58	14.70	16.57	35.68	35.68	12.92	14.99
168	45	40	5.93	16.60	15.88	45.97	44.76	14.30	13.64

Eficiencia en germinación de la muestra 95%.

Obtenida en la Cervecería Moctezuma, S. A.

Gráfica V





**TABLA XI. (GRAFICA VI)**

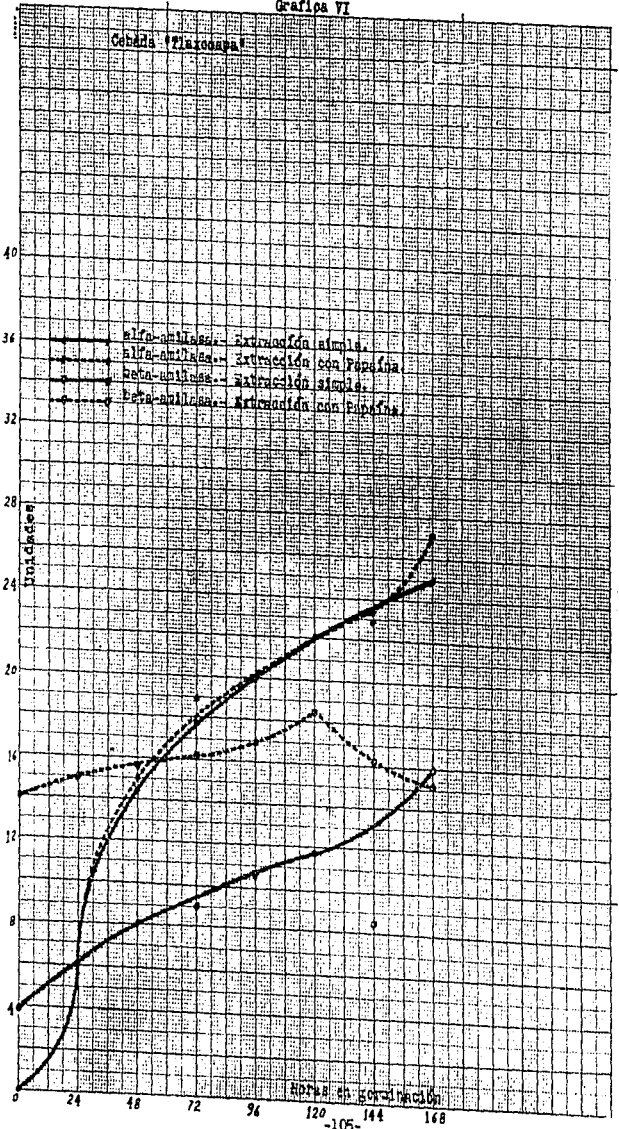
Cebada "Tlaxcoapa".—Aumento del contenido en zimótico con la germinación.

Tiempo en germinación	Desarrollo plúmula	Desarrollo raicillas	Humedad	DETERMINACIONES SOBRE BASE SECA					
				Unidades Sacarificantes K-S		Alfa-amilasa Unidades		Beta-amilasa Unidades	
				Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína
0			8.31	3.85	13.99	0.00	0.00	3.85	13.99
24	2	2	7.50	6.30	15.30	6.00	6.00	6.00	15.00
48	7	5	7.65	8.72	16.35	14.40	15.00	8.00	15.60
72	15	13	6.81	9.85	17.15	17.76	19.00	8.96	16.20
96	23	17	6.57	11.60	18.00	20.00	20.00	10.60	17.00
120	25	20	6.57	12.77	19.60	21.95	21.95	11.67	18.50
144	35	25	6.72	9.49	17.41	22.87	23.40	8.35'	16.24
168	50	40	6.80	17.25	16.56	25.00	27.10	16.00	15.20

Eficiencia en germinación de la muestra 94%.

Obtenida en la Cervecería Moctezuma, S. A.

Gráfica VI



**TABLA XII. (GRAFICA VII)**

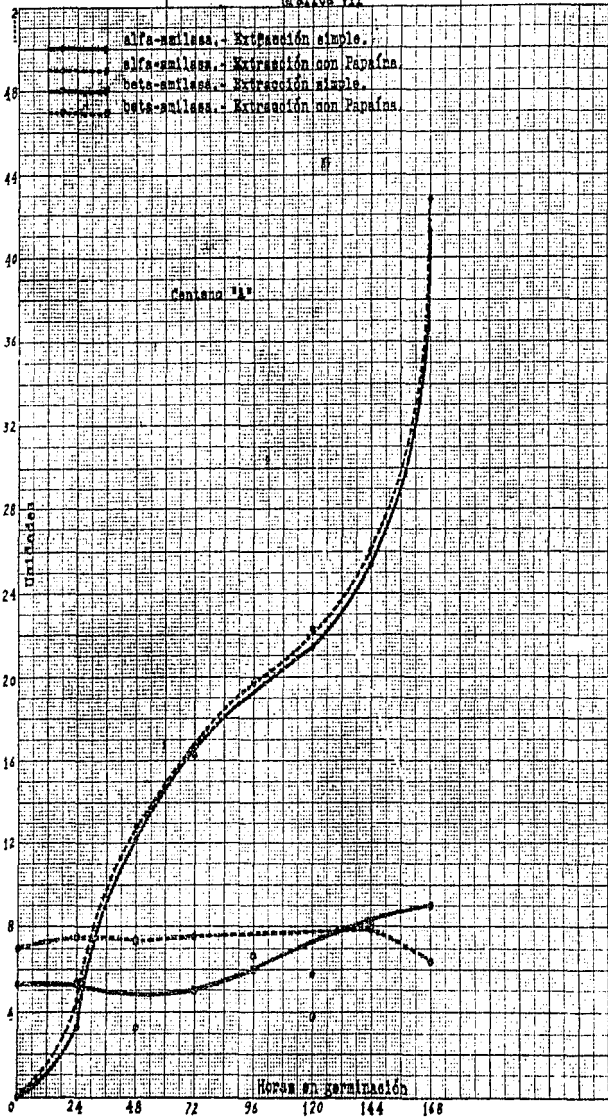
Centeno "A".—Aumento del contenido enzimático con la germinación.

Tiempo en germinación	Desarrollo plúmula	Desarrollo raicillas	Humedad	DETERMINACIONES SOBRE BASE SECA					
				Unidades Sacarificantes K-S		Alfa-amilasa Unidades		Beta-amilasa Unidades	
				Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína
Horas	mm.	mm.	%						
0			13.27	5.18	7.08	0.00	0.00	5.18	7.08
24	1	2	10.98	5.55	7.72	3.27	4.49	5.39	7.50
48	5	3	10.88	3.92	8.07	12.24	12.83	3.31	7.43
72	10	7	10.28	5.81	8.49	16.22	16.72	5.00	7.65
96	21	14	10.25	7.08	7.73	19.81	19.81	6.09	6.74
120	24	19	10.44	4.86	6.93	21.44	22.31	3.79	5.82
144	30	26	9.98	9.48	9.28	25.39	26.01	8.21	7.98
168	35	33	10.31	11.06	8.50	41.16	42.81	9.00	6.36

Eficiencia en germinación de la muestra 90%.

Obtenida en la Secretaría de Agricultura.—No identificada.

Gráfica VII



**TABLA XIII. (GRAFICA VIII)**

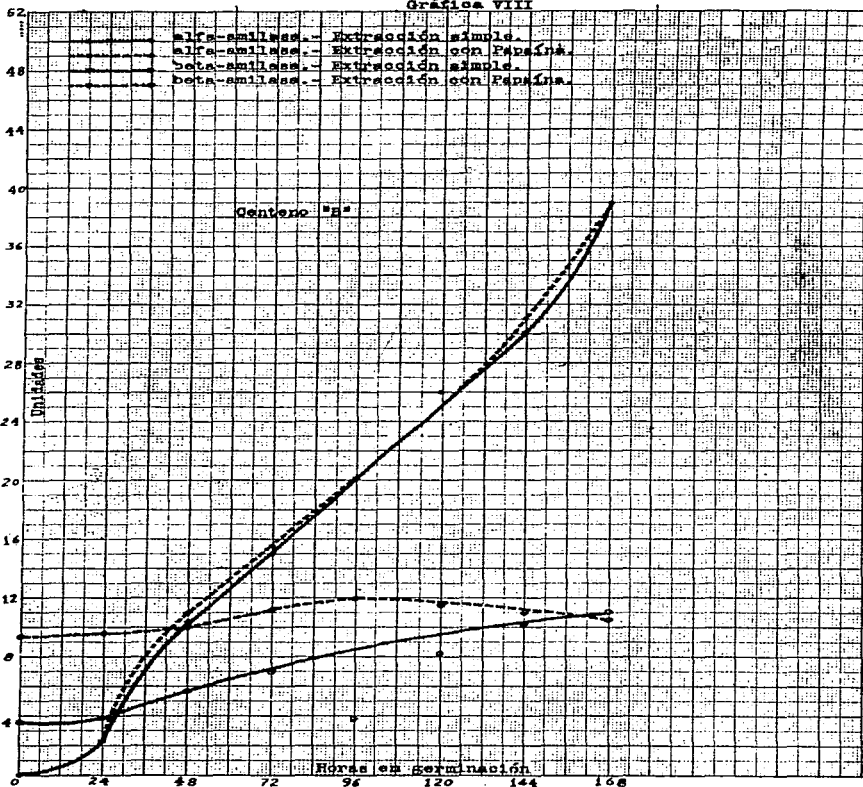
Centeno "B".—Aumento del contenido enzimático con la germinación.

Tiempo en germinación	Desarrollo plúmula	Desarrollo raicillas	Humedad	DETERMINACIONES SOBRE BASE SECA					
				Unidades Sacarificantes K-S		Alfa-amilasa Unidades		Beta-amilasa Unidades	
				Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína	Extr. simple	Extr. c. papaína
0			12.67	3.55	9.25	0.00	0.00	3.55	9.25
24	1	1	9.35	4.02	9.67	2.30	2.30	3.90	9.55
48	4	2	9.80	6.17	10.70	10.43	11.00	5.65	10.15
72	12	8	10.05	7.75	11.98	15.00	15.50	7.00	11.20
96	24	18	10.20	4.81	13.01	20.10	20.10	3.80	12.00
120	32	27	9.50	9.45	12.75	26.00	25.00	8.15	11.50
144	37	30	9.80	11.70	12.55	30.05	31.00	10.20	11.00
168	45	38	9.75	12.95	12.45	38.90	39.00	11.00	10.50

Eficiencia en germinación de la muestra 95%.

Obtenida en la Secretaría de Agricultura.—No identificada.

Gráfica VIII



**TABLA XIV**

Comparación de valores enzimáticos en las diferentes muestras germinadas.

Muestra	Horas en germinación	Extracción simple. Base seca	
		Alfa-amilasa Unidades	Beta-amilasa Unidades
Trigo "Breve"	168	124.00	22.50
Trigo "Early Baart"	168	128.50	20.00
Maíz "Chato"	288	17.00	0.26
Maíz "Híbrido"	288	33.36	0.35
Cebada "Coahuila"	168	45.97	14.30
Cebada "Tlaxcoapa"	168	25.00	16.00
Centeno "A"	168	41.16	9.00
Centeno "B"	168	38.90	11.00

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

Los granos de trigo, maíz, cebada y centeno, carecen de alfa amilasa o la contienen en cantidades tan pequeñas, que su determinación se dificulta. Exceptuando al maíz, la beta-amilasa se encuentra en todos, en cantidades variables.

La alfa-amilasa aumenta con lentitud durante las primeras 24 ó 48 horas de germinación, se eleva con rapidez en las subsiguientes y parece disminuir su velocidad al final del período. Tal efecto es más pronunciado en el trigo. No llegó a obtenerse algún valor que se estabilizara o disminuyera con el aumento de tiempo.

El aumento en la beta-amilasa casi es inapreciable durante los dos primeros días; se logra posteriormente, y de manera continua, pero a velocidad menor que la observada en el caso de la alfa.

La alfa-amilasa "total" o extraída con papaína da valores, durante todo el proceso germinativo, muy parecidos a los que se obtienen para las extracciones "simples" y sus curvas son iguales o estrechamente paralelas. Lo cual indica que la alfa-amilasa se forma y aumenta con la germinación.

La beta-amilasa "total" da valores constantes pero más altos que los de extracción "simple" y ambos coinciden al final del período aún habiendo un ligero aumento intermedio, más notable en la cebada y centeno, al cual sigue una disminución equivalente. Ello indica que la beta-amilasa no se forma con la germinación, sino que sólo se "desarrolla o activa".



En este caso, el trigo sobrepasa a los demás granos en la formación de alfa-amilasa; la cebada y el centeno se le aproximan en 30 a 35% y el maíz en 13 a 26%. La beta-amilasa se desarrolla a un valor máximo en el trigo; en la cebada se alcanza un 60 a 70% de éste, 40 a 50% en el centeno y 1.0 a 1.5% en el maíz, que en ambos casos necesita de doble cantidad de tiempo. Debe indicarse que para establecer un orden preciso de correlación, habría que tomar en cuenta un mayor número de casos.

La actividad sacarificante "simple" y "total" aumenta con la germinación; inicialmente, cuando la alfa-amilasa es baja, conserva valores aproximados a los de la beta pero los excede a medida que los de aquel enzimo se elevan.

La formación de la alfa-amilasa y el desarrollo de la beta pueden regularse, controlando el tiempo, seleccionando la semilla y modificando las condiciones de germinación.

La beta-amilasa "total" en el grano original permite dar idea de su probable desarrollo al germinarlo.

La similitud de caracteres en la formación de la alfa-amilasa y desarrollo de la beta, es general para el trigo, maíz, cebada y centeno; pero puede suponerse una relación individual más estrecha, por los resultados obtenidos para las dos variedades de un mismo grano.

El trigo, la cebada y el centeno, serían fuentes de beta-amilasa libre de alfa. Sus malts tendrían un valor amilolítico similar, sólo limitado por las propiedades específicamente indicadas para las alfa y beta amilasas de cada grano y por las razones económicas que determinan su empleo.

El maíz no germinado carece de valor amilolítico. Su malta constituye una fuente de alfa-amilasa, con sólo huellas de beta, aprovechable en todos aquéllos casos que necesitaran de las transformaciones propias de este enzimo. La muestra ensayada de maíz híbrido dió resultados más altos.

El valor comparativo que pudiera tener el arroz quedó excluido, en este caso, por la dificultad de germinarlo a igualdad de condiciones.

Para el interés industrial de medir las actividades que corresponden a las alfa y beta amilasas, excluyendo cualquier influencia mútua, los métodos aquí ocupados reemplazan con ventaja a muchos otros que sólo determinan la acción conjunta de esos enzimos.

## CORRECCIONES Y ERRATAS

Página	Renglón	Dice	Debe decir
17	22	epidermia	epidermis
18	4	Indeterminados	Indeterminados "0.21 0.38 0.16 0.20 0.25 (respecti- vamente para cada co- lumna).
18	5	endosperno	endospermo
18	39	maís	maíz
21	33	endosperno	endospermo
27	18	éter	éster
27	27	amilasa	amiloza
32	15	Secree	Se cree
39	15	tiene	tienen
41	25	reformación	formación
45	14	separando	separado
57	31	Técinca:	Técnica:
62	9	en contrado	encontrado
64	7	11-a y 11-b	9-a y 9-b
69	24	día	alía
72	19	Warin	Waring
74	2	1,284	1.284
74	16	actéico	acético
80	3	paaraciones	paraciones
83	29	Josza	Jozsa
94	9	acitividad	actividad
94	27	económcas	económicas
Cuadro I	36	Aspergilluis	Aspergillus
Cuadro I	43	substilis	subtilis
Tabla IX penúltimo		le	el
Tabla XIV		rigo	Trigo