

## Tesis de Posgrado

# Preparación de enzimas del *Aspergillus Orizae* y estudio de su utilización industrial

Guagnini, Omar A.

1944

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química  
de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Guagnini, Omar A.. (1944). Preparación de enzimas del *Aspergillus Orizae* y estudio de su utilización industrial. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0442\\_Guagnini.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0442_Guagnini.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Guagnini, Omar A.. "Preparación de enzimas del *Aspergillus Orizae* y estudio de su utilización industrial". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1944. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0442\\_Guagnini.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0442_Guagnini.pdf)

Buenos Aires, Diciembre 27/92  
Presentada en la plaza. Expte.

C. Affinch



Buenos Aires, Diciembre 27/92

Case a la Comisión examinadora Grupo  
del la presente tesis de los ex alumnos Oquard,  
Guagnini y David Jacobus, a los efectos del  
Art. 259 del Digesto.

Cabreria  
Ausemberg

Tesis: 433

Buenos Aires, Diciembre 29/92  
Los miembros de la Comisión examinadora supra.  
dada, que firmamos, han acordado la presente  
tesis y sus autores aceptarla.

A/m

Mendoza

Morera

Sarmiento

Universidad Nacional de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

PREPARACION DE ENZIMAS DEL ASPERGILLUS ORIZAE  
Y ESTUDIO DE SU UTILIZACION INDUSTRIAL

Omar A. Guagnini

David Jacovkis

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Química

Director de Tesis  
Ingeniero Santos Soriano

Buenos Aires

1944

Al Ingeniero Santos Soriano, a quien  
dirigido es este trabajo, al Dr.  
Alfredo Cordelli, al Dr. Ventura More-  
ra cuya colaboración fué de suma impor-  
tancia y a todos los que facilitaron  
nuestra tarea, agradecemos la  
prestada tan gentilmente.

P A R T E      G E N E R A L

---

## I N T R O D U C C I O N

La elección de este tema de tesis fué para nosotros el resultado de largas consideraciones.

La industria tiene para los que inician su actividad profesional, el atractivo de materializar en gran escala el esfuerzo realizado en bibliotecas y laboratorios.

Nuestro país, joven y con imperiosas necesidades industriales, es campo propicio para el esfuerzo práctico de sus hijos, y reclama la atención de sus técnicos hacia problemas vitales para su economía que- si bien han sido ya resueltos hace tiempo en países industrialmente más evolucionados- esperan aún solución entre nosotros.

Orientados hacia la química industrial en ese momento, consideramos ante todo las posibilidades reales de la nación en cuanto a las grandes ramas de la industria química.

En primer lugar, nuestra fuente primordial de riqueza deriva de la producción a grícola-ganadera, y por lo tanto toda industria química que utilice tales productos tiene asegurada una base de éxito.

En segundo lugar, la superproducción agrícola origina constantemente crisis económicas que solo se pueden resolver diversificando la utilización en el país de tales productos y creando así nuevas industrias, independientes de contingencias exteriores.

En tercer lugar, el hecho de no exigir instalaciones complicadas ni costosas permite colocar a las industrias de fermentación entre las de más inmediata organización dentro de este campo.

La elección de un tema de fermentación ofrecía además la posibilidad de actuar en un campo algo distinto al de la química propiamente dicha, al par que de las ramas industriales es la que más perspectivas tiene de desarrollo teórico y práctico.- Teóricamente, porque el estudio de las enzimas se ha hecho imprescindible en todos los procesos en que intervienen seres vivos,

y prácticamente porque la forma en que se las aprovecha actualmente es muy primitiva. El día que se puedan obtener puras en forma económica sufrirán un cambio total los procesos industriales en que se usan, reduciéndose a simples operaciones unitarias.

Desde comienzos de 1942, cuando iniciamos las consultas bibliográficas, hasta fines de 1944, en que concluimos nuestra modesta labor, se han producido algunos hechos que consignamos con satisfacción porque confirman la exactitud de nuestro planteamiento.

En dicho lapso se han puesto de actualidad los temas de fermentación en el país, culminando con la creación de dos institutos nacionales, uno de ellos orientado exclusivamente hacia la microbiología industrial y el otro incluyendo secciones de Industrias de Fermentación.

La importancia del tema se ha puesto de manifiesto en diversas publicaciones, especialmente en el análisis sobre "La Industria Química Argentina" (ficha 112) preparado por la Armour Research Foundation. En el programa de investigaciones que incluye este informe ocupan un lugar de preferencia las que se refieren a fermentaciones destinadas al aprovechamiento de productos y subproductos agrícolas.

También los últimos trabajos sobre enzimas industriales publicados en EE.UU. muestran claramente la tendencia cada más acentuada de transformar los productos agrícolas mediante procesos fermentativos.

Como justificativo final, debemos confesar que un tema de realización concreta, cuyo éxito o fracaso se puede medir por el producto obtenido, nos pareció preferible en esta primera prueba de nuestras fuerzas, a un tema más teórico y por lo tanto más adecuado para experimentadores avezados.

Por otra parte, si bien un tema puramente teórico produce satisfacciones más amplias a los que lo encaran, sus resultados son de aplicación menos inmediata entre nosotros, mientras que un tema práctico es una contribución más directa al desarrollo de nuestra incipiente industria química.

Del éxito de tales estudios depende la posibilidad de crear en un futuro cer-

////

cano las bases reales para investigaciones teóricas de más vastos alcances. Tal es nuestra sincera opinión sobre este problema. Se podrá no estar de acuerdo con ella, pero tiene para nosotros la importancia de habernos servido de guía en la realización de este trabajo.



## ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

Si bien algunos procesos fermentativos se utilizan desde la antigüedad, el descubrimiento de los microorganismos que los producían se inicia a raíz de la invención del microscopio, ocurrido por el año 1600.

Fué el célebre botánico von Linné el primero que sostuvo- aunque sin pruebas- que los procesos de fermentación eran el resultado de la actividad de microorganismos.

Mucho tiempo después, en la primera mitad del siglo XIX, se llegó a establecer que la elaboración del vino y de la cerveza tenían por causa la actividad de seres vivos.

Poco más tarde, Luis Pasteur sentó las bases de la microbiología con sus trascendentales estudios, que destruyeron definitivamente la teoría de la generación espontánea.

Traube, en 1858, expresó la opinión de que la fermentación se produce por la acción de una sustancia presente en las células de las levaduras. Surgió así el concepto de enzima, que fué definitivamente aceptado después de las investigaciones de Miquel, Fischer y Buchner y de otros hombres de ciencia. Recién a fines del siglo pasado se comenzó a reconocer la importancia de los hongos en diversos procesos fermentativos.

Fitz, en 1873, fué el primero en demostrar que se podía producir alcohol por un hongo, el *Mucor Mucedo*.

La utilización industrial de estos microorganismos se inició con el proceso Amiló para la producción de alcohol, en el que intervinieron primero el *Mucor Roxii* y luego varias especies de *Rhizopus*.

En los últimos años del siglo pasado se comenzó a extender notablemente el conocimiento y el empleo de los hongos. En 1891 Wehmer demostró la producción de ácido oxálico por el *Aspergillus Niger*, y dos años más tarde la de ácido cítrico por *citromyces*. En 1902 Calmette preparó ácido gálico a partir del tanino por medio del llamado *Aspergillus Gallomyces*. Durante la primera gue-

rra mundial se emplearon en Alemania microorganismos para la producción de glicerina y de grasas. En 1927 May intentó desarrollar en EE.UU. la producción de ácido glucónico por el mismo proceso y posteriormente se prepararon proteínas y vitaminas por fermentación.

Paralelamente se desarrollaron las tentativas de separación de las enzimas segregadas por los microorganismos y su utilización directa, independiente de los seres que las producen.

Si bien la malta, primer preparado enzimático, se viene utilizando desde hace siglos, solo a comienzos del actual se iniciaron los trabajos para la producción industrial de enzimas.

Takamine, en 1894, preparó por primera vez concentrados enzimático de hongos ( *A. Orizae*) en escala industrial (U.S. Patent. 525.819,25), e introdujo dos productos comerciales, la Takadiastasa y la Polizima, para la dextrinificación del almidón y el desaprestado de las fibras textiles.

Boidin y Effront fueron los primeros en producir las a partir de bacterias (*B. Subtilis* y *B. Mesentericus*, U.S. Patent. 1. 227.374 y 1.227.525) en Mayo de 1917.

Numerosos preparados se elaboraron posteriormente con fines comerciales o terapéuticos, y aún puramente científicos. Pero en general, ninguno de ellos puede considerarse formado por enzimas puras.

La preparación de enzimas cristalinas se logró recién hace pocos años, y solo en escala de laboratorio. La ureasa fué la primera, lograda por Summer en 1926, quien la catalogó como globulina. Northrop y Sherman aislaron en 1931 la amilasa pancreática y la señalaron como proteína, aunque Waldschmidt - Leitz y Reichel (Z. Physiol.Chem. 204, 197, 1932) afirmaron que se puede separar de la parte proteica; sin embargo no parece convincente el procedimiento que usaron para probarlo (ver Tauber, Enzyme Chemistry, pág. 18). Sherman y sus colaboradores comprobaron por un método indirecto que las amilasas de la malta eran proteínas mostrando que la pérdida de actividad era proporcionarles a una progresiva desnaturalización.

/////

La preparación de enzimas microbianas y su utilización industrial es pues un problema de este siglo. Los productos comerciales que se venden como preparados enzimáticos están lejos de ser enzimas puras.

Se trata unas veces de preparados obtenidos a partir de maceraciones de cultivos de hongos o de medios de cultivo líquidos donde han sido segregadas las enzimas, y más o menos purificados posteriormente. Otras veces son simplemente medios de cultivo sólidos de gran superficie (del tipo del afrecho o de cáscaras de productos agrícolas) bien emmohecidos y convenientemente tratados para conservar el poder enzimático e impedir las contaminaciones de los productos en los que deben aplicarse.

Las enzimas microbianas son de diversos orígenes. Las hay bacterianas, empleadas sobre todo en Europa, y de hongos, cuya aplicación ha alcanzado gran desarrollo en EE.UU.

El aislamiento de enzimas para su estudio científico puede prescindir de algunas consideraciones económicas sobre costos de cultivo y aún sobre el tiempo que demande su fabricación. Sin embargo, el análisis de la bibliografía nos ha mostrado que la mayor parte de las publicaciones sobre estos temas, anteriores al año 1925, se dedican a estudiar las propiedades de extractos enzimáticos muy heterogéneos e impuros, donde la reproducibilidad de las experiencias es prácticamente imposible para otro investigador que quisiera controlar los trabajos.

Planteado en su aspecto industrial, los factores de tiempo y costo de los cultivos adquieren fundamental importancia, mientras que la pureza de los extractos enzimáticos está solo condicionada por factores económicos, tendiéndose a la obtención de preparados de mínimo costo y de máxima actividad. Esta convicción orientó el plan de nuestro trabajo en la siguiente forma:

1º- Es necesario resolver todos los problemas concretos de producción del material rico en enzimas en gran escala y en la forma más económica posible, para asegurar su provisión abundante en el momento necesario.

2º- Interesa hallar una derivación industrial al material elaborado,

//////

como una contribución al desarrollo económico nacional.

3º- Hay que estudiar críticamente los métodos de control de la actividad de los preparados enzimáticos con los que se trabajará.

4º- Se estará recién entonces en condiciones de encarar algún problema científico respecto de las enzimas microbianas.

Analicemos cada uno de estos puntos:

1º- La obtención de grandes cantidades de cultivo en forma industrial ha encontrado dos soluciones con los métodos de cultivo estático y dinámico.

En el primero se emplean bandejas de gran superficie y poca altura, donde se siembran los hongos en el medio de cultivo, manteniéndose luego en estufas incubadoras provistas de dispositivos para el control del crecimiento.

El segundo busca reducir el volumen de las instalaciones utilizando un tambor con gran cantidad de medio de cultivo, satisfaciendo la demanda de oxígeno del hongo mediante un sistema forzado de aireación, regulando la humedad y asegurando la homogeneidad del cultivo por la rotación del tambor. Ambos sistemas tienen sus ventajas e inconvenientes desde el punto de vista industrial. Se trata en resumen de un problema de costos. Desde el punto de vista teórico, las conclusiones obtenidas con un sistema son aplicables al otro.

Debieron estudiarse en este punto los diversos factores que influyen en la velocidad de crecimiento por un lado y en la actividad enzimática por el otro, buscando las óptimas condiciones de producción y actividad.

Son ellos temperatura, humedad, pH, aereación, tiempo, composición del sustrato, acción de antisépticos y de metales tóxicos, etc.

El tratamiento de los cultivos obtenidos por cualquiera de los métodos anteriores para la extracción de las enzimas que contienen, exige el uso de aparatos industriales de destilación para la recuperación de disolventes, desecamiento de precipitados a baja temperatura, centrifugación de grandes volúmenes de líquidos, etc. Tales posibilidades estaban fuera de nuestro alcan-

//////

8  
ce, por lo que se planteó el estudio únicamente en escala de laboratorio y semiindustrial.

2º- La elección de una enzima microbiana industrialmente aplicable a nuestro país fué relativamente simple, ya que el hecho de no existir aquí ninguna industria productora de enzimas microbianas nos permitía preparar cualquiera.

Se trataba entonces de buscar alguna aplicable a industrias ya establecidas y que actuara sobre materias primas de abundante producción nacional.

Del conjunto de hongos conocidos como productores de enzimas elegimos el *Aspergillus Orizae* por ser buen productor de amilasas, por haber sido probado con éxito en la industria, ya que existen varios preparados comerciales utilizables en la producción de alcohol por fermentación, en la purificación de pectinas, clarificación de jugos de frutas y del vino y en el desaprestado de tejidos, y por permitir la transformación útil de productos abundantes en el país (maíz, trigo, etc.).

Contribuye a justificar nuestra elección el hecho de que en uno de los institutos nacionales mencionados anteriormente se está encarando actualmente el problema de la producción de alcohol etílico por medio de este microorganismo.

3º- El estudio crítico de los métodos de control de la actividad enzimática, especialmente en cuanto a su poder amilolítico, resultó necesario inmediatamente que comenzamos nuestro trabajo, porque a pesar de la variedad de principios en que están basados y a los estudios realizados sobre los mismos, tuvieron ventajas e inconvenientes para cada una de las determinaciones realizadas.

Fué así que buena parte de nuestro trabajo consistió en la repetición de experiencias sucesivamente anuladas por el empleo de métodos de control inadecuados. Por eso hemos tratado de ser lo más explícitos posibles en la parte experimental, especificando claramente las condiciones de ciertos controles y experiencias efectuadas.

////

4° - El conocimiento científico de las enzimas, si bien ha realizado progresos considerables, está aún en sus comienzos en muchos aspectos.

El problema fundamental de los químicos, la síntesis, no ha sido resuelto para las enzimas y todavía aparece lejano para la mayoría de ellas. El hecho de que las enzimas hayan resultado - por lo menos en las conocidas con seguridad- ligadas a cuerpos proteicos, explica y justifica la lentitud de los progresos que se realizan sobre su aislamiento y estudio. No queremos discutir la afirmación hecha por algunos autores de que el atraso en el estudio de las mismas haya derivado del empeño en mantener la teoría de que la constitución de las enzimas es la de una parte activa apoyada sobre un soporte proteico, teoría que orientó las investigaciones hacia el aislamiento de tal parte activa. Pero lo que debemos reconocer es que la mayor parte de las comprobaciones sobre la composición y aún sobre el comportamiento de las enzimas realizadas hasta hace veinte años son muy poco útiles desde el punto de vista científico, por las impurezas que contenían los extractos sobre los que trabajaban. Así ocurre que unos autores señalan una gran cantidad de enzimas en un microorganismo por la acción que ejercen los macerados de sus cultivos sobre un sustrato determinado, mientras otros sostienen - basados en los mismos hechos - la heterogeneidad de la acción de una sola enzima sobre dichos sustratos.

El problema científico del aislamiento, el estudio de la composición y la síntesis de las enzimas microbianas es de fascinante interés para los químicos, pero en nuestro trabajo no hemos intentado profundizar ninguno de esos aspectos.

Creemos sin embargo que contribuirá a crear las condiciones para que en un futuro no lejano se puedan encarar tales investigaciones.

POSIBILIDADES TEORICAS Y PRACTICAS

Restringido nuestro trabajo a las enzimas del *Aspergillus Orizae*, resultaba aún así demasiado vasto por el gran número que es capaz de producir dicho microorganismo, escapando a nuestros fines concretos un control de todas ellas y de las posibilidades industriales que pudieran tener.

El *Aspergillus Orizae* produce una extraordinaria cantidad de enzimas, habiéndose señalado más de veinte, entre las cuales resultan abundantes las carbohidrasas, especialmente las amilasas.

Este hongo tiene una tradición honrosa en la microbiología industrial. Desde hace mucho tiempo se lo emplea en los países orientales, sobre todo en el Japón, para fabricar bebidas alcohólicas semejantes a una cerveza fuerte (saké) y salsas por fermentación de la soya, siendo su industria de gran importancia económica en dicho país.

Su introducción en los países de raza blanca se debe a Takamine, quien trató de utilizarlo para producir alcohol potable, fracasando por las dificultades para eliminar el olor desagradable del producto. En cambio, el empleo de sus enzimas amilolíticas para la sacarificación de maisches o de almidones y para su aplicación medicinal en forma de takadiastasa se ha ido ampliando continuamente.

Su utilización es casi excluyente de otros materiales en la clarificación de jugos de fruta y en la purificación de pectinas, donde la malta resulta poco eficaz. La Polizima D y el Pectinol son dos productos norteamericanos destinados a este fin.

También se ha introducido su empleo - aunque con menor eficacia - porque está basado en sus enzimas proteolíticas - en el depilado de los cueros y en ciertas operaciones previas al curtido, en sustitución de extractos pancreáticos como el Oropon. Se usa asimismo en el desapres-

to de fibras textiles, en la preparación de "fondants", en la desproteínización del "latex", en la elaboración de glucosa técnica, etc., aunque no excluye los productos enzimáticos de otro origen.

Las amplias posibilidades de aplicación industrial de los cultivos de *A. Orizae* nos obligó a restringir nuestros ensayos, dedicando especial atención al grupo de enzimas segregadas en mayor abundancia y a su probable empleo en nuestra industria,- condicionando todas las comprobaciones teóricas a este mismo fin.

En base a ello, quedó definitivamente fijado nuestro campo de experimentación de la siguiente manera:

- 1°- Obtener cepas de *Aspergillus Orizae*.
- 2°- Lograr un material rico en enzimas amilolíticas a partir de ellas.
- 3°- Comprobar la posible presencia de otras enzimas en dicho material y ensayar su utilización directa a esa concentración.
- 4°- Estudiar las posibilidades industriales de tal material.
- 5°- Hacer ensayos preliminares sobre el aislamiento y utilización de las enzimas purificadas.



P A R T E      E X P E R I M E N T A L

---

tin de cultivos de maiz (4).

La producción directa de alcohol a partir de materiales ricos en almidón por acción de mohos se tendrá aplicación hasta que se elimine el olor y se borresagradables de los bebidas obtenidas. Es importante no perder la posibilidad de obtener por este medio, alcohol industrial, donde con el importante costo de los cultivos agrícolas.

### Parte experimental

Se siguió el proceso indicado por Holstoftler, Fulkner y Schewe (57)

para la fermentación, pero sin la etapa de destilación para determinar la fermentación alcohólica.

Se procedió de la siguiente manera:

En un colmenyer de 500 cc. se introdujeron 50 grms. de harina de maíz y 250 cc. de HCl 0,04 N. Se hizo una coacción alcohólica y 1/2 hora de reposo. Se enfrió a 50° y se inoculó con cantidades variables de afrecho obtenido de distintas procedencias (entre 5 y 10 gr. sobre base seca). Se agitó para mezclar uniformemente y se llevó a estufa a 30°. Después de 5 días de incubación se midió el volumen final y se destiló una parte alícuota. Sobre el destilado se determinó el alcohol por el método de uno de nosotros (102). El rendimiento se calculó respecto de la cantidad de almidón inicial, titulada según el A.O.A.C (103).

<u>Cultivo A.O.</u>	<u>% de afrecho respecto del maíz</u>	<u>Rendimiento en alcohol % del teórico</u>
24	10,4	5,9
26	13,6	5,1
77	10,2	4,6

//////

AISLAMIENTO DE CEPAS DE ASPERGILLUS ORIZAE

El problema del aislamiento de cepas de A. Orizae en nuestro país con miras a su aplicación industrial fué planteado por nosotros.

Esto nos creaba una gran responsabilidad ya que el fracaso de tal intento, si bien no nos hubiera impedido efectuar el trabajo, habría disminuído la utilidad de los productos obtenidos, que dependerían de cepas conseguidas en el extranjero, generalmente con poca comodidad y sin ninguna seguridad en cuanto a eficacia.

No hemos encontrado datos bibliográficos sobre este punto en nuestro país, pero teniendo en cuenta que los hongos del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente difundidos y son poco exigentes en cuanto a su alimentación, planteamos la hipótesis de que debían hallarse en cereales y otros productos vegetales comunes entre nosotros.

Tal suposición resultó correcta, pués hallamos A. Orizae en numerosos granos y frutos. Posteriormente, por gentileza de nuestro compañero, el Dr. Duprat, obtuvimos varias cepas de A. Orizae de la colección del Northern Regional Research Laboratoire de Peoria, EE.UU., cuyas propiedades pudimos comparar con las aisladas por nosotros.

Parte experimental

Se buscaron colonias de hongos en una serie de productos vegetales, tratando de reunir muestras de distintas regiones de la república.

Se encontraron colonias en:

10	muestras	de	trigo
10	"	"	maiz
8	"	"	cebada
5	"	"	avena
4	"	"	alpiste

////

3	muestras	de	girasol
6	"	"	manzana
5	"	"	limón
8	"	"	uva
2	"	"	papa
3	"	"	centeno
2	"	"	arroz
2	"	"	maiz de Guinea
4	"	"	piña
6	"	"	naranja
4	"	"	pera
2	"	"	frutilla
3	"	"	flores

Las colonias más comunes resultaron pertenecer a los géneros *Aspergilli*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Mucor*.

La técnica empleada fué la siguiente:

Se colocaron los materiales en cajas de Petri con cantidad variable de agua, de acuerdo a la naturaleza de cada uno de ellos; se llevaron a estufa a 25° y 37°C y se esperó el desarrollo de las colonias, que se produjo entre 24 y 60 horas.

Se hicieron entonces repiques de cada una de las colonias observadas en cajas de Petri conteniendo medio de Agar Czapek modificado por Dox y Thom (ver su composición en el Capítulo "Medios de Cultivo") y se procedió posteriormente al aislamiento de las distintas cepas, las que se pasaron una vez puras a tubos conteniendo el mismo medio.

El medio de Czapek modificado se utilizó sistemáticamente para el aislamiento y estudio morfológico de las especies de hongo obtenidas, teniendo en cuenta que los datos sobre la morfología de los cultivos in-

dicados por Thom y Church para diferenciar las distintas especies de Aspergilli fueron obtenidos a partir de hongos crecidos en dicho medio. (Ver Thom y Church, "The Aspergilli", ficha N° 120 ).-

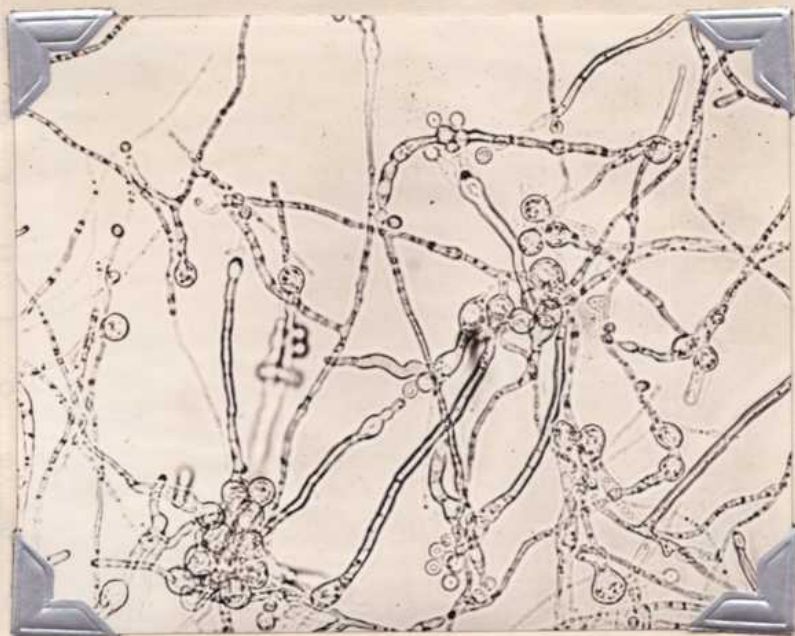
El método de aislamiento descrito resultó el más cómodo y eficaz.

Se probó también lavar los materiales en estudio con agua destilada estéril y sembrar éstas suspensiones en cajas de Petri con Agar Czapek o en caldos líquidos, pero este sistema complicaba las operaciones y, si bien aseguraba el crecimiento de mayor cantidad de esporas, dificultaba considerablemente el aislamiento.

Con el método aplicado se logró aislar de los productos naturales antes mencionados 115 cepas de hongos, de las cuales 52 resultaron pertenecer al género Aspergillus, cuyas características describimos más adelante. Empleamos asimismo en nuestros ensayos 12 cepas de Aspergillus aisladas en materias fecales de niños en el Instituto Nacional de la Nutrición, y que nos fueron cedidas gentilmente.

Esporas en germinación, micelio y cabezuelas.

Vista de conjunto ( x 400 ).-



--

Cabezuelas en formación ( x 800 ).



--

SISTEMATICA MICROBIOLOGICA

El estudio y clasificación de las cepas de *Aspergillus Orizae* tenía dos exigencias primordiales:

1°- Poder establecer con seguridad que se trataba de dicho microorganismo.

2°- Hacerlo por un método de reconocimiento que fuera sencillo y práctico para un trabajo de naturaleza industrial.

La sistemática del género *Aspergilli* ha sido ampliamente tratada en el libro de Thom y Church "The *Aspergilli*".- Transcribimos a continuación la descripción de dicho género.

"Micelio vegetativo compuesto por hifas ramificadas, septadas, incolores o vivamente coloreadas, y en unas pocas formas difusamente pardas en áreas sumergidas, o produciendo costras o esclerotos pardos. Aparato conidial desarrollado como tallos y cabezas a partir de células basales especializadas, alargadas y de paredes gruesas, produciendo conidióforos como ramas aproximadamente perpendiculares al eje longitudinal de la célula basal. Conidióforos septados o no, alargándose usualmente hacia arriba y ensanchándose en vesículas fértiles elípticas, hemiesféricas o globosas, soportando células fértiles o esterigmas, ya paralelos y agrupados en grupos terminales, ya radiales a partir de toda la superficie. Los esterigmas ya sea en una sola serie, ya como una serie primaria soportando cada una en su ápice un grupo de dos o más esterigmas secundarios. Los conidios varían grandemente en color, tamaño, forma y detalle, estando separados de las extremidades de los esterigmas por tabiques transversales (no producidos por brotación) y formando cadenas no ramificadas, dispuestas radialmente sobre cabezas globulares o empaquetadas en masas columnares (calip-

"tradas).

"Peritecios hallados solo en ciertas especies, desconocidos en la mayoría, cleistocárpicos, de paredes delgadas, produciendo ascos y ascosporas en unas pocas semanas. Esclerotos encontrados regularmente en algunas razas, ocasionalmente en otras, y ausentes en otras razas estrechamente relacionadas; comunmente globoso o subgloboso, compuestos de células de paredes gruesas, evidentemente llenas de material de reserva, descritos por Brifeid (Bot.Stg. 34; 265, 1876) para A. Niger, y por Dangcard como produciendo ascos después de un período de reposo, pero tales ascos y ascosporas no han sido halladas por nosotros".

Figura asimismo la descripción completa de la especie A. Orizae sin. Eurotium Orizae Ahlb. (Ahlburg) Cohn (Cohn. F. Ueber Schimmelpilze als Garnig serreger. Jahresb. Sches. Gesell. Vaterl.Cultur (1883) 61: 226. Breslau 1884). Una descripción incompleta de los organismos de saké fué publicada por Korschelt (Korschelt O. Ueber Saké, das alkoholische Getrank der Japaner. Dingler's Polytechnisches Jour. 230,330.1878), como tomada de una carta del "Sr. Ahlburg". - Transcribimos la descripción dada en "The Aspergilli".

"La siguiente caracterización del cultivo (Nº 113) se tomó de Thom y Church, Amer.Jour.Bot. 8.106.1921: Colonias en medio de Czapek se extienden en superficie, con color amarillo verdoso pálido (el verde variando del verde lima al verde clavelina) (Ridgway XXXI, 25" YG-Y), palideciendo pronto para dejar sombras pardo amarillentas. Esclerotos oscuros, producidos ocasionalmente, pocos y en grupos, Micelio y agar no coloreados; talos de 2 a varios milímetros de longitud y entre 20 y 25 micrones de diámetro. Cabezas grandes y pequeñas en el mismo cultivo, predominantemente grandes, globosas y radiadas más bien que ca-



"liptradas. Esterigmas más comumente en una serie, ocasionalmente en  
 "dos series; esterigmas primarios mayores, de 8 a 12 por 5 micrones,  
 "secundarios (cuando están presentes) de 7 a 10 por 3 micrones. Coni-  
 "dios piriformes, incoloros o muy debilmente amarillos, con paredes  
 "tan espesas como para dejar hoyos circulares, alargados o espirifor-  
 "mes, produciendo un efecto áspero o equimulado cuando se mira con pe-  
 "queño aumento, variando de tamaño, predominantemente mayores que A.  
 "Flavus, 3 por 4 u, 4 por 5 u, 5 por 6 u, 6 por 7 u y ocasionalmente  
 "5 a 6 por 8 a 10 micrones.

"Zikes (125) refiere la formación de peritecio en estas especies, pe-  
 "ro su cultivo, enviado a nosotros (N° 4627) ha demostrado ser un miem-  
 "bro del grupo A. glaucus. Bezsonof (126) también informa sobre perite-  
 "cio, pero sin datos que aseguren una discriminación entre peritecios  
 "y esclerotos.

"Muchas cepas estrechamente parecidas a la N°113 han sido examinadas  
 "después, junto a formas manifiestamente relacionadas, pero divergentes  
 " en tonos de color, en medidas y en efectos sobre los sustratos. Estas  
 "descripciones diagnósticas servirán para situar un organismo en la se-  
 "rie o grupo, pero no identificarán una cepa particular".

La descripciones del género y del grupo son indispensables para la e-  
 xacta clasificación de una cepa, pero resultan demasiado extensas y  
 minuciosas para una selección previa. Más eficaces para tal fin son  
 . . las claves dadas por los mismos autores o por Lafar (118)

Nosotros preferimos sin embargo separar en primer lugar únicamente las  
 colonias de color amarillo verdosos a verde oscuro, dejando de lado  
 las otras características morfológicas.

Para la selección psterior tuvimos en cuenta una propiedad fisiológica  
 muy interesante del A. Orizae: su capacidad de producir ácido kójico,-

////

descubierto por Saito en 1907 en el micelio pulverizado de este hongo. Yabuta, en 1924 y Raistrick y colaboradores (que lo descubrieron independientemente de los anteriores en 1923) demostraron que solo unas pocas especies de Aspergilli, cuando crecen en medio de Czapek, producen ácido kójico, reconocible por la coloración roja intensa que produce con solución de cloruro férrico. Son estas el *A. flavus*, *A. Orizae* y *A. Tamarri*, (ver Smith, Ind.Mycology, 2a. ed. 1942).-(85)

Nosotros aplicamos sistemáticamente esta reacción, eliminando las cepas que daban reacción negativa.

De las cepas con reacción positiva de ácido kójico se pueden separar después con relativa facilidad las pertenecientes a la especie *A. tamarri* porque, si bien el color de las colonias jóvenes es bastante parecido al de las *A. Flavus Orizae*, cuando envejecen se oscurecen considerablemente, pasando al marrón oscuro. La observación microscópica y la medición de las esporas elimina toda duda, pues las del *A. tamarri* miden de 5 a 7, 5 micrones de diámetro, mientras las del *A. Orizae* solo miden de 3,5 a 5 micrones.

En esta parte de nuestro trabajo nos resultó fundamental el asesoramiento del Ing. Soriano.

#### Parte experimental

De las cepas aisladas de los productos naturales antes mencionados se separaron aquellas colonias cuyo color variaba entre el amarillo verdoso claro, a veces con tonos pardos, y el verde oscuro.

Estas colonias se repicaron en cajas de Petri conteniendo medio de Agar Czapek, incubándolas a 37° C durante una semana. Al cabo de este tiempo se agregó sobre el borde de la colonia bien desarrollada una

gota de solución de cloruro férrico al 10%. En caso de existir ácido kójico se desarrollaba en pocos segundos un color rojo, que variaba del rosa fuerte al rojo sangre intenso.

Las cepas con reacción positiva de ácido kójico se observaron al microscopio, directamente sobre caja de Petri en cultivos frescos, y se clasificaron de acuerdo a las indicaciones de la clave de Thom y Church empleando sólo aquellas que respondían a los caracteres morfológicos del grupo *Flavus-Orizae*.

Las cepas con reacción negativa de ácido kójico se aislaron en tubos de ensayo con agar Czapek para la colección.

### Conclusiones

- 1°- Por primera vez en el país se aislaron cepas de *A.Orizae* de importancia industrial.
- 2°- Tales cepas responden a las características señaladas por Dox y Thom para el grupo *A. flavus-orizae*.
- 3°- El método de aislamiento propuesto:
  - a) Separación por el color de la colonia (verde claro a verde oscuro) en medio de agar Czapek.
  - b) Reacción (1) del ácido kójico. (1) positiva
  - c) Observación microscópica y medida de las esporas.resultó eficaz para los fines de nuestro trabajo.
- 4°- Los ensayos industriales efectuados con hongos kójico negativos demostraron que no presentaban ventajas sobre los pertenecientes al grupo *A. Flavus-Orizae*.

MEDIOS DE CULTIVOS EMPLEADOS

Para el aislamiento y el control de las propiedades de las cepas de hongos obtenidas se emplearon diversos medios de cultivo, cuya composición y método de preparación consignamos a continuación.

Medio de Czapek, modificado por Dox y Thom:

Sacarosa .....	30	gramos
NO <sub>3</sub> Na.....	2	"
SO <sub>4</sub> Mg crist .....	0,5	"
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .....	1	"
ClK .....	0,5	"
SO <sub>4</sub> Fe crist.....	0,022	"
Agua .....	hasta 1000	cc.
Agar .....	15	gramos.

Se disuelven todas las sales menos el fosfato en 500 cc. de agua. Se agrega la sacarosa y se agita hasta disolución. En la otra mitad del agua se disuelve el fosfato potásico y se agrega a la solución anterior. Se añaden 15 gramos de agar y se lleva a ebullición, agitando constantemente hasta disolución total. Se vierte en tubos de ensayos que se tapan con algodón. Se esteriliza en autoclave 30 minutos a 1 y 1/2 atmósferas de presión o con vapor a 100°C durante una hora por dos o tres días consecutivos.

Medio de Raulin.

Sacarosa .....	70	gramos
Acido tartárico.....	4	"
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> .....	4	"
CO <sub>3</sub> K <sub>2</sub> .....	0,6	"
PO <sub>4</sub> H (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	0,6	"

/////

$\text{CO}_3\text{Mg}$ .....	0,4	gramos
$\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ .....	0,25	"
$\text{SO}_4\text{Zn}$ crist .....	0,07	"
$\text{SO}_4\text{Fe}$ crist .....	0,07	"
$\text{SiO}_3\text{K}_2$ .....	0,07	"
Agua destilada .....	hasta 1.500 cc.	

En la preparación de este medio para nuestro uso hemos suprimido el silicato de potasio por la dificultad de su disolución.

Medio de Raulin-Thom.

Este medio surgió de un error cometido por Thom y Church en la transcripción del medio original de Raulin en la edición de 1926 de su libro "The Aspergilli". En ella omitieron el nitrato de amonio y lo reemplazaron por tartrato de amonio, resultando un medio de cultivo muy interesante, de menor acidez que el anterior, que tiene pH 2,9, mientras éste tiene un pH próximo a 4.-

La preparación de ambos medios es semejante:

Se pulveriza el ácido tartárico y se disuelve en 500 cc. de agua caliente, agregando luego el carbonato de magnesio. Una vez disuelto se agrega el tartrato de amonio (o el nitrato) y se agita hasta disolución. A continuación se disuelve la sacarosa. Aparte se disuelve el carbonato de potasio en 100 cc. de agua y se agrega a la solución anterior. Los sulfatos de amonio, cinc y hierro se disuelven también separadamente y se agregan a la primera solución. Por último se disuelve el fosfato en 500 cc. de agua y se agrega al primero agitando constantemente. Se lleva a volumen y se esteriliza.

Agar de mosto de malta

Malta molida ..... 250 gramos  
 Agua potable .....1000 cc.  
 Agar ..... 20 gramos.

Se preparó según la técnica de Henneberg:

Se calienta el agua a 50° y se agrega la malta, manteniendo media hora a 45°. Se aumenta hasta 60-62° en un lapso de media hora y se mantiene a esta temperatura durante otra hora, hasta que no de reacción inmediata con el iodo. Se filtra por lienzo. Se hierve y filtra por papel. Se enfría a 50°, se agrega clara de huevo y se calienta hasta buena coagulación. Se agrega 20 gramos de agar, se funde a 100° y se vuelve a filtrar repartiendo en tubos esterilizados. Se esteriliza por tindalización 30 minutos diarios a 100° durante cuatro días.

Medio de Woltje modificado por uno de nosotros

Fuente hidrocarbonada ..... 75 gramos  
 $SO_4 (NH_4)_2$  ..... 10 "  
 $SO_4 Mg$  ..... 2,5 "  
 $PO_4 HK_2$  ..... 5  
 Agua ..... 1000 cc.

Se disuelven los sulfatos de amonio y magnesio en la mitad del agua. Se agrega el carbohidrato (sacarosa o glucosa) y se disuelve. Aparte se disuelve el fosfato en 500 cc. de agua. Se mezcla agitando. Se agregan 40 ml. de HCl 2,5%, ajustando la acidez hasta 0,03 N. de HCl. Esta modificación previene la formación de precipitados que se producen con la composición original y al mismo tiempo disminuye el pH del medio.

Medio de gelatina

Gelatina "oro" ..... 150

Agua ..... 1000 cc.

Se corta la gelatina (calidad comestible) en pequeños trozos y se cubren con agua, dejando en reposo durante la noche. Se calienta la masa hasta solución completa, se reparte en tubos y se esteriliza por tindalización durante 30 minutos durante 3 días consecutivos.

Medios con antisépticos

Se emplearon especialmente los medios de Czapek y de Raulin, agregándose una proporción variable de antiséptico, fenol, formol, ácido benzoico, ácido salicílico, etc.

Medios de cultivo

Para los ensayos de cultivo en medio líquido del tema IV se empleó el medio basal siguiente (ficha 19)

100 gr. de carbohidrato

0,015-0,005 mol gr. de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 

0,015-0,005 " " " Citrato de K

0,04- 0,08 " " " fuente nitrogenada

2 gr sulfato de magnesio  $7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 gr. de  $\text{Cl}_2\text{Ca}, 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 gr. de  $\text{SO}_4\text{Fe}, 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{SO}_4\text{Zn}, 7\text{H}_2\text{O}$ agua hasta 1 litro. ~~ficha 19~~

CAPITULO 2º

COMPROBACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS CEPAS  
OBTENIDAS, ESPECIALMENTE CON RESPECTO A LAS  
ENZIMAS AMILOLITICAS.



COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
LAS CEPAS OBTENIDAS, ESPECIALMENTE CON RESPECTO A LAS EN-  
ZIMAS AMILOLÍTICAS.

Al encarar este punto de nuestro trabajo comprendimos la necesidad de controlar críticamente los métodos de medición de la actividad amilolítica, y en menor escala la proteolítica, que se probó en el producto comercial obtenido.

En efecto, los numerosos métodos existentes no son útiles en todas las oportunidades, y es necesario tener cuidado en su empleo para no caer en errores.

1° - CONTROL DE METODOS

En este capítulo hemos agrupado los métodos de control de enzimas probados por nosotros en el curso del trabajo, con las observaciones prácticas realizadas, separándolos de las conclusiones particulares a que llegábamos sobre las enzimas del A. Orizae, a fin de dar mayor claridad a la exposición.

Este control se refiere especialmente a los métodos de determinación de poder amilolítico, pero también figuran los proteolíticos, ensayados sobre los productos comerciales obtenidos.

a) METODOS AMILOLÍTICOS

Los métodos empleados para medir la actividad amilolítica se pueden agrupar en:

- 1° Los que prueban la ausencia de almidón. El método clásico es el de Wohlgemuth, modificado posteriormente de varias maneras, que emplea como reactivo la solución de iodo.
- 2° Los que miden la pérdida de viscosidad de los engrudos de almidón. Entre ellos citamos el método de Waksman.

- 3°- Los que determinan el poder reductor de los productos de hidrólisis del almidón. A este grupo pertenece el clásico método de Lintner.
- 4°- Los que dosan el alcohol producido por la fermentación total o parcial de los hidratos de carbono producidos por hidrólisis. Entre ellos se encuentra el descrito por Ellis, Fulmer y Underkofler.
- 5°- Los que hacen la polarimetría de las soluciones de almidón total o parcialmente digeridas.
- 6°- Los que miden directamente el almidón residual separado por precipitación. Por ejemplo el método de Sherman y colaboradores.
- 7°- Los que aprovechan el poder reductor de los productos de hidrólisis sobre materiales distintos al Fehling, por ejemplo la decoloración del azul de metileno.

El comportamiento de un mismo macerado enzimático probado por estos métodos no es influenciado en forma similar por la variación de factores como la temperatura, el pH, etc. Esto parecería probar la existencia de un complejo enzimático amilolítico. Sin embargo, una demostración de tal hipótesis exigirá siempre en último extremo el aislamiento de los componentes de tal supuesto complejo. De otro modo quedaría la duda de si se trata de una enzima sola, que actúa de diferente manera según la naturaleza del sustrato, o si son dos o más las que actúan, ya independiente, ya coordinadamente, en las descomposiciones que son capaces de realizar.

El problema se complica más aún porque el almidón- cuya estructura no está bien determinada- produce sustancias que a su vez, sin estar totalmente aclaradas en cuanto a su proporción o estructura, son suscep-

tibles de descomposición hasta llegar a maltosa y glucosa.

Tratar de planear un método absoluto de medición del poder enzimático es inútil por el momento, porque hay todavía relación de interdependencia entre los avances que se realizan en el conocimiento de los almidones de distintas procedencias y el mecanismo de las acciones enzimáticas capaces de descomponerlos.

Aclarar las relaciones entre los métodos analíticos y el comportamiento de las enzimas requeriría un trabajo de naturaleza distinta al que nos propusimos. Se resolvió elegir para cada tipo de determinaciones el método más adecuado, tratando en la parte de aplicaciones de que fuera similar al control industrial que se empleaba.

#### MÉTODOS EMPLEADOS

1°- Modificaciones al método original de Lintner (87) utilizando el Fehling volumétrico según (15) (16).

Los ejecutamos de la siguiente manera:

a) -Soluciones necesarias.

Solución buffer de almidón. Se pesan 20 gr. de almidón soluble Merk, desecado en estufa, se suspenden en poca agua fría, se añade 500 cc. de agua caliente y se calienta hasta que el líquido se aclare (no pasa de 75° la temperatura necesaria). Se enfría, se añaden las soluciones para regular el pH (acético-acetato de sodio) en la cantidad necesaria para un pH de 5,2- 5,4 en el caso que se quiera trabajar al óptimo de actividad de la amilasa del A.O. Se completa con agua hasta un litro. Solución de enzima. Cuando se empleaban los líquidos de maceración de afrechos emmohecidos, se tuvo la precaución de neutralizarlos con HCl. Cuando se emplearon concentrados mucho más activos, se tomaron las cantidades adecuadas

para tener siempre actividades del mismo orden, con lo cual se eliminaron los errores que provienen de que la cantidad de almidón hidrolizado no es directamente proporcional a la cantidad de enzima existente, sobre todo cuando aumenta la concentración sobre cierto límite.

Cuando se realizaron los ensayos de acción de electrolitos sobre la actividad, se procuró medir la concentración total de sales de la solución, diluyendo para mantenerla por debajo de 5 por mil.

Cuando se trataba de comprobar la influencia de la inactivación por el calor, en precipitados más o menos purificados, se disolvían en la misma solución enzimática inicial cuyo poder amilolítico se había destruido, para reproducir así las condiciones originales.

Para preparar la solución enzimática a partir de precipitados o de material sólido, salvo indicación expresa en otro sentido, se usaron líquidos de maceración que no tenían poder amilolítico en vez de usar agua destilada. La aparición de precipitados durante alguna de estas operaciones (sobre todo en la neutralización), era siempre seguida de filtración. Igualmente, los macerados empleados eran líquidos opalescentes, pero sin ninguna suspensión, filtrados generalmente con papel de poro fino, otras veces por centrifugación y en último extremo con bujía filtrante ayudando con pasta de papel.

#### Ejecución del método

Se miden 100 cc del almidón preparado en un erlemeyes de 250 cc.

- Se mantiene en baño de temperatura constante ( $\pm 0,05^\circ$ ). Se añade la solución enzimática mantenida también previamente a esa temperatura y se van extrayendo muestras cada cierto tiempo. El líquido extraído, generalmente 5 cc, se vierte en un tubo grande de ensayos

conteniendo 1 cc de NaOH 0,25 M para detener la hidrólisis. Se enfría a la temperatura ambiente y se titula con licor de Fehling standardizado ( 5 cc equivalen a 5 cc de solución de glucosa al 0,5%). Se pueden hacer dos titulaciones, una para aproximar el valor y la otra para obtener el resultado definitivo.

Observaciones: Este método se aplicó especialmente para la determinación de la curva de actividad en función del tiempo, para lo que resulta particularmente apropiado. Igualmente se empleó para estudiar los aumentos de la actividad enzimática por concentración; en este caso se tuvo la precaución de usar menores cantidades de líquido para que la concentración en la solución de almidón fuera similar en todos los ensayos.

2°- Método clásico de Wohlgemuth (86) modificado por Takamine (jr)  
(J. Biol. Chem. 1924) y con pequeñas alteraciones nuestras:

Soluciones. Se siguen las mismas indicaciones que en el método 1°. Se prepara además solución 0.01N de iodo.

Ejecución de la reacción: se prepara en una serie de tubos de ensayos una dilución de la enzima. Generalmente conviene una progresión geométrica de razón 1/2 tomando 1 cc de agua destilada en cada tubo y añadiendo al 1° un cc de la solución de enzima, mezclando bien, y pasando un cc al 2° tubo, de éste al 3° y así sucesivamente. Se añade a cada tubo 5 cc de la solución de almidón soluble y se lleva al baño de temperatura constante durante 30 minutos; al cabo de ese tiempo se sacan y enfrían agregando rápidamente 10 cc de agua destilada a 5 - 10° C a cada tubo. Luego 0,5 cc de solución 0,01N de iodo, se mezcla bien y se anotan los colores obtenidos por comparación con un testigo.

////

Observaciones: El método mide la máxima dilución de enzima que es capaz de hidrolizar totalmente una cantidad fija de almidón ( en cada tubo hay 5 centigramos de almidón) y al mismo tiempo los tubos anteriores, cuyas coloraciones dependen de las dextrinas producidas, dan una idea aproximada de la cantidad de enzima que se necesita para llevar la hidrólisis hasta una etapa determinada.

El método resulta útil para comparar la acción de un mismo preparado enzimático sobre distintos sustratos; nosotros probamos habitualmente sobre una solución de almidón de papas y sobre el almidón soluble Merk o Poulenc; se puede poner así de manifiesto la diferente sensibilidad de la enzima amilolítica a la temperatura, según se pruebe sobre almidón soluble o de papas.

La sensibilidad del método es grande; en cambio su exactitud no permite aprovecharlo directamente en ciertos controles. En efecto, queda en primer lugar la duda sobre cual es el último tubo en el que no hay acción hidrolítica. Para probarlo basta añadir a un tubo que no de coloración con el iodo una cantidad de solución de almidón que sea el 10% de la empleada; el color obtenido es tan intenso como si no hubiese habido hidrólisis. Si se toma cualquiera de los tubos anteriores, el poder amilolítico expresado en grados Lintner por ej, va quedando dividido por dos; por eso el método es útil para comparar comportamientos diferenciales pero no para titular. En cambio en las aplicaciones en que se busca la eliminación total del almidón, es más útil tomar el último tubo que no da color azul con el iodo. Sin embargo, aún en este caso, la exactitud estará comprendida entre los valores correspondientes a los dos últimos tubos y será menester hacer diluciones en progresión aritmética de enzima entre esos valores para tener un dato útil.

Observaciones prácticas: son importantes algunos detalles; es imprescindible

////

dible emplear agua destilada en las operaciones porque el color del iodo desaparece a esa concentración con el agua corriente.

Cuando se trata de macerados muy impuros, los resultados tampoco son seguros respecto de los tubos intermedios, donde hay decoloración muy rápida. Se puede evitar esto añadiendo otros 0,5 cc de I

En la literatura se omite muchas veces la concentración de la ~~sol.~~ de iodo; esta concentración y el volumen a tomar fueron probados para que no necesitara medirlos muy exactamente y para que las diferencias de coloración producidas entre tubo y tubo fueran bien visibles.

El manejo de los tubos de la serie se simplifica si se colocan en una gradilla pesada que se sumerja en el baño; se elimina así la tarea engorrosa de marcar los tubos, el peligro de roturas, etc.

El salto de concentración entre tubo y tubo es tan grande que resultan despreciables los errores en el tiempo de acción, en la temperatura o en la medición de volúmenes. En cambio en las diluciones en progresión aritmética, es necesario ser riguroso en los controles.

Las soluciones de almidón se conservan bien a la temperatura ambiente siempre que no se contaminen con hongos. Cuando se usa pH muy ácido se precipita el almidón, especialmente el soluble. La solución agitada para poner en suspensión el precipitado, no dió errores al ser empleada en algunos ensayos.

### 3° - Método de Waksman. (6) modificado por nosotros

Se prepara una solución al 2% de almidón de patatas previamente lavado, procediendo del modo descrito en el método de Wolghemuth. Se prepara una serie de tubos con cantidades decrecientes de la solución enzimática como indica dicho método, y se agrega a cada tubo 5 ml. de la solución de almidón, procediendo a continuación como en aquel. Al final de la operación se determina la disminución de viscosidad de

la solución de almidón.

Para hacer más visible la hidrólisis del almidón se prepara almidón embebido en una solución al 1% de rojo neutro, lavado repetidas veces con agua destilada y desecado posteriormente. Al producirse la solubilización del almidón, se pone en libertad totalmente el colorante, aumentando la intensidad del color rojo.

Este método se empleó repetidas veces para determinar el poder amiloclástico por pérdida de viscosidad, sin haberlo podido adaptar a muestras condiciones de trabajo

4°- Micrométodo para el reconocimiento cualitativo de enzimas, propuesto por B.N. Sastri y M. Sreenivasaya (31).

Se mezcla una gota de la solución a probar con una gota del reactivo específico para la enzima en un microcrisol y se tapa inmediatamente con un vidrio de reloj para mantener la humedad. Se calienta durante treinta minutos a la temperatura de acción de la enzima y se trata con el reactivo adecuado. Se proponen para tal fin una serie de reactivos específicos para cada enzima.

Este método resultó cómodo para ensayar las gotitas de líquido exudado que aparecían sobre las colonias de *A. Orizae* en medios de cultivo líquidos.

5°- Método cualitativo para seleccionar cepas con poder amiloclástico

Es el método aplicado en la parte inicial de nuestro trabajo y fué planeado por uno de nosotros.

Consiste en utilizar como medio de cultivo una solución de almidón al 5% mantenida a ebullición durante 10 minutos, vertiendo luego en cajas de Petri. Se siembran las cepas y una vez crecidos se prueba la hidrólisis del almidón en la zona de crecimiento con la reacción del iodo.

////



6° - Método industrial para la comprobación del poder sacarificante de los productos obtenidos.

Se empleó el método resumido por Ellis, Fulmer y Underkofer (57), que expresa la actividad enzimática en función del alcohol producido por fermentación del azúcar resultante de la hidrólisis del almidón.

Conclusiones

1°- Los métodos de control del poder amilolítico no son equivalentes.

2°- Para separar cepas con poder amilolítico de las que no lo poseen resultó cómodo y eficaz el método propuesto por nosotros.

3°- Para ensayos comparativos de actividades resultó práctico el método de Wolghemuth modificado.

4°- Para determinar los valores de la actividad amilolítica se deben emplear métodos basados en la acción del Fehling, ya que los datos de la bibliografía se dan generalmente en base a ellos.

Los métodos industriales de control son limitados. Sirven solo para el ensayo particular que se está realizando y es muy difícil referir sus resultados a cualquier otro método.

-.-

b) MÉTODOS PROTEOLÍTICOS

Sobre las cepas seleccionadas en base a su mayor poder amilolítico se ensayó la actividad proteolítica con los siguientes métodos.

////

1°- Método cualitativo para la selección de cepas

Adaptamos el método común de determinación de poder licuante sobre gelatina para la comprobación de la acción proteolítica de las cepas ensayadas.

Se prepara medio de cultivo de gelatina al 12%. Se esteriliza y distribuye en tubos que se disponen para siembras en estria~~h~~. Se siembran las cepas a ensayar y se incuban a 37° en presencia de un testigo esteril. A medida que crecen los cultivos se va comparando la gelificación del medio con la del testigo.

2°- Método de Hata (107) modificado por uno de nosotros.

Se prepara una solución de albúmina de huevo coagulada mezclando bien una clara de huevo con 4 veces su volumen de agua. Se filtra por lienzo. Se agrega agua mezclando bien hasta unos 400 cc. Se calienta suavemente hasta unos 80° y se mantiene a esta temperatura, agitando constantemente, hasta total coagulación de la albúmina. Se filtra nuevamente por lienzo.

Se disponen 5 cc. de solución de albúmina coagulada en cada tubo de una serie de cinco. Se agregan cantidades crecientes de la solución de enzima y se llevan a 40° de temperatura durante 30 minutos. Se sacan y enfrían los tubos y se observa por comparación con un testigo la clarificación sufrida por hidrólisis de la albúmina. Para hacer más clara la hidrólisis de la albúmina se agrega a cada tubo 2 cc. de HCl al 25% y se observa la coagulación. El último tubo en que no aparece coágulo indica el poder proteolítico de la enzima.

3°- Método de Gross Fuld, discutido por von Bergmann y Meyer (108)

Reactivos:

////

Solución de caseína. Se pesa 0,1 gr. de caseína pura y se le agregan 5 cc. de  $\text{OHNa}$  N/10 y 25 cc. de agua destilada. Se lleva la mezcla a ebullición, se enfría y lleva al pH deseado con HCl diluido. Entonces se diluye a 100 cc.

Solución alcohólica de ácido acético: Se mezcla 1 cc. de ácido acético glacial con 49 cc. de agua y se agregan 50 cc. de alcohol al 96%.

Procedimiento.

En una serie de 10 tubos se agregan cantidades crecientes de la solución de enzima. Se llevan todos a 4 cc. de volumen con agua destilada. Se agrega a cada tubo 2 cc. de la solución de caseína. Todas las soluciones deben estar a  $38^\circ$ . Después de mezclar se mantienen 1 hora a  $38^\circ$ . Se enfrían y se agrega a cada tubo 6 gotas de solución alcohólica de ácido acético. El tubo en el que comienza la clarificación es la base para calcular la actividad proteolítica.

4°- Método de Willstatter y Waldschmidt-Leitz modificado por Macrae (109) alterado ligeramente por nosotros, reemplazando la timoltaleína por fenoltaleína, que tiene un pH de viraje muy próximo.

Se toman 6 cc. de solución de gelatina al 10%. Se agregan 1,6 cc. de citrato de sodio M/5 a pH 5,0 (con ácido cítrico) y se ajusta el pH con trazas de ácido acético N. Se calienta la mezcla a  $40^\circ$ . Se agrega la solución de enzima y se lleva todo a 10 cc. con agua destilada. Se toman ahora 2 cc. se agregan 18 cc. de alcohol absoluto previamente calentado a  $50^\circ$ -  $60^\circ$ . La gelatina precipita. Se agregan 6 gotas de fenoltaleína (0,5% en alcohol) y se titula la mezcla con  $\text{OHK}$  N/20 disuelto en alcohol al 90% hasta aparición de color rojo. Durante la titulación debe agitarse constantemente. Después de 24 horas de digestión

////

a 40° , se toman otros 2 cc. y se titulan. El resultado se anota como aumento de la acidez (consumo de OHK N/20 por milígramo de enzima o por cc. de solución de la misma.)

### Conclusiones

1°- El método cualitativo resultó eficaz para determinar la existencia de enzimas proteolíticas en las cepas ensayadas.

2°- De los métodos cuantitativos, el último se empleó en el dosaje comparativo del poder proteolítico, ya que no da resultados absolutos.

3°- Los dos primeros métodos cuantitativos se usaron para comprobar la presencia o ausencia de enzimas proteolíticas que actuaran sobre albúmina o proteína.

1 - COMPROBACION DE ENZIMAS EN EL ASPERGILLUS ORIZAE

Al comenzar los ensayos sobre las cepas aisladas del grupo A. *Flavus-Orizae* se hizo necesario realizar algunos controles sobre la existencia de enzimas en los mismos, su abundancia relativa y el momento adecuado para aprovecharlas.

La literatura sobre las enzimas producidas por el A. *Orizae* es muy abundante. Hemos encontrado citadas 34 enzimas distintas.

1	amilasa $\alpha$	18	invertasa
2	amilasa $\beta$	19	inulasa
3	anidasa	20	lipasa
4	alcoholesidasa	21	lactasa
5	catalasa	22	maltasa
6	citasa	23	nucleasa
7	celulasa	24	pirofosfatasa
8	dipeptidasa	25	polipeptidasa
9	dextrinasa	26	peptasa
10	ereptasa	27	proteinasasa
11	emulsina	28	sulfatasa
12	estearasa	29	pectinasa
13	fitasa	30	trihalasa
14	fenolasa	31	pentosanasa
15	fosfodiesterasa	32	tannasa
16	fosfomonoestearasa	33	renina
17	glicerofosfatasa	34	tripsina

La comprobación de su presencia se hizo en todos los casos por la acción que sobre distintos sustratos ejercían los líquidos obtenidos por maceración del micelio del hongo. No se cita en un solo caso el aislamiento de alguna de ellas. Además, la mayor parte de las determinaciones fueron cualitativas.

Comprobar la presencia y realizar el estudio de cada una de las enzimas citadas en forma particular escapaba a nuestras fuerzas, y seguramente no se hubiera podido llegar a un producto comercial que las tuviera todas en la cantidad conveniente para que resultaran útiles.

Nos interesaban especialmente aquellas que por su abundancia tuvieran valor económico, pero aún así la selección de las cepas debía hacerse en base a una sola.

Dada la importancia que tienen las enzimas amilolíticas por sus aplicaciones prácticas, se procedió a seleccionar las cepas disponibles, exclusivamente en base a su poder amilolítico, y se estudió posteriormente la posibilidad de aprovechar alguna otra en el producto final obtenido.

#### 1° - Selección de cepas con poder amiloclástico

Para seleccionar groseramente cepas con poder amiloclástico se empleó el método cualitativo planeado por uno de nosotros:

Se prepara una solución al 5% de almidón de papas, hirviendo hasta total homogeneización (bastan 10 minutos). Se vierte en cajas de Petri esterilizadas y una vez frío el medio se siembran con las cepas en ensayo y tocando con la punta de un ansa de platino humedecida previamente en agua estéril el cultivo bien esporulado y llevándolo luego a la caja de Petri. En una caja se pueden hacer comodamente veinte ensayos. Se ponen en estufa a 37°. Al cabo de 24 horas, si se ha producido crecimiento, la colonia abarca una zona circular de un diámetro inferior al centímetro

////

tro. Se agrega con cuidado una gotita de solución N/100 de Iodo en el centro de cada colonia. Los que poseen actividad amiloclástica dan reacción negativa con el iodo, mientras que los que no la tienen dan el color azul característica del ioduro de almidón.

Ejemplo de un ensayo:

<u>Cultivo N°</u>	<u>Resultado</u>	<u>Observaciones</u>
1	† †	Aspergillus <i>Sp.</i>
3	-	A. Niger
6	-	Piña (Penicillium)
7	†	Piña (infección)
8	†	Cebada (infección)
11	† †	Inst. Nutrición 2661
13	† †	" " 2856. A.
19	† †	Avena (A. O.)
20	†	Avena (A. O.)
21	† †	Avena (A. O.)
22	† †	Pera
23	† †	Pera
24	† † †	Piña. Kójico positiva (A.O.)
25	† †	Piña. " " (A.O.)
26	† †	Piña. " " (A.O.)
32	no creció	Naranja
45	-	Girasol. Kójico -
46	-	Girasol. Kójico muy lento.
50	† †	Pera
51	† †	Pera
52	† †	Trigo con fenol
54	† †	Trigo " "
55	† †	Trigo. Kójico lento.
58	† †	Trigo, " "
61	† †	Girasol " "
62	† †	Centeno. (A.O.)
65	† †	Centeno
74	† † †	Arroz. Kójico positivo (A.O.)
77	† †	Maiz



Observaciones

La gota de iodo no debe tocar el borde de las colonias, donde hay almidón sin digerir.

Se puede extraer material con una pipeta del centro de la colonia y hacer el control en una piedra de toque.

El ensayo debe efectuarse en el momento en que la liquefacción de la capa de almidón ha llegado al fondo.

Conclusiones

1° Es un método cualitativo rápido y cómodo para separar cepas con poder amiloclástico de las que no lo tienen.

2° Se probó sobre una colección de cepas de distinto origen, separando las que revelaban actividad amiloclástica.

3° La mayor parte de las cepas del grupo A. Flavus Orizae son productoras de enzimas amiloclásticas.

4° El método empleado no permite establecer gradaciones en el poder amiloclástico, porque este es función del crecimiento y de la esporulación, factores que no pueden uniformarse aquí.

ENZIMAS DEL MICELIO DEL A. ORIZAE

De las cepas de A. Orizae seleccionadas por su poder amiloclástico se eligieron cuatro (nos. 23, 24, 61 y 74) y se sembraron sobre 500 gramos de medio de cultivo de afrecho de acuerdo a la técnica industrial (ver capítulo correspondiente).

A las 24 horas, cuando el micelio había invadido uniformemente la superficie sin llegar aún a la esporulación, se extrajo toda la capa superior, determinándose sobre una parte la humedad y destinándose el resto a la siguiente serie de ensayos; que se efectuaron con cada una de las cuatro cepas.

Se pesan 16 porciones de 1 gramo de afrecho emmohecido, se colocan en erlenmeyers de 125 cc. y se separan estos en dos grupos de ocho. Al primer grupo se le agrega 20 cc. de solución de diferentes sustratos, de acuerdo a la enzima ensayada.

Se hace lo mismo con el segundo grupo y se lleva a ebullición 2 minutos.

Se agrega a todos los erlenmeyers 0,2 cc. de tolueno como conservador y se incuban 24 horas a 37°C.

Al cabo de este tiempo se agrega a cada erlenmeyer de ambas series el reactivo adecuado para el sustrato que contiene, para determinar los productos de descomposición resultantes de la acción enzimática sobre dicho sustrato.

Previamente se lleva a pH -7 por agregado de  $\text{OHNa}$ . N/

Damos a continuación un cuadro de los resultados obtenidos:

////

<u>Enzima</u> <u>ensayada</u>	<u>Sustrato</u>	<u>Reactivo</u>	<u>Resultado</u>
Amilasa	Almidón al 2%	Agua de iodo	Fuertemente <b>positivo</b>
Amilasa	Almidón al 2%	Reactivo de Feh- ling	" "
Invertasa	Sacarosa al 10%	" " "	" "
Maltasa	Maltosa al 2%	" " "	Debilmente "
Lactasa	Lactosa al 10%	" " "	" "
Glucosidasa	Amigdalina al 2%	Willstatter- Waldschmidt-Leitz	" "
Peptidasa	Peptona al 2%	Método de Sørensen	" "

Los ensayos sobre los erlenmeyers que habían sido previamente sometidos a ebullición dieron resultados negativos.

#### Conclusiones:

1°- En cuatro cepas de *A. Orizae* cultivadas sobre afrecho y emmohecidas, pero sin esporular, se comprobó la presencia de: amilasas, invertasa, maltasa, lactasa, glucosidasa, proteinasa y peptidasa.

2°- Las cuatro cepas ensayadas dieron resultados similares.

3°- Las enzimas hidrolizantes de hidratos de carbono fueron las predominantes.

4°- Los mismos ensayos se hicieron sobre cultivos en afrecho bien esporulados, con iguales resultados.

Comprobación de enzimas amilolíticas en exudados de cultivos en medio de Raulin.

La aparición de gotitas exudadas de cultivos viejos en medio de Raulin nos llevó a ensayar la presencia de enzimas amilolíticas en los mismos.

Se usó el micrométodo de Sastri y Sreenivasaya de acuerdo a la siguiente técnica:

Se extrae por capilaridad con una pipeta Pasteur el líquido contenido en una gotita de exudado (alrededor de 0,05 cc.) y se lleva a un vidrio de reloj. Se añade 0,1 cc. de solución de almidón al 1% preparado según la técnica habitual y a pH=5,4 y se coloca dentro de una caja de Petri que contiene un poco de agua. Se lleva media hora a estufa a 37°. Al cabo de ese tiempo se añade 0,1 cc. de solución 0,01 N de iodo.

Se hizo una serie de ensayos empleando simultáneamente:

- a) Líquido de exudado
- b) Agua destilada
- c) Líquido de Raulin sobre el que creció la cepa
- d) Líquido de exudado calentado a 90° C.

Las cuatro cepas probadas dieron los siguientes resultados:

- a) n° 23: Reacción de iodo negativa
- n° 24: Reacción de iodo negativa
- n° 61: Reacción de iodo de color rojizo claro.
- n° 74: Reacción de iodo negativa
- b) Reacción positiva. Color azul con el iodo
- c) Reacción positiva. " " " " "
- d) Reacción positiva. " " " " "

Conclusiones:

Se ha comprobado la presencia de amilasas en las gotitas de líquido exudado que aparecen en la superficie de colonias viejas de *A. Orizae* en medios líquidos.

La concentración de esta enzima en las gotitas es mucho mayor que en el medio de cultivo.

Se puede considerar este resultado como una prueba de la existencia de exoamilasas en el *A. Orizae*.

---

CAPITULO 3º

CONDICIONES DE OPTIMA PRODUCCION Y ACTIVIDAD ENZIMATICA

## CONDICIONES DE OPTIMA PRODUCCION Y ACTIVIDAD ENZIMATICA

El planteamiento de este capítulo, considerado en general, no tiene límites. En nuestro trabajo hemos eliminado aquellos controles que no estuvieran directamente ligados a un aumento o disminución de la cantidad de enzimas producidas, a las condiciones de máxima actividad de las mismas y a determinar los límites dentro de los cuales el manipuleo de los cultivos no ofreciera riesgos de disminuir su utilidad industrial.

Hemos dividido este capítulo en dos partes. La primera que se refiere a las condiciones de óptima producción de enzimas, y la segunda a las de óptima actividad, encarada desde el punto de vista de su utilidad práctica.

### CONDICIONES DE OPTIMA PRODUCCION DE ENZIMAS

Podemos clasificar los controles efectuados de la siguiente manera:

- a) Destinados a encontrar los alimentos (cantidad y calidad) más favorables para el trabajo del hongo: humedad, proporción de carbohidratos, medios naturales más económicos y sales minerales.
- b) Factores ambientales: temperatura, pH y tiempo de cultivo.
- c) Factores adversos: esterilización, antisépticos, toxicidad de los metales de los recipientes, pérdida de actividad durante el trabajo.
- d) Controles de tipo industrial, a fin de establecer las condiciones más económicas de elaboración, manipuleo y conservación del producto comercial elaborado.

//////

Todos ellos estuvieron destinados a y organizados para obtener la máxima producción de enzimas amilolíticas, simplificar el proceso industrial y llevar al mínimo el costo del producto obtenido.

a) Controles sobre alimentos del A. Orizae

Las exigencias alimenticias del A. Orizae respecto de las fuentes de carbono y nitrógeno son mínimas. Se conocen cientos de sustancias que son capaces de utilizar los aspergillus (106). Era inútil, por lo tanto, iniciar estudios sistemáticos sobre este problema.

Quedaba solamente por controlar la posible influencia de la cantidad de algunas sustancias en la producción de la enzima. Esto tenía sobre todo interés en los cultivos industriales, debiéndose llegar al que tuviera el rendimiento más económico.

Parte experimental

Se hicieron cuatro series de ensayos:

- 1°- Con diversos productos naturales, para elegir el más económico.
- 2°- Con afrecho mezclado con porcentajes variables de almidón.
- 3°- Con afrecho mezclado con cantidades variables de sales minerales.
- 4°- Con afrecho mezclado con cantidades variables de agua.

1er ensayo. Productos naturales

Se probaron los siguientes materiales: trigo, maíz, harina de maíz, avena, cebada, centeno, harina de trigo, afrecho, semitín, rebacillo, torta de girasol.

En todos los casos se tomaron 5 gramos de medio sólido en un erlenmeyer de 125 cc. se agregaron a 5 cc. de HCl 0,3 N y se esterilizaron

////



a 1 y 1/2 atmósfera en autoclave durante media hora. Cada erlenmeyer se inoculó con 1 cc. de suspensión de esporas de cultivos de *A. Orizae* bien esporulados y se llevaron a estufa a 37° C.

Se anotó el tiempo de desarrollo y esporulación de los cultivos y se midió la actividad amilolítica con el Wohlgemuth sobre el macerado obtenido con 50 cc. de agua destilada para cada erlenmeyer, mezclando bien y dejando 24 horas a temperatura ambiente. Para prevenir putrefacciones se empleó 1 cc. de tolueno.

Cuando se hacían ensayos comparativos en un mismo medio se usó la misma técnica de maceración, pero dejando solamente 1 hora en estufa a 37° con repetida agitación.

### Conclusiones

1°- La velocidad de crecimiento y esporulación alcanzó a 2 días en el afrecho. Todos los otros materiales exigían un tiempo mucho más largo.

2°- La actividad enzimática de los preparados por unidad de peso del medio de cultivo resultó del orden de 10 a 20 gramos de almidón hidrolizado por gramo de cultivo para el afrecho, siendo para los cereales de 5 a 10 gramos por gramo de cultivo.

### Observaciones

Expresamos la velocidad de crecimiento en función del tiempo que necesita el hongo para invadir completamente el medio de cultivo, y la velocidad de esporulación en función del tiempo que tarda en esporular en toda la superficie de cultivo.

El crecimiento y la esporulación rápida en el afrecho es una consecuencia de la enorme superficie de las cáscaras que lo componen, las que se encurvan durante la esterilización manteniéndose separadas

entre sí y permitiendo de esta manera el desarrollo de la mata de micelio en toda la masa.

En granos de cereales se forma una colonia en cada grano y se va destruyendo el interior durante el crecimiento del hongo, resultando un cultivo de desarrollo más lento, menos uniforme, pero más compacto.

En los otros materiales probados el crecimiento era muy lento cuando carecían de almidones, por lo cual no nos pareció conveniente estudiarlos en forma especial procurando completar su composición.

### 2° ensayo. Acción de carbohidratos.

Elegido el afrecho en base a su menor costo y a la mayor velocidad de crecimiento del hongo con relación a los otros materiales, se realizaron análisis del afrecho para su contenido en almidón resultando el promedio de 11% expresado en glucosa, según el método del A.O.A.C. Se hizo luego una serie de ensayos mezclándolo con cantidades variables de almidón con los siguientes resultados:

<u>Número</u>	<u>5 gr, afrecho más: (1)</u>	<u>Crecimiento del hongo</u>	<u>Esporula cion</u>	<u>Poder ami- lolítico (2)</u>
1	-	normal	normal	10,54
2	1 gr. de almidón	normal	normal	9,12
3	2 " " "	normal	más lenta	8,05
4	3 " " "	normal	más lenta	6,90
5	4 " " "	normal	más lenta	6,12
6	10 " " "	normal	más lenta	3,84

(1) En todos los casos se completó el medio de cultivo agregando 5 cc. de HCl 0,3 N.-

////

(2) El poder amilolítico se expresa en gramos de almidón hidrolizados por gramo de cultivo inicial.

En la titulación del poder amilolítico se usó el método de Lintner, a pH 5,4.

### Conclusiones

La cantidad de enzima no aumenta por el agregado de almidón al afrecho.

El afrecho es un medio económico de cultivo. Tiene ventaja sobre los otros materiales probados en que produce una masa homogéneamente emmohecida en el menor tiempo. La actividad enzimática del afrecho emmohecido, expresada en gramos de almidón hidrolizados en 30 minutos a 37° y a pH 5,4, por gramos de afrecho, es mayor que el resultante de los otros medios de cultivo.

No resultan ventajas particulares de la adición de almidón al afrecho conservándose sensiblemente igual al poder amilolítico del material.

-.-

Para aclarar los resultados obtenidos en el ensayo anterior se efectuaron una serie de controles destinados a establecer la disminución del almidón agregado, en función del crecimiento del hongo.

Se preparó medio de Raulin, se dividió en cinco partes, agregando a cada una de ellas 0,5 %, 1%, 2%, 3%, y 4% de almidón soluble. Se preparó un testigo con medio de Raulin puro.

Se distribuyeron en erlenmeyers de 250 cc. con 40 cc. de medio de cultivo. Se esterilizaron a autoclave a 1 atm. durante 10 minutos. Se probó luego la existencia de almidón en 1 cc. del medio de cultivo, con 0,5 ml. de iodo N/100, comparando con iguales concentraciones de almidón sin esterilizar. Los ensayos revelaron solo una ligera hidrólisis del almidón.

////

Se sembraron los erlemmeyers con la cepa n° 24 y se incubaron a 37°. Al cabo de 2 días las colonias invadieron toda la superficie del medio de cultivo.

Se probó la presencia de almidón extrayendo con pipeta esteril 1 cc. de solución de cada erlemmeyer y agregando 1 cc. de solución de iodo N/ 100. La reacción positiva (aparición de color azul) probaba la presencia de almidón.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tiempo de cultivo: <u>% de almidón</u>	2 días	4 días	6 días	8 días	10 días	12 días
0,5	+	-	-	-	-	-
1,0	+	+	-	-	-	-
2,0	+	+	-	-	-	-
3,0	+	+	+	+	-	-
4,0	+	+	+	+	+	-

### Conclusiones

En todos los casos se comprobó presencia de almidón al llegar el cultivo a la esporulación.

El almidón va desapareciendo después de la esporulación del cultivo, y en el orden de sus concentraciones crecientes.

Parece desprenderse de lo anterior que el hongo, después de esporulado, continúa destruyendo el almidón por medio de sus enzimas amilolíticas.

Es inútil entonces pretender aumentar el rendimiento en enzimas amilolíticas aumentando la concentración del sustrato sobre el que actúan.

3er. ensayo. Influencia de las sales minerales

El control de la influencia de las sales minerales sobre la producción de enzimas tiene un significado distinto al de la que podría ejercer el almidón.

En efecto, las sales minerales intervienen seguramente en los mecanismos reguladores de las enzimas (activadores e inhibidores). Se conoce su acción sobre la amilasa pancreática y podrían intervenir en la producción de las amilasas del *A. Orizae*.

Parte experimental

Se hicieron varios análisis de las sustancias minerales contenidas en el afrecho, con los siguientes resultados:

<u>Componentes</u>	<u>Datos promedios sobre base seca</u>
P .....	1,00 %
K .....	0,58 "
Na .....	0,02 "
Mg .....	0,01 "
Fe .....	0,005 "
Zn .....	0,04 "
Ca .....	0,18 "
Cenizas totales .....	6,96 "
Cu y Al .....	menos de 0,002 %

Los métodos de análisis empleados son los indicados en el A.O.A.C. edición 1940, y algunos colorimétricos de "Organic Reagent in inorganic analysis" de Prodinger.

Estos resultados indican la existencia de suficiente proporción de

////

los componentes minerales fundamentales, y se confirmaron en los ensayos de crecimiento realizados en erlemmeyer para probar si se encontraban en forma aprovechable por el hongo.

Se realizaron ensayos agregando al afrecho comercial cantidades variables de  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ ,  $\text{PO}_4\text{K}_2$ ,  $\text{NO}_3\text{N}$ ,  $\text{ClK}$ , sin que se observaran modificaciones en el rendimiento económico de las enzimas amilolíticas del *A. Orizae*.

### Conclusiones

La composición química de los afrechos comerciales del país los hace convenientes por su riqueza en sales minerales como medio de cultivo para el *A. Orizae*.

En ninguna de las cepas probadas se logró acelerar la velocidad de crecimiento con la modificación de la composición del afrecho. En algunas se produjo un retraso en el crecimiento y una disminución en su poder enzimático.

### 4° ensayo. Acción del agua.

A fin de establecer los límites de concentración de agua en el afrecho más convenientes para usarlo como medio de cultivo se hizo lo siguiente:

En un vaso de precipitados de 1000 cc. se mezclaron íntimamente 50 gramos de afrecho (expresado en base seca) y 50 cc. de  $\text{HCl}$  0,3 N. Se dividió en 20 partes de 5 gramos de mezcla cada una y se pasó a erlemmeyers que se esterilizaron con la técnica habitual. Se dividieron en cuatro grupos de cinco erlemmeyers y se agregaron cantidades crecientes de agua esteril a cada grupo, sacando luego una muestra para determinar la humedad. Se sembraron con cuatro cepas carac-

terizadas por su rápido crecimiento. (Nº 23, 24, 61 y 74). Los resultados fueron similares para las cuatro cepas y se expresan a continuación:

<u>HUMEDAD</u>	20,5%	41,6%	50%	62,8%	65,3%	70,1%
CULTIVO...no crece	crece lentam.	crece bien	crece bien	crece lento	crece lento	crece lento

### Conclusiones

El óptimo de humedad está comprendido entre 50 y 60 % de agua.

-.-

### b) Controles sobre factores ambientales

Se realizaron ensayos para fijar la influencia de la temperatura, el pH y el tiempo de cultivo en el crecimiento del hongo y en la máxima producción de enzimas.

#### 1º- Control de la temperatura

Se realizó este control con el objeto de determinar la temperatura óptima de crecimiento rápido compatible con una buena producción de enzimas, a fin de emplear dicha temperatura en los cultivos en escala industrial.

El problema se simplificó en la práctica debido a que se comprobó que el momento de la esporulación es el que marca la máxima concentración de enzimas amilolíticas. Se buscó entonces establecer las condiciones que provocan<sup>nan</sup> la esporulación del modo más rápido y completo.

Se estudió la influencia de la temperatura en dos medios de cultivo sólidos, agar de Czapek y afrecho humedecido, por ser el prime-

//////

ro utilizado en el aislamiento y conservación de las cepas y el segundo en los cultivos con vistas a la producción de enzimas, no solo en condiciones de laboratorio sino también en escala semi industrial.

a) Ensayos con medio de agar de Czapek

Para la observación comparativa de la conducta de las distintas cepas ensayadas se definieron las variables de la siguiente manera: Velocidad de crecimiento: abarca el tiempo necesario para que las colonias alcancen más de medio centímetro de diámetro.

Iniciación de la esporulación: es el momento en que comienza a observarse a simple vista la aparición de la coloración típica de las esporas en alguna zona de la colonia.

Fin de la esporulación: es el momento en que la coloración típica de las esporas ha cubierto totalmente la superficie de la colonia.

Reacción del ácido kójico: se realiza agregando directamente sobre un punto de la colonia una gota de solución al 10% de cloruro férrico. La aparición de color rojo intenso indica la existencia de ácido kójico. Se establece una escala comparativa, señalando con el color más intenso y de más rápida aparición. Con (+) (+ -) y (-) a los que le siguen en sentido decreciente, siendo el primero menos intenso, el segundo dudoso y el tercero negativo. ( Ver Cap. 1 , sobre ácido kójico).

Parte experimental

Se probaron las cepas del método N° 7, que resultaron positivas con + + y + .- Se sembraron en cajas de Petri con medio de agar de Czapek, y se incubaron a distintas temperaturas (20°, 30° , 35° , y 37°), controlando la velocidad de crecimiento y la iniciación y

////



omnino iō.

to

Cepa N°	20°	25°	30°	35°	37°	Observaciones
Crecim. Esporul. Fin "	lento 4° día 5° "	lento 4° día 5° "	más ráp. 3° día 4° "	más ráp. 2° a 3° 4° a 5°	rápido 1° a 2° 3° día	piña cabeza (a)
Crecim. Esporul. Fin "	lento 4° día 6° día	-lento 4° día 5° día	rápido 3° a 4° 4° día	rápido 2° a 3° 4° día	rápido 2° a 3° 4° día	Mat. fecal amarillo Kójico +
C. E. F. de E.	lento 4° día 4° a 6°	-lento 4° día 4° a 5°	rápido 3° día 3° a 4°	rápido 2° a 3° 3° a 4°	rápido 2° a 3° 3° día	N°2856. Olor desagr. Espor. amarillo verd.
C. E. F. de E.	lento 4° día 4° a 5°	lento 4° día 4° a 5°	rápido 3° día 3° a 4°	rápido 3° día 3° a 4°	rápido 2° a 3° 3° día	piña Kójico + intenso en 6 días
C. E. F. de E.	lento 4° día 4° a 5°	lento 4° día 4° a 5°	rápido 2° a 3° 3° a 4°	rápido 2° día 3° a 4°	rápido 2° día 3° día	Kójico + en 2 días. Conid. lisos. Cabe- zas (h)
C. E. F. de E.	lento 4° día 6° día	-lento 4° día 5° día	rápido 3° a 4° 4° día	rápido 2° a 3° 4° día	rápido 2° a 3° 4° día	avena cabeza (b)
C. E. F. de E.	lento 4° día 4° a 5°	lento 4° día 4° a 5°	lento 3° a 4° 4° día	rápido 3° día 3° a 4°	rápido 2° a 3° 3° a 4°	avena Kójico int. Esclerotos.
C. E. F. de E.	lento 4° día 4° a 5°	lento 4° día 4° a 5°	lento 3° a 4° 4° día	rápido 3° día 3° a 4°	rápido 3° día 3° día	Piña 14 Kójico inten- so en 4 días
C. E. F. de E.	lento 4° día 4° a 5°	rápido 3° día 4° día	rápido 3° día 4° día	-rápido 3° a 4° 4° día	-rápido 3° a 4° 4° día	U.S.A. Ing. Soriano. 11.8 Kojico -
C. E. F. de E.	lento 4° día 4° a 5°	lento 4° día 4° a 5°	rápido 2° a 3° 3° día	rápido 2° a 3° 3° día	rápido 2° día 3° día	Avena 19 Czapek AF Kójico + en 16 días
C. E. F. de E.	lento 3° a 4° 4° a 5°	lento 3° a 4° 4° a 5°	lento 3° a 4° 4° a 5°	rápido 3° día 3° día	rápido 2° a 3° 3° día	Girasol Czapek AF Kójico +
C. E. F. de E.	lento 3° a 4° 4° día	lento 3° a 4° 4° día	rápido 3° día 3° a 4°	rápido 3° día 3° a 4°	rápido 2° a 3° 3° día	Trigo Kójico int. en 4 días
C. E. F. de E.	lento 4° día 4° a 5°	lento 4° día 4° día	rápido 3° a 4° 4° día	rápido 3° día 3° a 4°	rápido 3° día 3° a 4°	Arroz Kójico +

### Conclusiones

- 1°- Se ha controlado los límites óptimos de temperatura para un crecimiento veloz y una esporulación abundante de 15 a 30 cepas de A.O. recogidas de muy diferentes fuentes y cultivadas en medios de Czapek con y sin antisépticos.
- 2°- Los resultados fueron muy uniformes, las diferencias de coloración de los cultivos esporulados, variando del amarillo carnario hasta un verde hoja o marrón más o menos oscuro, no correspondiendo a diferencias notables en el comportamiento respecto de los factores analizados.
- 3°- En medio de agar- Czapek la temperatura óptima de incubación resultó comprendida entre 35° y 37° . A 30° comienza a disminuir la velocidad de crecimiento, haciéndose cada vez menor a medida que disminuye la temperatura. a 40° el crecimiento resultaba irregular para una misma cepa, acelerándose unas veces y retrasándose otras.

#### b) Ensayos con afrecho

Se preparó el medio de cultivo en la forma habitual, con igual cantidad de HCl 0,3 N. Se distribuyó en erlenmeyers de 125 cc. a razón de 4 gramos de la mezcla en cada uno. En otra serie de ensayos se usaron erlenmeyers de 500 cc. con 20 gramos de mezcla. Se incubaron a las temperaturas del ensayo anterior, resultando algo acelerada la velocidad de crecimiento y de esporulación, seguramente como consecuencia de la mayor superficie del medio de cultivo.

Una serie de resultados se consignan en el cuadro siguiente:

Cepa N°	20°	25°	30°	35°	37°
7 C. E. F.de E.	lento 3-4° días 4 "	lento 3-4° días 4 "	rápido 3° días 3-4° "	rápido 2-3° días 3-4° "	rápido 1-3° días 3° "
8 C. E. F.de E.	lento 3-4 días 4-5° "	lento 3-4° días 4-5° "	rápido 3° días 4° "	rápido 2-3° días 3-4° "	rápido 2-3° días 3-4° "
9 C. E. F.de E.	lento 3-4° días 4 "	lento 3° días 3-4° "	rápido 2-3° días 3-4° "	rápido 2-3° días 3° "	rápido 2-3° días 3° "
10 C. E. F.de E.	lento 3-4 días 4-5° días	lento 3-4° días 4° "	rápido 3° días 4° "	rápido 3° días 3° "	rápido 2-3° días 3° "
11 C. E. F. de E.	lento 3-4° días 4° "	lento 3-4° días 4° "	rápido 3° días 3-4° "	rápido 2-3° días 3° "	rápido 2-3° días 3° "
12 C. E. F.de E.	lento 3-4° días 4-5° "	lento 3-4° días 4-5° "	rápido 3° días 4° "	rápido 3° días 3-4° "	rápido 3° días 3-4° "
13 C. E. F.de E.	lento 3-4° días 4° "	lento 3-4° días 4° "	rápido 3° días 3-4° "	rápido 3° días 4° "	rápido 2-3° días 4° "
14 C. E. F.de E.	lento 3-4° días 4° "	lento 3-4° días 4° "	rápido 3° días 3-4° "	rápido 2-3° días 3° "	rápido 2-3° días 3° "
15 C. E. F.de E.	lento 3-4° días 4-5° "	rápido 3-4° días 4-5° "	rápido 3° días 4° "	rápido 3° días 3-4° "	rápido 3° días 3-4° "
16 C. E. F. de E.	lento 3-4° días 4° "	lento 3-4° días 4° "	rápido 2-3° días 3-4° "	rápido 2-3° días 3-4° "	rápido 2° días 3° "
17 C. E. F.de E.	lento 3-4° días 4° "	lento 3-4° días 4° "	rápido 3° días 3-4° "	rápido 2-3° días 3-4° "	rápido 2-3° días 3-4° "
18 C. E. F. de E.	lento 3-4° días 4° "	lento 3-4° días 4° "	rápido 3° días 3-4° "	rápido 2-3° días 3° "	rápido 2-3° días 3-4° "
19 C. E. F.de E.	lento 3-4° días 4-5° "	lento 3-4° días 4° "	rápido 3° días 3-4° "	rápido 3° días 3-4° "	rápido 2-3° días 3° "

## Conclusiones

1°- El cultivo con afrecho, realizado en escala de laboratorio, tiene su óptimo entre 30° y 37°, resultando acelerado respecto del cultivo en agar-Czapek, a causa de su mayor superficie.

2°- No hay ventaja en trabajar por encima de 37°, debido al desecamiento rápido del cultivo que detiene su evolución y a la inseguridad de los resultados obtenidos en las condiciones ensayadas.

### 2° - Variaciones de pH

El estudio de la variación del pH del medio de cultivo (afrecho más HCl 0,3 N), durante el crecimiento del hongo tenía interés para la conducción de los cultivos en escala industrial, fundamentalmente en lo que se refiere a la posibilidad de evitar o disminuir el peligro de infecciones por un adecuado control del pH. Interesaba establecer en primer lugar el límite de pH compatible con el crecimiento del *A. Orizae*, y en segundo lugar la variación del mismo durante el desarrollo de los cultivos.

#### a) Variación del pH durante el desarrollo

La técnica seguida fué la siguiente:

Se mezclaron perfectamente 100 gramos de afrecho y 100 cc. de HCl 0,3 N. Se pasaron 10 gramos de la mezcla a cada erlenmeyer de 250 cc., obteniendo así 20 erlenmeyers.

Se tituló la acidez de este medio de cultivo tal cual, luego de esterilizado, durante el enmohecimiento, durante la esporulación y después de esporulado.

Para la titulación directa por acidimetría se procedió así:

Se agregaron 50 cc. de agua destilada y se dejó a 37° durante 30 minutos, después de mezclar bien. Se filtró entonces al vacío y se lavó

////

cuatro veces con 10 cc. de agua destilada cada vez. Se pasó el filtrado a una matraz aforado de 100 cc. y se enrasó. Se tomaron 25 cc., se agregaron 25 cc. de agua destilada y 5 gotas de fenolftaleína y se tituló con OHNa N/10 hasta primera aparición de color rosado.

Tituladas las muestras por duplicado dieron los siguientes resultados:

Días	Muestra	ml. de OHNa N/10 consumidos por 100 gramos de material
0	Testigo	188 ml.
0	Esterilizado	172
1	Enmohecido	176
3	Comienzo espor.	140
4	Esporulación	50
5	Fin esporul.	40
13	Espor. viejo	44
21	Espor. viejo	46
21	Testigo	184

Se comprueba una disminución evidente de la acidez durante la esporulación del cultivo.

#### b) Límite de pH

Para determinar el límite de pH compatible con el desarrollo del hongo se preparó una mezcla de partes iguales de afrecho y de solución de HCl 0,1N, 0,3N, 0,4 N y 0,5 N.

Estas mezclas se repartieron en 4 series de 6 erlemmeyers cada una, y se efectuaron las mismas determinaciones que en el caso anterior, con los siguientes resultados:

Días	Muestra	HCl			
		0,1 N	0,3 N	0,4 N	0,5 N
0	Testigo	112	167	199	248 (1)
1	Enmohecido	112	170	203	-
2	Comienzo Esporulación	100	115	182	-
4	Fin Esporulación	36	56	75	-
8	Esporulados viejos	34	53	79	-
8	Testigo	108	164	204	243

(1) No creció.

Los números indicados en el cuadro son ml. de OHNa N/10 consumidos por 100 gramos de material.

La mezcla afrecho más HCl 0,5 N fué sembrada tres veces consecutivas sin lograr el desarrollo del hongo.

Se prepararon entonces nuevas mezclas de afrecho con HCl 0,4 N y 0,5 N controlando el pH con papel colorimétrico Eastman Kodak.

La mezcla con HCl 0,4 N dió un pH de 2,6, mientras que la realizada con HCl 0,5 N dió un pH de 1,8.-

La diferencia entre el pH obtenido por este medio y el determinado por acidimetría demuestra la presencia de buffers en el afrecho.

### Conclusiones

1° - La esporulación produce una evidente disminución de la acidez total.

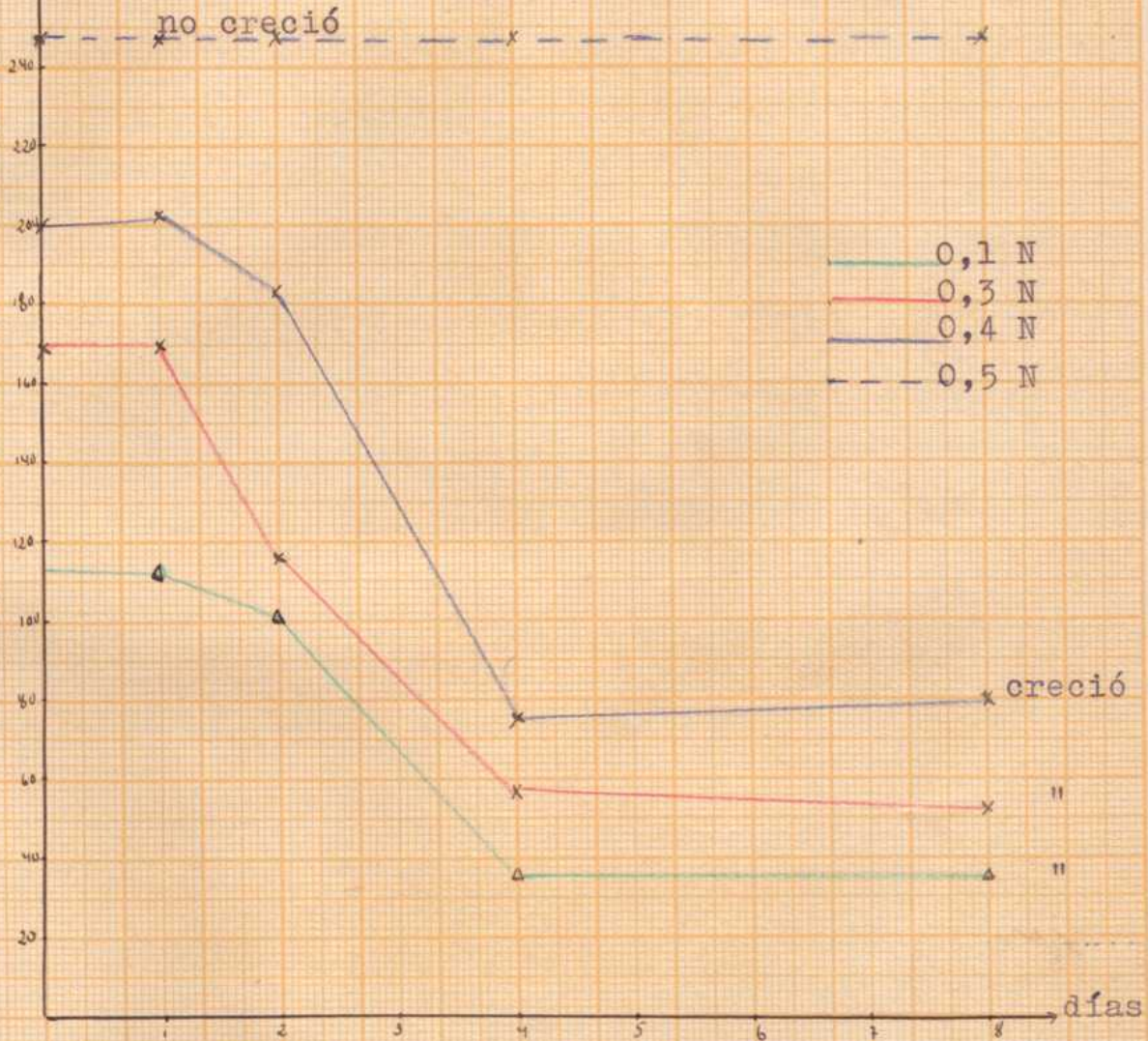
2° - Hay un pH límite para el desarrollo del hongo en medio de afrecho. Se encuentra entre pH - 2,6 y pH- 1,8.

3°- Para el tipo de afrecho comercial empleado, el hongo se desarrolla sobre mezclas con HCl 0,4 N. pero no lo hace sobre mezclas con HCl 0,5 N.



# Variación de la acidez en función del tiempo

ml NaOH N/10  
por 100 gr



Superf. vieja 3° viol. - 4° azul 4° viol. - 5° azul  
 " " " 3° viol. - 4° azul 4° viol. - 5° azul



c) Control del tiempo

Se estudió la influencia del tiempo del cultivo sobre la producción de enzimas, tratando de determinar el momento más propicio para la extracción de las mismas y de comprobar si se destruían posteriormente.

Parte experimental

Se sembraron con cepa N° 24 erlemmeyers conteniendo mezcla de partes iguales de afrecho y HCl 0,3 N. Se incubaron dos series paralelas y se determinó la actividad enzimática sobre macerados de cultivos durante el enmohecimiento, la esporulación y el desecamiento de los mismos.

Cada erlemmeyer contenía 4 gramos de mezcla y la maceración se efectuaba por agregado de 40 cc. de agua destilada, se mezclaba bien y se dejaba a 37° durante una hora.

La actividad amilolítica se probó por el método de Wohlgemuth modificado, según la técnica habitual.

En tres ensayos consecutivos y por duplicado se hallaron los siguientes resultados:

<u>Días</u>	<u>Muestra</u>	<u>Almidón soluble</u>	<u>Almidón de papas</u>
1	Enmohecido	2°rojo - 3°azul	1°rojo- 2°azul
2	Com.Esporul.	2°inc. - 3°azul	1°inc.- 2°azul
3	Esporulado	3°rojo - 4°azul	2°inc.- 4°azul
4	Fin esporul.	3°claro- 4°azul	4°viol.-5°azul
6	Esporl.viejo	3°viol.- 4°azul	4°viol.-5°azul
8	" "	3°viol.- 4°azul	4°viol.-5°azul

/////

Conclusiones

El poder amiloclástico aumenta durante el crecimiento del hongo llegando a un máximo al final de la esporulación y manteniéndose aproximadamente constante desde entonces, aún sobre cultivos que se desecan en estufa a 37°.

El gráfico siguiente expresa los resultados obtenidos:

Actividad enzimática en función del tiempo de cultivo

ler tubo azul



r el  
nuyen-

do de

de

ontiene  
ermenta-

lentando

los en-  
e sembra-

primer lu-  
amente a-  
resentan

vapor re-

minutos

c) - Esterilizar en autoclave a 121°C / 15 minutos  
las mezclas de partes iguales de afrecho y HCl 0,3 N.

////

c) Factores adversos

En esta parte hemos incluido los factores que pueden complicar el proceso de producción de enzimas o dificultarlo seriamente, disminuyendo la actividad de los cultivos obtenidos.

1°- Control de la esterilización

Se efectuó este control buscando la simplificación del método de preparación de afrecho emmohecido.

Se ensayaron los siguientes procedimientos:

a) - Emplear afrecho tal cual adicionado de suficiente cantidad de

HCl 0,4 N para tener 50% de humedad y un pH próximo a 3.

El cultivo desarrolló simultáneamente los microorganismos que contiene naturalmente y las esporas sembradas por nosotros. Se produce fermentación alcohólica en algunos casos.

Resultó por lo tanto inadecuado.

b) - Emplear afrecho mezclado con igual pesos de HCl 0,3 N, calentando después con vapor a 100° .

Este método regularizó el emmohecimiento y previno en el 80% de los ensayos cualquier otro desarrollo que no fuera el de los *A. Orizae* sembrados.

Presentó dos inconvenientes en el trabajo de laboratorio: en primer lugar no presenta ninguna economía respecto del método definitivamente adoptado, y en segundo lugar los cultivos que se inutilizan representan un porcentaje elevado.

Se comprobó que solo después de 45 minutos de tratamiento con vapor resultaba bien esterilizado el medio de cultivo.

c) - Esterilizar en autoclave a 1 y 1/2 atmósfera durante 30 minutos las mezclas de partes iguales de afrecho y HCl 0,3 N.

//////

En estas condiciones quedaron eliminados los microorganismos contenidos en el afrecho.

Las esterilizaciones realizadas a 1 y 1/2 atmósfera durante 15 minutos resultaron satisfactorias en el 95% de los casos.

### Conclusiones

Se comprobó la necesidad de esterilizar a 1 y 1/2 atmósfera durante 30 minutos para eliminar las contaminaciones.

Los géneros más comúnmente hallados como contaminaciones fueron: penicillium, mucor y aspergillus de otras especies (sobre todo A. Niger)

### 2°- Repiques del cultivo.

El objeto de este control era comprobar la variación o permanencia del poder enzimático a través de una serie de repiques, a fin de tener la seguridad de que los controles efectuados sobre cepas reiteradamente repicadas eran comparables.

Se tomaron 10 cepas y se sembraron en agar de mosto de malta y en agar Czapek. Se llevaron a estufa a 37° y una vez esporulados los cultivos se hicieron dos series de ensayos:

- a) Se repicaron sobre los dos medios citados, y cada repique se pasó a erlemmeyer con afrecho preparado según la técnica habitual. Se llevaron todos a 37° de temperatura, y sobre el cultivo crecido en erlemmeyer se determinó cada vez el poder amilolítico por el método de Lintner. De esta manera se efectuaron 10 repiques consecutivos.
- b) Se repicaron los cultivos en agar-Czapek a afrecho y se continuaron repicando sobre afrecho, determinando cada vez el poder amilolítico sobre cultivos paralelos en afrecho de las cepas sucesivamente repicadas. Se efectuaron así 20 repiques en cuatro meses. Sobre los cultivos paralelos se determinó el poder amilolítico por el método de Lintner modificado.

////



Resultados y conclusiones

1° - Los sucesivos repiques sobre agar mosto de malta y sobre agar-Czapek no disminuyen el poder amilolítico de los cultivos.

2° - Lo mismo ocurre con los repiques sucesivos sobre afrecho.

3° - Cuando los cultivos <sup>a</sup> repicar se habían dejado envejecer, disminuía la velocidad de crecimiento de las nuevas siembras. Bastaron en todos los casos de 2 a 3 repiques de cultivos frescos para que recuperaran su velocidad de crecimiento.

3° - Toxicidad de los metales

Con el fin de controlar la influencia sobre el crecimiento del hongo, de los metales de los recipientes con los que se trabajaría, se hicieron ensayos de cultivos en afrecho con recipientes de distinta naturaleza.

Se suprimieron los ensayos con medio de cultivo líquido y con adición de sales de metales tóxicos por no ser de interés especial para los fines de nuestro trabajo.

Se usaron cacerolas de fundición, de hierro enlozado, de cobre, de latón, de hojalata y de aluminio.

En todas ellas el cultivo se desarrolló normalmente.

Conclusiones

Se pueden usar recipientes de cualquiera de los materiales ensayados, por cuanto ninguno resultó nocivo para el desarrollo de las colonias de *A. Orizae*.

4° - Acción de antisépticos

El control de la acción de los antisépticos tenía por objeto tra-

////

tar de evitar la esterilización del medio de cultivo.

Las contaminaciones más comunes halladas en los afrechos no esterilizados fueron: levaduras, que provocaban fermentación alcohólica; bacterias, que producían putrefacciones cuando había exceso de humedad; y mohos distintos al *A. Orizaë* (*penicillum*, mucos y otros *Aspergillus*) que competían con aquel en la invasión del medio de cultivo.

La importancia del ensayo estriba en las ventajas que presentaría industrialmente un medio resistente a las contaminaciones y que permitiera por acostumbramiento el desarrollo de una cepa particular.

Se probó el acostumbramiento de las cepas de *A. Orizaë* a una serie de antisépticos: fenol, ácido bânzoico, ácido salicílico y formol.

#### Parte experimental

Se preparó medio de Czapek con y sin agar y se esterilizó con la técnica habitual. A partes alícuotas del mismo se añadió la cantidad de antiséptico calculada y estando aún caliente se repartió en tubos, haciendo todas estas operaciones en condiciones de asepsia.

Las concentraciones empleadas fueron:

Fenol:	1:1000
	1:2000
Formol:	1:2500
	1:5000
Acido benzoico:	1: 300
	1: 600
Ac. salicílico:	1: 300
	1: 600

Se sembraron 7 cepas seleccionadas en medio líquido y en agar extraí con los siguientes resultados:

Cepa N°	Czapek líquido	Agar de Czapek con					
		Fenol 1:1000	Fenol 1:2000	Formol	Ac.benz.	Ac.salic.	
24	No crece	Crece muy lento	Crece lento	No crece	No crece	No crece	
25	" "	"	"	"	"	"	
36	" "	"	"	"	"	"	
61	" "	"	"	"	"	"	
74	" "	"	"	"	"	"	
A.Niger	" "	"	"	"	"	"	
Mucor	" "	"	"	"	"	"	

Se observa que el comportamiento de distintas cepas de A.Orizae y de dos cepas diferentes al A.O. tuvieron un comportamiento similar.

Habia la posibilidad de obtener el acostumbramiento del hongo a cantidades crecientes de fenol. Se hicieron entonces sucesivos repiques de la cepa A.O. 24 en agar-Czapek con fenol 1:1000, sembrando abundantemente de tubos bien esporulados.

Los cultivos se hicieron en cajas de Petri. El crecimiento es muy lento en el primer repique, tardando unos 20 días en cubrir la superficie del medio, sin llegar a la esporulación.

El aspecto de las colonias es algo distinto. Son más compactas, adoptando el micelio un aspecto de copos de algodón.

Como resultado positivo se logró acelerar el crecimiento del hongo al cabo de cinco repiques, llegando a cubrir la superficie del medio en 10 días, y comenzando también antes ~~de~~ la esporulación.



<u>Repique</u>	<u>Tiempo en que cubre la superficie</u>
1	20 días
2	20 días
3	15 días
4	12 días
5	10 días
6	10 días

Simultáneamente fueron haciéndose determinaciones del poder amilolítico sobre los repiques sembrados previamente en afrecho, aplicando el método de Wohlgemuth a los macerados de los cultivos en este medio.

<u>Repique</u>	<u>Poder amilolítico</u>
1	8,40 (gr.almidón por gr.afrecho)
2	8,60
3	8,00
4	8,35

Se hicieron también ensayos sobre afrecho en la forma siguiente:

<u>Cepas</u>	<u>Afrecho con</u>			
	<u>Fenol 1:1000</u>	<u>Fenol 1:200</u>	<u>tal cual</u>	<u>HCl 1:1000</u>
A.O. 24	crece 2 días	crece 2 días	2 días	2 días
25	" " "	" " "	" "	" "
27	" " "	" " "	" "	" "
77	" " "	" " "	" "	" "
A.Niger	" " "	" " "	" "	" "
Mucor	" " "	" " "	" "	" "

No se apreció una disminución en la velocidad de crecimiento para las cepas sembradas en afrecho con fenol.

### Conclusiones

1° - La velocidad de crecimiento en agar-Czapek con fenol, si bien se acelera con sucesivos repiques, no alcanza a la de los cultivos en el mismo medio sin fenol.

2° - Parece existir la posibilidad de acostumbrar al fenol las cepas de *A. Orizae* seleccionadas.

3° - El poder amilolítico se mantiene sensiblemente igual en los cultivos de *A. Orizae* con fenol 1:1000 sucesivamente repicados.

4° - En el medio industrial con afrecho, el agregado de fenol no parece influir sobre el crecimiento del hongo, por lo cual se abandonaron estos ensayos.

-.-

### CONDICIONES DE OPTIMA ACTIVIDAD ENZIMATICA

El control de las condiciones óptimas para la actividad enzimática solo podría hacerse en forma rigurosa sobre enzimas purificadas.

Los concentrados enzimáticos obtenidos por nosotros estaban aún lejos de ser puros. Decidimos por ello estudiar las condiciones de máxima actividad amilolítica solo desde el punto de vista de las necesidades industriales.

Por tal razón los controles efectuados los hemos incorporado al capítulo que trata de los ensayos de cultivo y actividad con fines de aplicación práctica.

-.-

////

CAPITULO 4º

ENSAYOS DE CULTIVO Y DE ACTIVIDAD EN ESCALA DE LABORATORIO

Y SEMIINDUSTRIAL CON FINES DE APLICACION PRACTICA

ENSAYOS DE CULTIVO Y DE ACTIVIDAD EN ESCALA DE LABORATORIO Y  
SEMI INDUSTRIAL CON FINES DE APLICACION PRACTICA

El pasaje de los cultivos de laboratorio a las condiciones semiindustriales o industriales depende de muchas circunstancias.

En primer lugar se plantean problemas de manipuleo de grandes cantidades de producto, para los cuales no son eficaces a veces los métodos estudiados en escala de laboratorio.

En segundo lugar existen modificaciones inesperadas en los rendimientos debido a las distintas condiciones en que se efectúa el trabajo. Sin embargo encontramos relativamente pocas dificultades para lograr un aumento de la producción de los materiales enmohecidos para fines de aplicación industrial, gracias al hecho de que las cantidades necesarias no eran muy grandes comparadas con las requeridas para los controles de laboratorio, que ya habíamos realizado.

Tratándose de afrecho enmohecido, pueden ser suficientes unos kilogramos diarios de producción.

Se planteó esta parte del trabajo en función del cultivo en medio líquido y en medio sólido, y del aprovechamiento directo de los mismos o de un macerado de los cultivos obtenidos.

Sobre los macerados obtenidos se controlaron los factores que influyen sobre la actividad aminolítica y que tienen importancia industrial.

1°- CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO

a) Velocidad de crecimiento:

Se ensayó la velocidad de crecimiento de las cepas aisladas sembrando sobre mosto de malta, medio de Raulin y medio basal, contenidos en frascos de un litro, con los siguientes resultados:

<u>Cepa N°</u>	<u>Tiempo necesario para invadir la superficie</u>	<u>Tiempo de esporulación total</u>
24	5 días	6 a 7 días
25	5 días	6 a 7 días
36	5 días	6 a 7 días
77	5 días	6 a 7 días

b) pH óptimo en función del carbohidrato empleado

Se empleó el medio de Czapek líquido adicionado de distintos carbohidratos en cantidad igual a la prescrita de sacarosa, y se probó el pH óptimo para el crecimiento con los siguientes resultados:

<u>Carbohidrato:</u>	<u>Sacarosa</u>	<u>Glucosa</u>	<u>Dextrosa</u>	<u>Almidón soluble</u>
<u>pH óptimo</u>	4,4, -4,8	4,4 -4,8	4,4 -4,8	4,5 -4,8

c) Rendimiento en función del tiempo

Se estudió el rendimiento del micelio en función del tiempo sembrando la cepa N° 24 en medio basal con sacarosa, con los siguientes resultados:

<u>Días</u>	<u>Rendimiento económico</u>
1	18,3
2	24,0
3	25,1
4	23,5
5	23,5
6	20,0

El rendimiento económico es el cociente del peso del micelio seco obtenido, multiplicando por 100, sobre el peso de azúcar consumido.

La cantidad residual de azúcar del medio se tituló por sacarimetría

con Fehling. El peso del micelio se determinó filtrando toda la masa, lavando 3 veces con agua destilada y pasando después de desecar hasta peso constante a 100° de temperatura.

d) Influencia de la cantidad de almidón

Se ensayó el rendimiento de la cepa N° 24 crecida durante 7 días sobre medio basal adicionado de cantidades variables de almidón, con los siguientes resultados:

Cantidad de almidón:	1%	2%	4%	8%	16%
Rendimiento económico:	19,3	18,8	23,2	24,0	18,1

e) Poder amilolítico

Sobre los cultivos del ensayo (a) se determinó el poder amilolítico extrayendo la mata de micelio, escurriendo bien y poniéndola a macerar con agua destilada a 40° durante 1 hora, titulando entonces con el Wohlgenuth.

El poder amilolítico resultó sumamente escaso en las cuatro cepas probadas.

Conclusiones

Se establecieron algunas condiciones para el cultivo de las cepas de *A. Orizae* en medios líquidos.

Su aprovechamiento industrial exige la extracción de la mata de micelio, que exige 5 días para desarrollarse en toda la superficie.

La cantidad de enzimas segregadas al medio es muy pequeña para que se pueda aprovechar directamente en la industria. Exige la concentración del producto con el consiguiente gasto.

El cultivo en medio líquido resultó pues desfavorable para una aplicación industrial por las siguientes razones:

1°- Lentitud del crecimiento

- 2° - Poca resistencia á las contaminaciones bacterianas.
- 3° - Bajo rendimiento de enzima por unidad de tiempo y por unidad de peso del cultivo.
- 4° - Dificultad de emplear directamente el medio con enzimas para productos de alimentación (jugos de frutas, vino, etc.) a los cuales quedaría incorporado.
- 5° - Mayor dificultad para conservar el producto fabricado.
- 6° - Mayor costo del medio de cultivo.

-./

## 2° - CULTIVO EN MEDIO SOLIDO

Los métodos de cultivo en medios sólidos en escala semiindustrial e industrial ya fueron discutidos anteriormente.

Se eligió el procedimiento estático porque era el único que se podía aplicar directamente, ya que no requería instalaciones especiales y mientras tanto organizábamos el cultivo en tambor rotatorio.

Posteriormente dejó de ser imprescindible el uso de este último sistema, ya que el método estático resultó suficientemente satisfactorio para los fines propuestos. El método dinámico tiene sobre aquel la ventaja de la limpieza del trabajo, pero requiere una atención mucho mayor, la instalación de un sistema mecánico y de aparatos que no estábamos en condiciones de obtener.

En un capítulo anterior se estudiaron los medios sólidos naturales, eligiéndose el afrecho por ser el más económico y el de mejor rendimiento.

Con este material se hicieron una serie de tanteos, utilizando cantidades progresivas de medio de cultivo y buscando los recipientes más cómodos para la incubación.

Resuelto el problema anterior, se controló la acción de la temperatu-

////

Cultivos con afrecho en escala semiindustrial



1. Interior de un recipiente de hierro enlozado con una parte de un cultivo de 500 gramos.
2. Trozo de afrecho enmohecido extraído del 1. La zona clara está totalmente esporulada.-



ra, la cantidad de afrecho, de azúcares fermentescibles y de agua sobre los cultivos, así como las contaminaciones que pudiera sufrir. Sobre los cultivos obtenidos se determinaron las condiciones de desecamiento compatibles con la conservación del poder enzimático, y se fijó el tiempo conveniente para obtener la máxima actividad amilolítica. Como síntesis final de los controles anteriores se estudió la evolución completa de un cultivo en escala semiindustrial.

a) Ensayos sobre cantidades progresivas de medios de cultivo

Se hicieron los siguientes ensayos:

1°-	En erlenmeyers de 125 cc.:	2 gr. afrecho	y 2 cc. HCl	0,36 N.
	250 "	10 "	" "10 "	" "
	500 "	15-30 "	" "15-30 "	" "
	1000 "	50-100 "	" "50-100 "	" "

Una vez mezclado perfectamente el afrecho con la solución ácida se esterilizaron 1/2 hora a 1 y 1/2 atmósferas. Se sembraron y llevaron a estufa a 37° y se observó el crecimiento.

Para los tres primeros la invasión del hongo en el afrecho es total. En los erlenmeyers de 1000 cc. resultó total la invasión cuando se usaban 50 gramos de afrecho y 50 cc. HCl 0,3 N. Para 100 gramos de cada uno el hongo no alcanzaba a invadir la parte inferior del medio de cultivo, y era necesario mezclar el material al día siguiente o a los 2 días, dando lugar así a un producto no uniforme, porque hay dos ritmos de crecimiento.

En todos los casos, el primer día se invade todo el medio y en el segundo comienza la esporulación. Este material, mantenido en estufa o al aire libre se deseca esterilmente y sirve como material para siembra de mayores cantidades de afrecho.

2° - En distintos recipientes sin tapar, empleando afrecho previamente esterilizado.

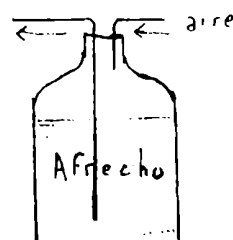
a) - En cápsula de porcelana crece bien y con escasa proporción de cultivos contaminados, siempre que se tome la precaución de sembrar abundantemente con esporas la superficie del medio y guardar luego en una caja de hojalata.

En un día el hongo crece con un desarrollo tal de calor que la temperatura del cultivo llega hasta  $40^{\circ}$ , y en dos días se completa el crecimiento. No se necesita estufa.

b) - En balones de 500 cc. se llegó a cultivar con facilidad 50 gramos de afrecho sin contaminaciones, produciéndose también un aumento automático de temperatura. Se empleó este método para obtener material para siembra de cultivos mayores.

c) - En frascos de vidrio de 3 litros de capacidad se cultivaron 200 a 300 gramos de afrecho, tapando con tapa de hojalata perforada. Los frascos se llenan hasta la mitad con la mezcla de afrecho y HCl 0,3 N, de modo que se puedan acostar sin volcar el contenido. Se inoculan abundantemente con afrecho esporulado y se guardan acostados en un sitio abrigado. En 24 horas enmohece la capa superior hasta 5 cc. de profundidad. Con una varilla esteril se mezcla bien y en 24 a 48 horas más queda terminado el crecimiento. El desarrollo de calor lleva la temperatura a  $40^{\circ}$ . Se desecan rápidamente y los extractos secos así obtenidos se conservan bien en heladera.

d) - Usando los mismos fracos pero llenándolos casi completamente con el medio de cultivo y disponiendo un sistema de aireación. El desarrollo resultó muy lento y no alcanzó a invadir toda la masa. Se hizo necesario agitar repetidas veces y terminó por contaminarse.



e) - En cacerolas destapadas, de cinco litros de capacidad, con 400 gr. de afrecho y 400 cc. de HCl 0,3 N.

Se siembra y coloca bajo campana . En un día hay invasión de casi todo el espesor (8cm.) menos un centímetro del fondo. Se mezcla perfectamente y en el 2º día se produjo la esporulación en toda la superficie, completándose en toda la masa durante el 3er día. Hay gran desarrollo de calor y destila mucha agua, que se condensa y gotea por las paredes de la campana



b) Control, de temperatura

Dado el resultado satisfactorio de este ensayo se prepararon recipientes enlozados conteniendo 200, 400, 600 y 800 gramos de afrecho e iguales cantidades de HCl 0,3 N y se esterilizaron 1/2 hora a 1 y 1/2 atmósferas, y se sembraron con 10% del peso de afrecho con igual material bien esporulado.

Se mezclaron bien y se llevaron a estufa a 25°, 30°, y 37°. Sin embargo a poco de iniciarse el desarrollo del cultivo (8 a 10 horas) el desprendimiento de calor fué tal que resultó practicamente imposible mantener la temperatura constante, subiendo ésta hasta 40°.

Esta circunstancia obligó a abandonar la estufa y emplear simplemente grandes cajas de chapa de latón para guardar los recipientes. En verano se sembraba y se colocaban los tachos directamente en las cajas de latón. En invierno se ponían en estufa a 37° hasta iniciar el desarrollo del cultivo pasándolos luego a las cajas de latón colocadas en un rincón abrigado del laboratorio.

La temperatura ascendía rápidamente hasta 35° a 40° y se mantenía mientras se desarrollaba la colonia, disminuyendo paulatinamente a

medida que se desecaba el cultivo,

c) Control de la cantidad de afrecho

La cantidad de afrecho es función del tamaño de los recipientes empleados, ya que lo que interesa realmente para el desarrollo homogéneo del cultivo es el espesor de la capa. Los ensayos realizados con este fin demostraron que hasta espesor de 8 cm. se lograba la invasión total del medio por el hongo. Para espesores mayores el hongo no lograba llegar al fondo del recipiente.

d) - Control de la cantidad de azúcares fermentescibles

Se comprobó que el aumento del porcentaje de dichos azúcares provocaba un aumento del tiempo necesario para la esporulación. Si al mismo tiempo se va produciendo el desecamiento, <sup>podría</sup> puede producirse la esporulación sin que se hubiera agotado la provisión de alimentos contenida en el afrecho.

Los resultados obtenidos fueron semejantes a los indicados en los medio de cultivo líquidos. No resultó ventaja alguna del agregado de azúcares al medio de afrecho.

e) - Control de la humedad

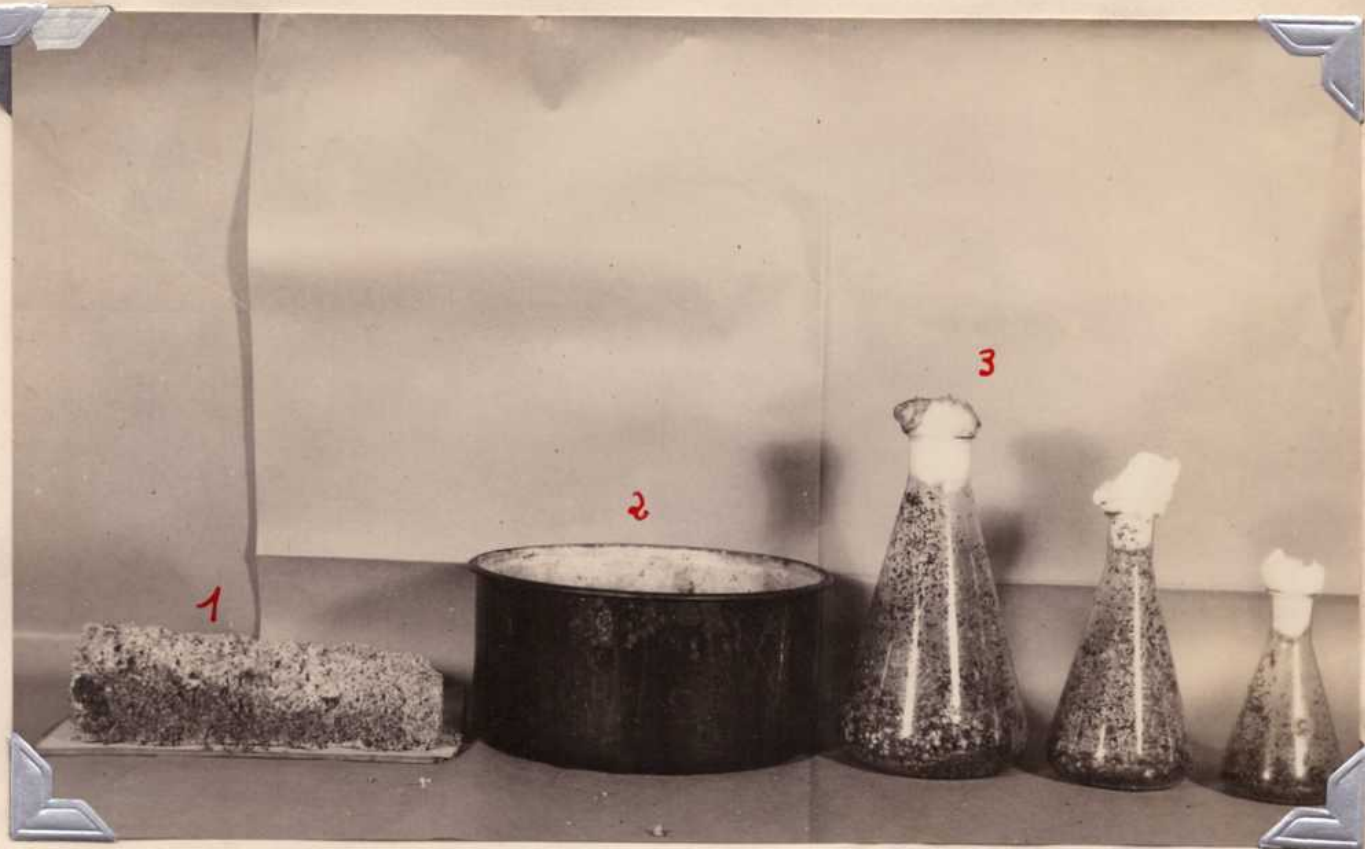
Se realizó sobre recipientes con 500 gramos de afrecho con 10 a 12 % de humedad. Se agregaron cantidades variables de H<sub>2</sub>O 0,3 N (20%, 40%, 60%, 80% y 100% respecto del peso total), regulando luego el pH a 2,5 - 3. Los mejores resultados se obtuvieron con 40 a 60% de agua.

Como la esterilización se hace sobre los tachos destapados, hay un aumento del contenido de agua en un 10%. Al día siguiente de sembrado se reduce nuevamente la humedad en un 10%, y sigue disminuyendo

## Elementos para obtener afrecho enmohecido

### 2) Control de las contaminaciones

Se realizó para dos tipos de microorganismos: las bacterias



1. Trozo de afrecho enmohecido mostrando claramente la zona, superficial invadida por el micelio.
2. Recipiente para cultivos con 500 gramos de afrecho.
3. Erlenmeyers con cultivos de 50, 30 y 20 gramos respectivamente de afrecho.

luego aunque con mayor lentitud.

f) Control de las contaminaciones

Se estudió para dos tipos de microorganismos: las bacterias y los mohos.

La acidificación del medio y el control de la humedad bastaron para eliminar el ataque por bacterias. Si el afrecho tiene un pH mayor de 3 o una humedad superior al 65% sobre el total, comienzan a producirse putrefacciones.

El ataque por mohos puede prevenirse en parte con la siembra abundante de esporas. Por ello se usó en todos los casos como material de siembra afrecho emmohecido en proporción de 10% del medio de cultivo. Sin embargo, una vez esporulado el cultivo, muchas veces resultó invadido por mucorales que se extendían por la superficie del afrecho. Una esterilización de las cajas, los recipientes y el local de trabajo, empleando una emulsión de kerosene y agua, y un contralor más riguroso en el manipuleo del material, bastaron para eliminar las infecciones. Debemos señalar que el local de trabajo se destinaba exclusivamente a producir cultivos de *A. Orizae*.

g) Influencia del método de desecamiento sobre el poder amilolítico

El afrecho emmohecido por el procedimiento de los tachos presenta un grado de humedad elevado que es influido grandemente por el espesor de la capa de afrecho, y por la humedad del ambiente. Esto planteó el problema de desecarlo en las condiciones más convenientes para la conservación del poder amilolítico, simplificando al mismo tiempo dentro de lo posible el procedimiento de fabricación.

La conservación del afrecho emmohecido con el procedimiento de los

//////

erlemeyer no presentó problemas porque se mantuvo la esterilidad del medio contra las infecciones, y el desecamiento se cumplió sin dificultad manteniéndolos en estufa a 37° C el tiempo necesario. En el procedimiento semiindustrial se trató de controlar las ventajas existentes entre el desecamiento natural (a 15-25°C) y el forzado en estufa a distintas temperaturas para un afrecho ya esporulado, o para afrechos que se hicieron esporular durante el desecamiento.

### Parte experimental

1° - Se dejó el afrecho enmohecido en uno de los tachos, tal cual se lo preparara, durante un mes. El desecamiento al cabo de ese lapso no fué total; la capa inferior se mantuvo húmeda, con putrefacción. La capa superior se desecó pero sufrió el ataque de mucorales.

El procedimiento no resultó conveniente.

2° - Se extendió el afrecho enmohecido sobre papeles, en una habitación ventilada pero sin corrientes de aire. Se obtuvo un desecamiento rápido aunque no total; el afrecho dejó una impresión de frescura y humedad al tacto. El producto obtenido se conservó bien durante meses.

El poder amilolítico calculado sobre el afrecho seco resultó sensiblemente igual antes y después de desecado.

En el siguiente cuadro se han resumido algunos resultados, obtenidos con diferentes cultivos de la cepa N° 24 de A. Orizae.

<u>Muestra N°</u>	<u>Antes de desecar</u>		<u>Después de desecado</u>	
	<u>Título</u>	<u>Humedad</u>	<u>Título</u>	<u>Humedad</u>
3	8,17	58,6	8,40	16,6
12	16,24	54,3	15,81	13,4
13	6,81	50.	6,39	15,6
16	15,40	50	15,46	17
18	17,15	46.0	17,0	16,0

### 3° Desecamiento forzado

a) En estufa a 100-105° C. Rápidamente se obtuvo un afrecho seco, quebradizo, fácil de pulverizar. Se probó su poder amilolítico antes y después de desecado.

<u>Muestra N°</u>	<u>Antes de desecar</u>		<u>Después de desecar</u>	
	<u>Humedad</u>	<u>Título</u>	<u>Humedad</u>	<u>Título</u>
1	58,2 %	6,15	0,5 %	1,6
2	28,6 "	5,25	0,7 "	0,53
3	30,5 "	7,13	1,0 "	1,4
4	55,6 "	8,16	0,9 "	0,96

b) En estufa, entre 40° y 60°

<u>Muestra N°</u>	<u>Antes de desecar</u>		<u>Después de desecar</u>	
	<u>Humedad</u>	<u>Título</u>	<u>Humedad</u>	<u>Título</u>
1	58,2 %	6, 15	10,2 %	6,20
2	28,6 "	5,25	9,4 "	5,16
3	30,5 "	7, 13	11,6 "	7,30
4	55,6 "	8, 16	9,8 "	8,00

4°- Desecamiento y esporulación simultáneos.

/////



Se emplearon afrechos emmohecidos de 12 a 36 horas, que no presentaban señales de esporulación.

De acuerdo a los resultados anteriores se controló sobre todo la temperatura. A 50° se obtuvieron los siguientes resultados:

<u>Muestra N°</u>	<u>Tiempo de cultivo</u>	<u>Antes de desecar</u> <u>Humedad</u>	<u>Título</u>	<u>Después de desecar</u> <u>y esporular</u> <u>Humedad - Título</u>
1	18 hs.	60,2%	2,12	10,6 % 5,64
2	24 "	45,0 %	4,63	10,0 " 7,83
3	36 "	57,0 %	9,12	12,0 " 9,90

Las mismas muestras, dejándolas esporular a 35° dan:

N° 1 : 9,96

N° 2 : 8,34

N° 3 : 9,32

Se comprueba que el desecamiento del afrecho debe hacerse a temperatura inferior a 40°. A mayor temperatura hay disminución del poder enzimático, que se destruye totalmente cuando se aproxima a 100°.

No se obtuvo ventajas realizando la esporulación y el desecamiento simultáneamente a 50°.

La necesidad de desecar el afrecho se puso de manifiesto por la putrefacción que se producía en los cultivos esporulados húmedos.

#### g)- Control del tiempo en la producción de enzima

Los ensayos están destinados a comprobar el momento de máxima actividad amilolítica de los cultivos en afrecho en escala semiindustrial.

Se dejaron de lado los medios líquidos, ya que la cantidad de enzimas segregadas eran menores que las obtenidas en medio sólido, siendo mayor el tiempo requerido para el desarrollo de los cultivos.

Fijados los otros factores de influencia, se sembraron con 10% de afrecho emmohecido los recipientes conteniendo 500 gr. de afrecho e igual cantidad de HCl 0,3 N. Se incubaron según la técnica indicada y se retiró una pequeña porción del cultivo en los momentos necesarios, haciendo sobre ellas las determinaciones del poder amiloclástico por el método de Wohlgemuth, empleando como sustrato almidón soluble y almidón de papa, según la técnica habitual,- haciendo primero la dilución en progresión geométrica y luego una progresión aritmética entre el primer tubo azul y el anterior.

Los promedios de tres determinaciones están indicados en el siguiente cuadro:

<u>Tiempo</u>	<u>Título P</u>	<u>Título S.</u>	<u>Observaciones</u>
12 hs.	0,40	0,82	A medio invadir
24 "	1,12	1,08	Invasión completa
36 "	2,10	1,83	Esporulación iniciada
48 "	3,5	2,2	Media esporulación
3 días	8,15	3,80	Esporulación completa
4 "	7,8	4,15	Esporulación completa
5 "	8,1	8,23	En desecación
10 "	8,2	8,18	Desecado
12 "	9,65	8,20	"
14 "	8,0	8,20	"

El valor obtenido para el poder amiloclástico sobre almidón de papa del cultivo de 12 días fué irregularmente alto, seguramente a causa de condiciones locales incontrolables, ya que las muestras se tomaban de una parte cualquiera del cultivo.

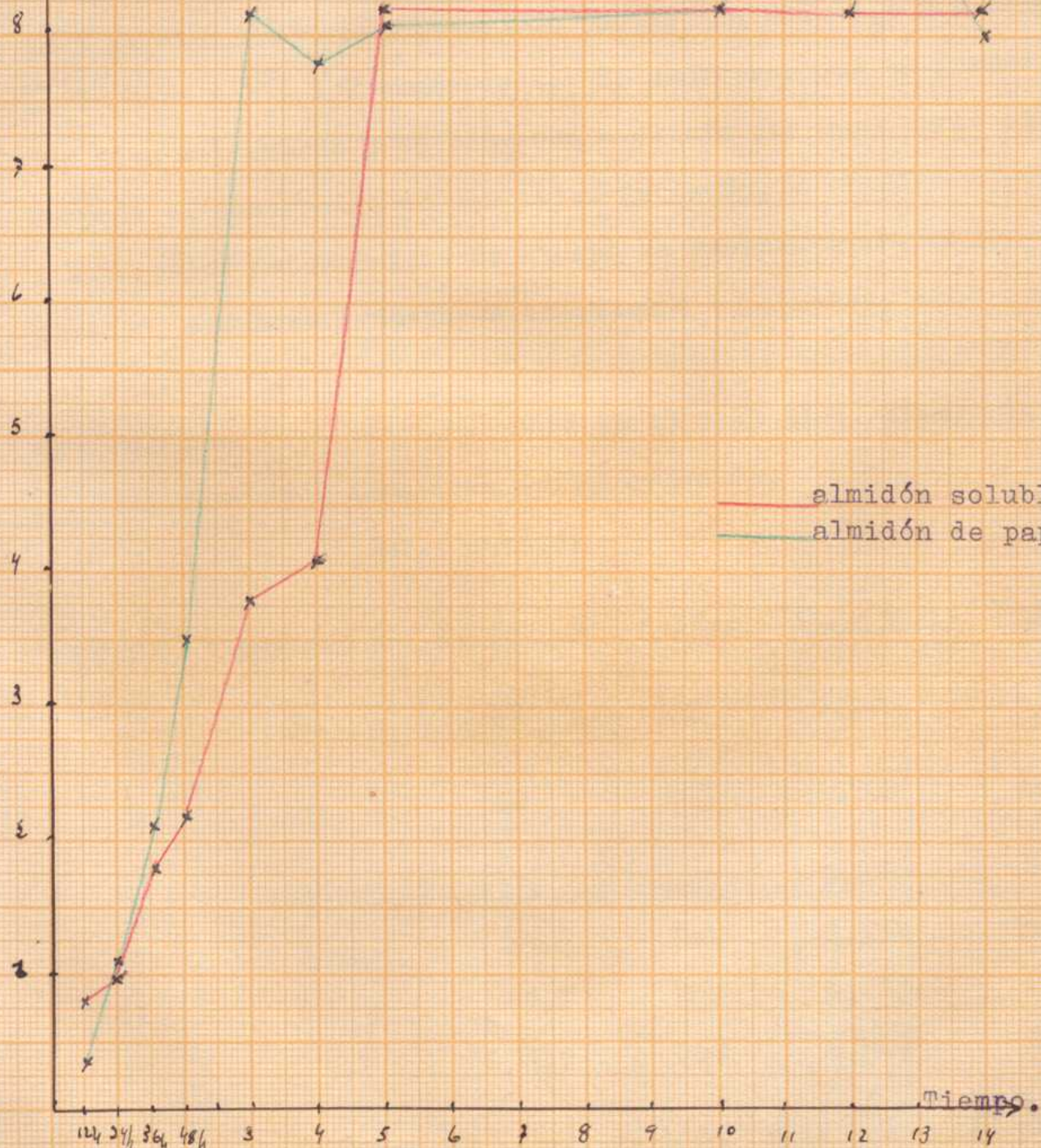
Las diferencias de los valores por triplicado no pasaron del gramos

1. Introducción

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el impacto de la crisis económica en el sector de los seguros en España, así como las medidas adoptadas por las aseguradoras para superar esta situación. Para ello, se ha realizado un estudio de caso de una de las principales compañías de seguros del país, que ha permitido observar de primera mano los desafíos y las estrategias implementadas. El análisis se centra en el periodo comprendido entre el inicio de la crisis y el momento actual, evaluando tanto los efectos negativos como las oportunidades surgidas. Se ha considerado el contexto económico y financiero, así como el comportamiento de los asegurados y el papel de las autoridades reguladoras. Los resultados indican que, a pesar de la crisis, el sector de los seguros ha mantenido una cierta estabilidad, gracias a la solidez de sus balances y a la capacidad de adaptación de las aseguradoras. Sin embargo, se han observado cambios significativos en la estructura de los negocios y en las prioridades de las compañías. Finalmente, se concluye que el sector de los seguros en España ha demostrado una gran resiliencia y capacidad de adaptación, lo que le permitirá superar la crisis y seguir desempeñando un papel clave en el sistema financiero.

Variación del poder amilolítico de un cultivo en función del tiempo

gr de almidón  
hidrolizados  
por gr de afrecho



almidón soluble  
almidón de papas

nes de  
culti-  
de  
y lo-  
lizado  
afre-  
seguir  
tulaba  
al y po-  
e el

Obser-  
P. vacio-  
nes  
Hay al-  
midón  
Hay al-  
midón  
Espor.

100 gra-

El error del cálculo de los valores reside en que se eliminan sus-  
tancias sólidas con la destrucción de los hidratos de carbono, y es-

////

3° - EVOLUCION DE LA PRODUCCION DE ENZIMAS EN ESCALA INDUSTRIAL

Se efectuaron dos ensayos completos, siguiendo las variaciones de diversos factores importantes a lo largo del desarrollo del cultivo semiindustrial.

Se hicieron cultivos en cacerolas de 5 litros de capacidad, de hierro enlozado, con 500 gramos de afrecho de 10-12% de humedad y 10-12 % de almidones, mezclados con 500 cc. de HCl 0,3 N y esterilizado media hora a 1 y 1/2 atmósferas. Se sembraron con 50 gramos de afrecho bien esporulado y se llevaron a estufa por unas horas para seguir después el desarrollo en las cajas de latón.

A intervalos determinados de tiempo se sacaban muestras y se titulaba humedad, azúcares reductores expresados en glucosa, acidez total y poder amilolítico.

Los cultivos se controlaron durante 17 y 15 días, tiempo en que el cultivo alcanzó a desecarse suficientemente.

## 1er. ensayo:

<u>Días de Cultivo</u>	<u>Humedad %</u>	<u>S. Seca %</u>	<u>Acidez</u>	<u>Az.reduct.</u>	<u>Poder P.</u>	<u>Observaciones</u>
0	58	42	437	0,468	-	Hay almidón
3	58	42	473	0,502	1,96	Hay almidón
4	55	45	480	0,825	2,53	Espor.
7	51,4	48,6	341	0,371	9,4	—
11	40,2	59,8	201	0,217	8,62	-
17	25,1	74,9	208	0,447	8,60	-

La acidez está expresada en ml. de OHNa N/10 consumido por 100 gramos de afrecho seco.

El error del cálculo de los valores reside en que se eliminan sustancias sólidas con la destrucción de los hidratos de carbono, y es-



tas aparecen como humedad. Sin embargo esos errores son relativamente pequeños respecto del peso total considerado.

## 2° ensayo

<u>Días de cultivo</u>	<u>Humedad %</u>	<u>S.Seca %</u>	<u>Acidez</u>	<u>Az.reduct.</u>	<u>Poder.P</u>	<u>Observaciones</u>
0	54,8	45,2	408	1,05	0	Hay almidón
1	52,3	47,7	425	0,98	0	"
3	47,9	42,1	312	0,33	5,93	Trozos sin esp.
5	40,2	59,8	207	0,16	19,3	Total esporulación
15	12,4	87,6	49,5	0,05	18,28	Desecado

La humedad se determinó en cada caso sobre 10 gramos de muestra homogénea que servía para las demás determinaciones. Se hizo en estufa a 105°.

La acidez total se probó macerando la muestra de afrecho y llevando a 100 cc. con la técnica indicada. Sobre 25 cc. se tituló la acidez y sobre 2 cc. los azúcares reductores.

Estos se titularon por el método de Folin, previa neutralización de la muestra con OHNa para evitar interferencias.

El poder amilolítico se probó con el Wohlgemuth modificado, ajustando el pH a 5 para eliminar la influencia de la acidez de los macerados. La titulación de dicho poder se hizo en base a la primera extracción del afrecho. No se hizo una segunda extracción porque ensayos previos demostraron que resultaba excesivamente complicado y que no presentaba nuevas indicaciones de interés para el control.

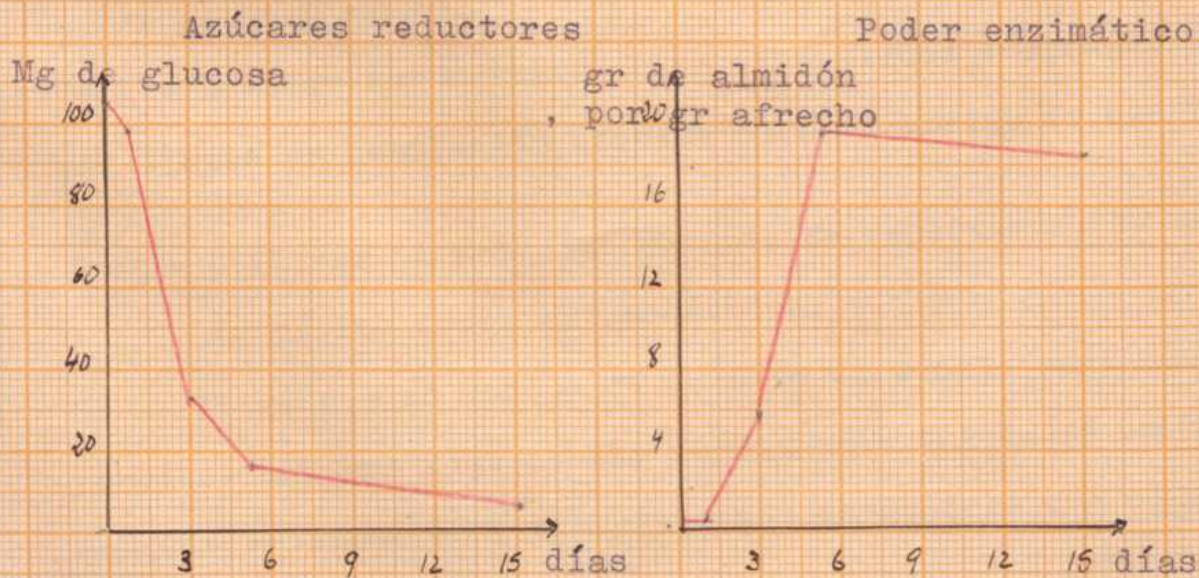
Debido a la disminución del peso del cultivo se calculó el poder amilolítico sobre afrecho seco, por ser el dato menos sujeto a errores.

/////

Los datos de azúcares reductores expresados en glucosa se ampliaron en el 2º ensayo, determinándolos sobre el mismo líquido de maceración en el momento de agregar el agua a la muestra y a los 2 días. Se observó un aumento pronunciado de la cantidad de azúcares reductores en un caso, seguramente como consecuencia de la actividad amiloclástica de las enzimas sobre los almidones del afrecho. En el cultivo de 5 días no hay aumento, debido a que el almidón ha sido previamente digerido. Por eso cuando aparecen dos valores para azúcares reductores en el cuadro anterior, el primero se refiere a la determinación inmediata y el segundo a la efectuada a los 2 días. Respecto de la variación de la acidez total, se observan resultados semejantes a los obtenidos en los ensayos de cultivos en escala de laboratorio.

El gráfico siguiente ilustra los resultados del segundo cuadro:

# Evolución de un cultivo en escala industrial



en frascos cerrados, durante varios meses, sin perder su poder ami-

////

n de  
son  
ual  
1/2  
ndolo  
idad, y  
en es-  
ocar  
y ele-  
bre pa-  
s de ai-  
nserva  
al que  
ad, aci-  
o de con-  
esporu-  
n una se-  
lnarse,



### Conclusiones

Se ha encontrado que las mejores condiciones para la producción de cultivos con buen poder amiloclástico en escala semiindustrial son las siguientes:

- 1°- Utilizar afrecho como medio de cultivo, mezclado con igual cantidad de HCl 0,3 N. y esterilizado media hora a 1 y 1/2 atmósferas.
- 2°- Emplear 500 gramos de afrecho seco por cultivo, colocándolo en recipientes de hierro enlozado de 5 litros de capacidad, y de manera que el espesor del medio no pase los 8 centímetros.
- 3°- Iniciar el cultivo a temperatura ambiente en verano y en estufa en invierno, y una vez iniciado el desarrollo colocar los recipientes en cajas de latón, donde continúan creciendo y elevando la temperatura.
- 4°- Desechar los cultivos bien esporulados colocándolos sobre papel limpio en habitación aireada pero al abrigo de corrientes de aire.
- 5°- Utilizar el material después de esporulado, ya que conserva su máximo poder amiloclástico.

Se ha llegado a un método de cultivo en escala semiindustrial que permite- una vez fijadas las condiciones iniciales en humedad, acidez, esterilización y temperatura - conducirlo con el mínimo de controles técnicos.

Por una regulación natural de la temperatura, se llega a la esporulación con un comienzo de desecamiento que se cumple bien en una semana.

El producto obtenido se mantiene perfectamente, sin contaminarse, en frascos cerrados, durante varios meses, sin perder su poder ami-

////

ecclástico.

El método estático adoptado resultó suficientemente eficaz, por lo que no se ensayaron los métodos dinámicos.

-.-

#### 4° - FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD AMILOLITICA DE LOS MACERADOS

Se trataron de fijar las condiciones de óptima actividad amilolítica de los macerados obtenidos con fines de aplicación industrial. Se estudió la resistencia al calor de los macerados en función del pH y del tiempo, la influencia del pH y de los electrolíticos<sup>0.5</sup> sobre la actividad amilolítica de los mismos, y se trazó en base a los resultados obtenidos la curva de actividad de las enzimas amilolíticas del *A. Orizae*.

##### a) Resistencia al calor en función del pH

Este control tenía por objeto fijar por una parte los límites de temperatura y acidez para las aplicaciones de los macerados, y para aclarar por otra ciertas dificultades aparecidas durante los ensayos de concentración.

##### Parte experimental

1°- Se realizaron ensayos de orientación a pH próximos a 3,7 y 11, empleando ácido acético e hidróxido de sodio para ajustar la acidez. Se llevaron los macerados a la misma dilución respecto del material inicial. Se los mantuvo durante una hora a las temperaturas elegidas y luego se procedió a la titulación con las siguientes precauciones: Para obtener aproximadamente la misma composición salina se mezcló 1 cc. del macerado activo con 1 cc. de cada uno de los otros dos de distinto pH previamente inactivados por ebullición. Se reguló el pH para la titulación ajustándolo a 5,4 - realizando ésta con la técnica habitual, y a 37°.-

Los resultados obtenidos se consignan a continuación:

////

pH	T e m p e r a t u r a				
	37°	52°	58°	70°	80-90°
3	15,88	0,5	0,67	0,20	0
7	16,15	17,6	18,4	5,20	0
11	18,4	12,0	10,78	3,12	0

### Conclusiones

Para pH 3 se observa inactivación por mantenimiento del concentrado una hora a 52°, mientras que en las mismas condiciones los macerados a pH 7 y 11 mantienen su actividad hasta temperatura de 58°.

2°- Se realizaron ensayos de la acción amilolítica de los macerados ácidos (ya que se usan en tal medio) haciéndolos actuar a distintas temperaturas y variando el pH de los mismos, a fin de establecer el intervalo útil de pH.

Para la titulación del poder amilolítico se empleó el Wohlgemuth según la técnica habitual, pero empleando distintas temperaturas:

pH	T e m p e r a t u r a s				
	37°	45°	52°	58°	65°
5	36,0	40,0	44,1	44,3	36,2
5,5	36,2	44,3	46,5	47,2	44,5
6	35,6	40,1	43,9	44,1	42,6
6,5	35,6	39,8	44,0	44,2	42,6
7	35,4	39,8	42,1	43,6	41,9

### Conclusiones

Se puede emplear el macerado entre pH 5 y 7 para temperaturas que no pasen de 58°. Por encima de la misma comienza la destrucción del poder amilolítico.

b) Resistencia al calor en función del tiempo

Se realizó este ensayo manteniendo los macerados a las temperaturas indicadas durante un tiempo y determinando cada media hora su poder amilolítico con el método de Wohlgemuth según la técnica habitual y a las mismas temperaturas indicadas, ajustando el pH a 5,4.

Horas	T e m p e r a t u r a s			
	<u>30°</u>	<u>37°</u>	<u>45°</u>	<u>55°</u>
0	18,0	23,5	28,5	32,0
1/2	18,0	22,8	26,9	25,0
1	18,0	22,25	25,7	20,0
1 y 1/2	18,0	21,63	24,7	16,0
2	18,0	21,08	23,99	12,0
2 y 1/2	18,0	20,58	22,9	9,2
3	18,0	20,18	22,4	7,7
3 y 1/2	18,0	19,78	22,0	6,9
4	18,0	19,33	21,6	6,0

Conclusiones

Se observa una disminución de la actividad en función del tiempo cuando se mantienen los macerados a temperaturas superiores a 37°.

Para el ensayo primero se comprueba que el poder amilolítico aumenta en función de la temperatura que actúa el macerado, aunque tal aumento no alcanza los valores que le corresponderían de acuerdo a la regla de Arrhenius, lo que indica que hay destrucción simultánea del poder enzimático.

c) Influencia del pH

Las determinaciones del pH óptimo de actividad enzimática citadas

en la bibliografía para el A.Orizae son discordantes, porque no se precisan otros factores que tienen influencia en el proceso.

En el trabajo de <sup>ad</sup>Cladwell y Tyler (44) se estudia la influencia de la concentración del acetado y del fosfato sobre la actividad de la amilasa del A.O. T. Harada (15) indica que el pH óptimo encontrado varía entre 5,2 y 5,4 a temperaturas comprendidas entre 30° y 50°; y aumenta a 6,2-6,4 entre 60° y 65°, pero no indica la concentración total de electrolitos y usa como buffer una mezcla de ácido ftálico y ftalato de potasio.

Nuestro trabajo exigía:

- 1° Fijar un buffer relativamente sencillo e inocuo cuando se tratara de aplicaciones alimenticias del poder enzimático.
- 2° Fijar límites óptimos para los extractos enzimáticos obtenidos con distinto grado de pureza y cuyo poder amilolítico era necesario medir en condiciones comparativas.

#### 1° Buffer empleado

Después de una serie de pruebas se eligió como buffer la mezcla de ácido acético y acetato de sodio, que regula con suficiente eficacia el pH dentro de los límites útiles encontrados en la práctica.

Las determinaciones de pH se efectuaron por colorimetría con la solución universal de Clark y Lubs y con papeles indicadores de la Eastman Kodak. En un caso se controló la exactitud de ambos medios por potenciometría.

#### 2° pH óptimo de los macerados

Esta comprobación, que pudiera parecer inútil por la variedad de composición de los macerados obtenidos, resultó necesaria por las siguientes razones:

En primer lugar, los macerados obtenidos variaban entre límites relati-

////

vamente estrechos en cuanto a su contenido en sales minerales y sustancia orgánica distinta a carbohidratos.

En segundo lugar la proporción en sales minerales ejercía poca influencia sobre el sustrato en que actuaban, a causa de la dilución a que se emplean los macerados para su acción amilolítica.

En efecto, la actividad de los macerados medida por el Wohlgemuth corresponde a diluciones del orden de 1:128 a 1:64, y como el volumen total se llevaba a 10 cc. resulta en realidad del orden de 1:1280 a 1:640.

### Parte experimental

Se hizo una serie geométrica de diluciones en tubos de ensayos que se pusieron en heladera. Se preparó solución al 5% de almidón soluble Merk y se dividió en 8 partes y se reguló cada una a distinto pH con el buffer empleado. Se enfrió bien en heladera y se agregaron 5 cc. a cada uno de los tubos de las tres series en ensayo. Se llevó a 10 cc. con agua destilada y se controló el pH final.

Se incubaron media hora a 37°. Al cabo de este tiempo se añadió a cada tubo 10 cc. de agua destilada bien fría y 0,5 cc. de solución 0,01 N de iodo. Se eligió como tubo final el primero que daba color azul semejante al testigo.

Con estos resultados se hicieron diluciones del extracto enzimático en progresión aritmética comprendidas entre el tubo final y el anterior, con salto de 0,04 cc. medidos con pipeta de Kahn. Con menor cantidad la diferencia de color entre dos tubos consecutivos no era suficientemente visible.

Se controlaron los resultados dejando 24 horas a temperatura ambiente sin que se modificaran.

Para determinar exactamente la actividad amilolítica se empleó el método de titulación de Fehling gravimétrico, anotando las cantidades de

azúcares productores producidas por cc. de macerado, expresándolas en glucosa.

Se realizó paralelamente un ensayo con takadiastasa Parke Davis en solución tal que tuviera poder amilolítico semejante al de los macerados, en las siguientes condiciones:

Empleando almidón soluble Merk en solución al 1% en agua destilada. Concentración de cloruros: 0,5% expresado en ClNa. Concentración de nitrógeno: 0.12 mg. por cc. determinando por nesslerización directa. Los macerados empleados contenían 0,6 a 0,8 % de ClNa, y 0,80 a 0,93 mg de N por cc. determinando también por nesslerización. Esto indica que había un gran porcentaje de nitrógeno inactivo.

Los resultados obtenidos se consignan en el siguiente cuadro:

pH:	<u>6,7</u>	<u>6,4</u>	<u>6,1</u>	<u>5,8</u>	<u>5,3</u>	<u>5,0</u>	<u>4,7</u>	<u>4,4</u>
Macerado N° 11	7,0	7,8	<u>7,5</u>	<u>8,1</u>	7,1	6,8	6,5	6,6
Macerado N° 3	7,3	8,1	<u>8,3</u>	<u>8,8</u>	8,1	7,8	7,5	7,2
Macerado N° 8	8,5	9,4	9,3	<u>9,7</u>	<u>9,5</u>	8,8	8,3	8,1
Taka-diastasa	8,0	8,4	8,4	<u>8,5</u>	<u>8,9</u>	<u>8,7</u>	8,6	8,1

### Conclusiones

La máxima actividad amilolítica estuvo comprendida entre pH 5,3 y 6,4 para buffer de acetato-ácido acético sobre extractos enzimáticos de afrechos embebidos, determinados a 37° de temperatura. El valor óptimo resultó próximo a 5,8. Para la takadiastasa Parke Davis el pH óptimo resultó 5,3.

Una disolución de takadiastasa en los extractos enzimáticos previa-



mente hervidos para destruir su poder amilolítico, probada con el Wohlgemuth y el Fehling, dió valores máximos a pH comprendidos entre 5,3 y 5,8.

Los macerados obtenidos de diversos cultivos de afrecho emmohecido han tenido un comportamiento semejante, pero no igual, resultando distintos dentro de límites relativamente estrechos sus poderes amilolíticos.

#### d) Influencia de los electrolitos

La influencia de electrolitos en la actividad enzimática ha tenido gran importancia en las investigaciones sobre activadores e inhibidores. En el caso de las amiladas estos estudios permitieron establecer la influencia real de ciertos electrolitos sobre la amilasa pancreática.

En cambio, los estudios cuidadosos de Caldwell y Doebbling<sup>e</sup> (48) sobre la acción de los electrolitos sobre la amilasa del *A. Orizae*, demostraron que más que una acción específica de los mismos hay una acción debida a la concentración total de sales. Tiene importancia entre ellas la acción del ClNa a concentraciones superiores a 0,01 molar.

#### Cálculos

Se tituló la cantidad de cloruros en los macerados obtenidos sobre afrecho emmohecido, empleando el método de Volhard. En todos los casos resultó inferior a 1 %, - expresado en ClNa.

Los macerados se emplean en diluciones grandes cuando actúan sobre los sustratos. Por ejemplo, 1 gramo de afrecho esporulado es suficiente para purificar 1 litro de licor péctico. Esto representa una concentración de cloruros de:

//////

$$\frac{0,01}{60} = 0,00016 \text{ M.}$$

### Conclusiones

Resulta inútil un control de la influencia de los cloruros en la actividad amilolítica de los macerados empleados, a causa de la gran dilución en que se encuentra.

### 5°- CURVA DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA DE LOS MACERADOS

Fijadas las condiciones de máxima actividad amilolítica de los macerados obtenidos, especialmente respecto de la temperatura y el pH, interesaba determinar el tipo de reacción que se producía en la hidrólisis del almidón para la concentración de enzimas empleada.

El trabajo de Van Slike sobre la cinética de las enzimas hidrolíticas (89) destaca la influencia de la concentración de enzima sobre el orden aparente de la reacción que se produce, cuando se la representa en función del tiempo.

En nuestro caso interesaba tal determinación para fijar las condiciones industriales de trabajo.

### Parte experimental

En un erlenmeyer de 250 cc. se tomaron 100 cc. de solución al 1% de almidón soluble Merck, regulando el pH a 5,4 con buffer de ácido acético-acetato de sodio. Se llevó a un termostato a 37° y se añadió 1 cc. del líquido de maceración.

Cada 5 minutos se retiró una muestra de 2 cc. y se tituló colorimétricamente con el método de Folin la cantidad de azúcares reductores producida, expresándola en glucosa.

Resultados:

//////

<u>Tiempo en minutos</u>		<u>mg. de glucosa por 100 cc. de líquido</u>
	Testigo	10
0	Almidón	8,5
	Completo	8,4
5		18,2
10		35,1
15		41,0
20		30,1
25		95,5
30		195,0
35		118,0
40		145,2
45		163,0
50		184,0
55		195,2
60		208,0
65		242,0
70		280,0
75		296,5

### Conclusiones

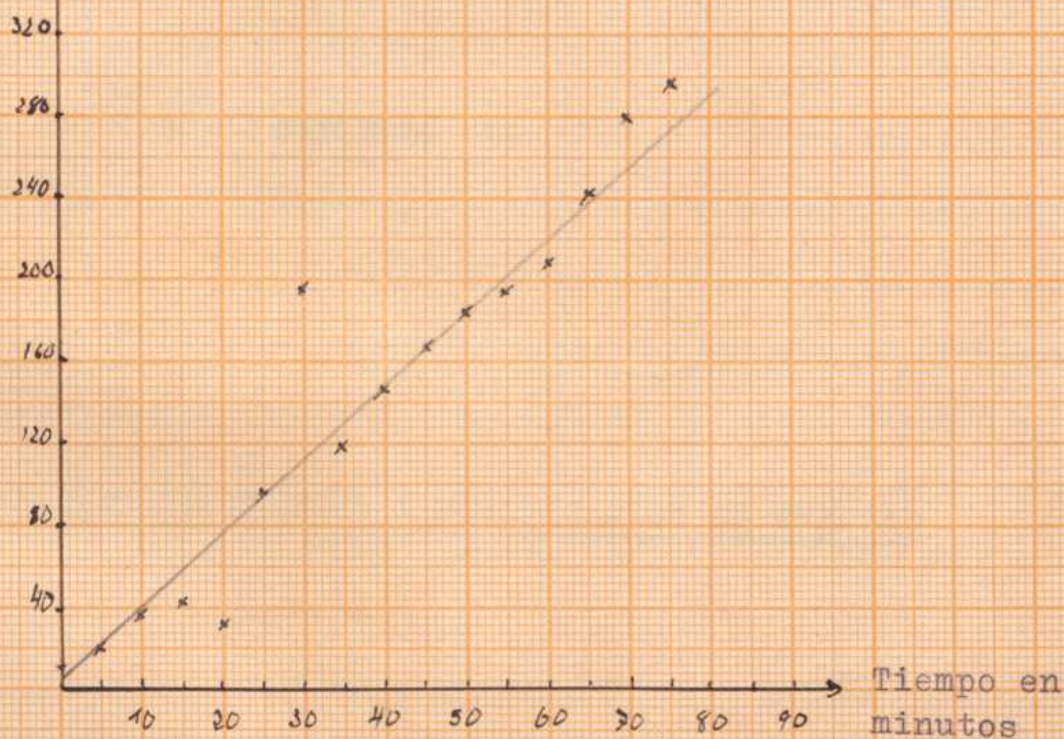
La cantidad de azúcar producida por unidad de tiempo es aproximadamente constante para la concentración de enzima existente en los líquidos de maceración empleados.

Se puede por lo tanto representar como una reacción monomolecular la hidrólisis del almidón en las condiciones indicadas.

El gráfico adjunto destaca las conclusiones indicadas.

# Curva de actividad en función del tiempo

Mg de glucosa  
producidos en  
100 cc de liq.



CAPITULO 52

ENSAYOS DE ENRIQUECIMIENTO Y PURIFICACION DE ENZIMAS



ENSAYOS DE ENRIQUECIMIENTO Y PURIFICACION DE ENZIMAS

Existen numerosas publicaciones sobre el enriquecimiento y purificación de las enzimas. Para las amiladas, sobre todo la de la malta, figuran los trabajos de Sherman, Caldwell y colaboradores, que llegaron hasta su cristalización.

Sobre las amilasas del *A. Orizae* hay un trabajo de Nishimura (18), quien llega a un producto con poder Lintner de 71.000°, aplicando el método de Willstatter, mientras las amilasas comerciales tienen valores Lintner que oscilan entre 2500 y 4000°.

En el libro de Thaysen y Galloway (11) sobre microbiología de almidones y azúcares se citan las conclusiones obtenidas hasta 1931 de los estudios sobre amilasas, y posteriormente aparecieron numerosos trabajos en el Journal of Biological Chemistry sobre sus aplicaciones. También en el Journal of Agricultural Chemistry del Japón figuran numerosos trabajos sobre las amilasas del *A. Orizae*, especialmente en lo que se refiere a las industrias del Sake, miso y salsa de soya.

En este capítulo se han agrupado los controles realizados sobre el producto comercial obtenido cultivando *A. Orizae* en afrecho, tendientes a la extracción y enriquecimiento de las enzimas.

No se intentó llegar a un producto puro, sino a obtener productos similares a los preparados comerciales, planteando las condiciones para un trabajo de tal naturaleza y adelantando la solución de algunos problemas de orden práctico.

Se trató de asegurar en primer lugar la conservación del poder amilolítico de los macerados enzimáticos obtenidos, ya que se los necesitaba utilizar durante los ensayos de enriquecimiento y solo se podían hacer controles comparativos manteniendo constante la actividad de los mismos.

/////

Se estudiaron luego las condiciones más apropiadas para la extracción de las amilasas con líquidos diversos, estableciéndose el tiempo óptimo de maceración y el número de extracciones para agotar el producto. Fijadas estas condiciones, correspondió probar los métodos de enriquecimiento para establecer su utilidad en este caso, y comparar los extractos obtenidos con algunos preparados enzimáticos comerciales, respecto de su acción sobre los mismos sustratos.

#### 1°- Conservación de los macerados

Los macerados obtenidos con la técnica habitual entran en putrefacción cuando se los deja a la temperatura ambiente, produciéndose también un nuevo desarrollo de *A. Orizae* por germinación de las esporas contenidas.

El uso de los antisépticos está limitado por las aplicaciones prácticas de los concentrados enzimáticos, debiendo eliminarse todos aquellos que pudieran introducir propiedades desagradables o nocivas en los productos alimenticios sobre los que deben actuar.

Se probó la acción del cloruro de sodio, en base al trabajo de Taichi Harada (15) que señala que a concentraciones de 10 a 20% de dicha sal se puede mantener el poder amilolítico en preparados líquidos.

Se ensayó luego la acción de algunos conservadores orgánicos, la acción del frío y el congelamiento.

##### a) Acción del ClNa.

Se probó sobre macerados frescos añadiendo ClNa sólido, en las cantidades indicadas en el cuadro adjunto. Se dejaron a temperatura ambiente y se controló cada cierto tiempo el poder amilolítico por el Wohlgermuth. Se controló también la aparición de contaminaciones.

ClNa %	T i e m p o e n d í a s					
	<u>0</u>	<u>3</u>	<u>7</u>	<u>14</u>	<u>28</u>	<u>60</u>
5	14,3	6,6	6,5	1	0	0
10	14,3	6,8	3,2	1	0	0
15	14,3	8,5	5,8	5,3	3,3	0
20	14,3	12,6	10,2	6,3	4,6	1,6
25	14,3	11,7	10,3	6,8	1,5	7
Testigo	14,3	6,1	8,0	0	0	0

(putrefacción)

El testigo es el macerado tal cual.

Cuando la disminución del poder amilolítico es muy grande, se nota una evidente putrefacción del líquido.

### Resultados

El cloruro de sodio a saturación inhibe la putrefacción de los líquidos en la mayoría de los casos. En algunos aparecen lentamente contaminaciones. Con la concentración óptima de ClNa (20%) el poder amilolítico se reduce a la mitad en 14 días.

#### b) - Influencia de conservadores orgánicos

Se ensayó la acción del cloroformo y del tolueno como conservadores de los líquidos de maceración. En la literatura figuran muchos más (114, 115, 116).

Resultaron útiles para impedir durante poco tiempo la putrefacción, pero su influencia en la conservación de la enzima, también es nula como en el caso del cloruro de sodio. Para emplearlo, el tolueno debe cubrir toda la superficie libre del líquido formando una pe-

////



queña capa; del cloroformo basta agregar 3 ó 4 cc. El poder amilolítico de los líquidos conservados en esta forma disminuye con el mismo ritmo que en el caso del cloruro de sodio. Se pueden emplear estos métodos de conservación para controlar propiedades, evitando la interferencia de las putrefacciones, pero no son aconsejables para el uso industrial.

c) Conservación en la heladera

Se guardaron líquidos de maceración directamente en la heladera, a temperaturas entre 0 y 5° C. Algunos frascos se llenaban completamente mientras otros se dejaron por la mitad. Cada cierto tiempo se titulaba el poder enzimático sobre almidón de papas y almidón soluble con el método de Wolgemuth.

Los resultados vienen resumidos en el cuadro siguiente:

<u>Tiempo en días</u>	<u>Título S</u>	<u>Título P</u>
0	14,0	15,1
2	13,2	13,9
5	13,0	13,8
15	13,3	13,6
30	12,9	14,0
60	12,1	12,8
90	10,8	12,5

Resultados

Es el método más cómodo de conservación por las pocas pérdidas que experimenta la actividad amilolítica. Después de 3 meses, muy pocos líquidos tenían olor a podrido y la actividad enzimática disminuye en un grado mucho menor que en los otros casos.

////

Observaciones

La fuerte acidez de los líquidos de maceración (pH 3), unido a una pequeña cantidad de cloruros, que llega a 6 ó 7 por mil, es un preventivo de la putrefacción y al mismo tiempo, la baja temperatura de la heladera impide la destrucción de las enzimas que se realizaría rápidamente por el ácido en primer lugar y luego por la temperatura ambiente que favorece igualmente su destrucción.

Creemos que hay que distinguir entre la putrefacción como causa de destrucción de la enzima y los otros factores que también actúan. Esto se hizo evidente en los ensayos 1º y 2º, donde se lograba éxito en impedir la putrefacción, pero no la destrucción de la enzima.

Conclusiones

Es el método industrial más práctico.

d) - Conservación por congelamiento

Los ensayos correspondientes a este medio se encontrarán en el capítulo de "Concentración de los macerados por congelamiento"

Es un método útil pero costoso respecto del anterior.

2° - Tiempo de maceración

Para llegar a un aprovechamiento más racional de los cultivos con poder enzimático se hicieron ensayos para fijar el tiempo óptimo de maceración del afrecho enmohecido, con una sola extracción del líquido.

Las titulaciones de los materiales obtenidos se hicieron con el Wohlgemuth modificado, a pH 5, con buffer ácido acético-acetato de sodio y cuidando que la concentración salina fuera menor de 0,01 M.-

Parte experimental

Se hicieron ensayos sobre cultivos en escala de laboratorio y semiindustrial.

El primero sobre 30 gr. de afrecho bien enmohecido en erlemeyer de 500 ml. Se agregan 200 cc. de agua esteril, se mantiene a 40° y se titula el poder amilolítico S y P cada cierto tiempo.

<u>Tiempo de maceración</u>	<u>Título S</u>	<u>Título P</u>
1/2 hora	5,33	5,40
1 "	9,20	9,30
2 "	9,40	9,60
24 "	9,80	9,60
48 "	7,60	9,38
72 "	6,12	9,10

El tiempo mínimo de maceración es de 1 hora, y el máximo conveniente de 24 horas.

El segundo sobre afrecho enmohecido en cacerola de acuerdo a la técnica semiindustrial. Se toman 15 gramos de afrecho seco bien esporulado y se ponen en maceración con 100 cc. de agua destilada esteril.

Se titula el poder amilolítico cada cierto tiempo, con la técnica anterior.

<u>Tiempo de maceración</u>	<u>Título S</u>	<u>Título P</u>
1/2 horas	4,33	8,15
1 "	8,10	15,26
2 "	8,13	15,00
4 "	8,05	15,10
24 "	8,00	14,95
48 "	7,60	14,20

Para evitar la putrefacción se agrega tolueno al cultivo.

### Conclusiones

En escala de laboratorio y semiindustrial, basta con 1 hora de maceración para obtener un macerado con buen poder amilolítico. La maceración puede efectuarse durante 24 horas a temperatura ambiente, pero hay ventajas en prolongar más el tiempo.

### 3°- Influencia de la cantidad de agua agregada

Convenía establecer la cantidad de agua más conveniente para la extracción de las enzimas durante la maceración, y determinar el número de extracciones necesarias para agotarlas.

### Parte experimental

Se trataron cantidades iguales de afrecho emmohecido de un mismo cultivo con cantidades crecientes de agua destilada. Se hicieron tres extracciones, macerando en cada caso durante una hora, filtrando a presión y repitiendo la misma operación por dos veces consecutivas. Se emplearon en todos los casos 100 gramos de afrecho emmohecido.

Cantidad de agua	Peso afrecho peso de agua	Titulo de los macerados (gr.almidón/gr.afrecho)		
		1a. extracción	2a. extracción	Total
300 cc	1:3	12,44	5,16	17,60
600 "	1:6	5,4	4,66	10,06
900 "	1:10	7,00	2,4	9,4

El resultado de la tercera extracción no se indica por ser inferior a 1 el título obtenido.

Los cálculos de la segunda maceración están hechos teniendo en cuenta el volumen de líquido de 1ª maceración que es retenido por el afrecho y cuyo poder amilolítico se ha determinado.

#### Conclusiones

- 1° - Resulta conveniente la realización de 2 extracciones.
- 2° - La cantidad de agua más conveniente es el triple de peso de afrecho enmohecido. A medida que aumenta la cantidad de agua disminuye el poder amilolítico total, pudiendo llegar al 50% del poder inicial.

#### 4° Precipitación de enzimas por el alcohol etílico.

Existen en la literatura estudios completos sobre las condiciones de precipitación por el alcohol de las enzimas de la malta, entre ellos los de Sherman, Caldwell y Doebbeling (41,42).

Los ensayos que planteamos para las enzimas del *A.Orizae* pretendían:

- a) Determinar la concentración mínima de alcohol necesaria para la precipitación total.
- b) Probar en los macerados acuosos de afrecho enmohecido las condiciones mejores de precipitación de las enzimas, controlando las amilasas.

c) Señalar las precauciones necesarias para el manipuleo y desecamiento del producto precipitado.

Estudiar a fondo las características de los precipitados obtenidos con miras a obtener enzima pura, escapaba a los fines concretos propuestos, y hubiera exigido controles comparativos con enzimas purificadas de otras fuentes (malta, pancreas, saliva), - sin que los resultados pudieran modificar fundamentalmente las aplicaciones industriales que interesaban comprobar.

Por esta razón se compararon los precipitados obtenidos con productos enzimáticos comerciales para determinar las diferencias en poder amilolítico y se ensayó asimismo el poder proteolítico.

a) Concentración mínima para la precipitación

Se hicieron ensayos de precipitación de enzima con cantidades crecientes de alcohol, controlando el poder amilolítico de los precipitados obtenidos de acuerdo a la siguiente técnica:

Se determina el poder amilolítico del líquido enzimático inicial. Se efectúa la precipitación con alcohol. Se centrifuga y separa por decantación. Se redisuelve en agua filtrando si queda residuo y se titula el poder amilolítico, refiriéndolo al volumen de líquido inicial, para hacer comparables los resultados. La titulación del líquido original por Wohlgemuth dió 15,4

<u>Volumen de líquido</u>	<u>% de alcohol</u>	<u>Observaciones</u>	<u>Título</u>
100 cc.	20	no ppta.	-
100 cc	40	no ppta.	-
100 cc	50	pptado.	0
100 cc	60	pptado.	5,9
100 cc	70	pptado.	15,2
100 cc	80	pptado.	15,1

El pH inicial del líquido se llevó a 7 por agregado de OHNa N/10.

### Conclusiones

Una concentración de 70% de alcohol etílico provoca la precipitación total de la enzima.

#### b) pH óptimo para la precipitación con alcohol

Se hicieron una serie de ensayos para determinar la influencia del pH en la concentración alcohólica necesaria para la precipitación de la enzima y fijar al mismo tiempo si la precipitación aumentaba con el tiempo.

Se determinó el poder amilolítico por el método indicado anteriormente, pero usando para la disolución del precipitado el mismo líquido enzimático original previamente inactivado a ebullición. De esta manera se eliminaba la posible influencia de la composición del medio. En una segunda serie de ensayos se empleó directamente como líquido de disolución el mismo macerado activo (cuyo título se conocía exactamente) y se hicieron paralelamente las titulaciones del nuevo poder, restando el correspondiente al macerado inicial. Los resultados obtenidos en los dos casos fueron semejantes:

Resultados obtenidos:

.

Concentración alcohólica	pH									Actividad del ppdo.						
	6,7			6			5,3			4,4			3,5			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
32%	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	±	+	+	
48%	+	+		+	+	±	-	+	+	±	+	+	-	+	+	< 50%
57,5	+	+		±	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	65%
64	+	+		+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	> 90%
68,5				+++	++		++			+			+			> 90%
72				++			++			±			+			> 90%
74,5				++			++			±			+			> 90%
76,5				±			++			-			+			> 90%
Observaciones	ppdocrist			idem			caseoso			muy fino			muy fino			

Los números 1,2 y 3 indican lo siguiente:

Nº 1: 10 minutos después del agregado a alcohol

Nº 2: 1 día " " " " "

Nº 3: 2 días " " " " "

Las cruces indican precipitación, y su número trata de expresar la variación en cantidad de precipitado.

La actividad del precipitado está expresada en relación a la actividad del líquido macerado inicial.

El cuadro anterior demuestra que no es necesario ajustar estrictamente el pH, ya que no influye en forma marcada sobre la cantidad de alcohol que produce la precipitación.

De acuerdo a las comprobaciones anteriores, se procedió de la siguiente manera:

Se neutralizaron los preparados enzimáticos a ligera acidez con papel tornasol. En algunos casos se produjeron precipitados, que se comprobó

////



carecían de poder amilolítico, por lo que se filtró directamente, para tener un líquido límpido. Se calculaba la cantidad de alcohol de 96° necesaria para llegar a la concentración deseada y se tomaba un volumen tal de líquido enzimático que, agregado el alcohol, se pudiera centrifugar comodamente de una sola vez en centrífuga de laboratorio (200 cc. en total). Los líquidos empleados se mantenían a menos de 10° de temperatura y la centrífuga se refrigeraba con hielo seco para mantener dicha temperatura. Los precipitados obtenidos se disolvían en el líquido enzimático inicial y se titulaban simultáneamente por el Wohlgermuth las soluciones acuosas obtenidas y los líquidos hidroalcohólicos residuales, a los que se les determinó además la graduación alcohólica por el método de uno de nosotros (102).

Previamente se efectuaron controles sobre la influencia del alcohol en la titulación del poder amilolítico con el Wohlgermuth, con resultados negativos.

El cálculo del poder enzimático se refirió en todos los casos al volumen total de líquido enzimático inicial utilizado, para comprobar si se producían pérdidas de amilasas durante el manipuleo del mismo. Las diferencias no pasaron en ningún caso del 3% del total.

### Conclusiones

A concentración alcohólica de 65° a 70° se produce una buena separación de enzimas amilolíticas. Por debajo de 60° se puede producir precipitación, pero el precipitado no posee poder enzimático.

A pH inferior a 5 los precipitados obtenidos son muy finos y van adquiriendo aspecto más cristalino por encima de 5.

El alcohol no destruye el poder enzimático trabajando con líquidos enfriados y haciendo inmediatamente las titulaciones.

Los precipitados obtenidos no se redisuelven totalmente en agua destilada o en líquido enzimático inicial. Dejan un residuo amorfo, de poder enzimático muy débil, mientras que la solución obtenida conserva más del 95% de la actividad inicial.

c) Poder proteolítico de los precipitados

Como en muchos preparados comerciales de enzimas del *A.Orizae* se utiliza la acción de las proteasas, interesaba comprobar en el precipitado obtenido por la acción del alcohol la presencia de enzimas proteolíticas, y determinar su actividad en relación a los líquidos enzimáticos iniciales.

Con la técnica empleada para la precipitación y redisolución, se obtuvieron soluciones acuosas del precipitado que se compararon en su poder proteolítico con iguales volúmenes de los líquidos enzimáticos iniciales y con los líquidos hidroalcohólicos residuales, empleando tres métodos distintos, que actúan sobre diferentes sustratos: albúmina, caseína y gelatina.

1°- Método de Hata, modificado por uno de nosotros.

Determina la hidrólisis de la albúmina de huevo coagulada.

2°- Método de Gross Fuld.

Mide la acción de la enzima sobre suspensiones alcalinas de caseína, posteriormente neutralizadas.

Los ensayos efectuados por estos dos métodos dieron en todos los casos resultado negativo, tanto en los macerados iniciales como en las soluciones acuosas del precipitado.

3°- Método de Willstätter y Waldschmidt-Leitz, modificado por

Macrae, en el que reemplazamos el indicador (timolftaleína por fenolftaleína).

Se ensayó de acuerdo a la técnica indicada en el capítulo sobre método de titulación de poder proteolítico, con los siguientes resultados:

		<u>Líquido inicial</u>	<u>Sol. acuosa</u>	<u>Liq. hidroalcohólico</u>
ml. OHK	0 hs.	1,6	1,8	1,5
N/20 al-	24 "	9,0	8,7	1,9
cohólico	48 "	9,8	9,1	2,2

consumidos.

### Conclusiones

- 1° El poder proteolítico de los macerados iniciales se mantiene casi constante en el precipitado por alcohol.
- 2° Los líquidos hidroalcohólicos residuales tienen muy bajo poder proteolítico.
- 3° El método no da valores absolutos, sino comparativos.

### d) Precipitación y redisolución fraccionadas

En ciertos macerados se observó que la adición de alcohol por etapas provocaba cuando se alcanzaba una concentración próxima a 50% una precipitación de sustancias proteicas que no tenían poder amilolítico.

Se encaró entonces la posibilidad de efectuar una purificación de las amilasas por precipitación fraccionada. Para ello se centrifugaron los precipitados inactivos producidos a 50% de concentración alcohólica y se separaron por decantación. Sobre el líquido restante se continuó agregando alcohol hasta precipitación. La redisolución del precipitado en agua dejó un residuo mucho menor, y la solución conservaba todo el poder amilolítico.

Sin embargo, como la precipitación inicial a 50% no se producía en todos los casos, se dejó a un lado este procedimiento, pero se aprovechó la observación para controlar la posibilidad de purificar el precipitado obtenido con alcohol al 70%.

### Parte experimental

10 cc. de macerado N° 11 se trataron con 30 cc. de alcohol de 96° en tubo de centrifuga. Producida la precipitación se centrifugó en frío refrigerando con hielo seco. Se obtuvo un líquido hidroalcohólico límpido (a) y un precipitado blanco grisáceo, que se separaron por decantación. El precipitado se puso en suspensión con agua destilada y se llevó su volumen a 10 cc.

Se volvió a centrifugar obteniéndose un precipitado (b) y un líquido opalescente (c) que se separaron por decantación. El precipitado (b) se puso en suspensión con agua destilada. Se llevaron las dos soluciones a 10 cc. y se tituló el poder amilolítico de (a), (b) y (c), comparándolo con el del macerado inicial (d) y haciendo un testigo con la solución de almidón soluble empleada (e). Se usó el método de Folin colorimétrico. Se empleó como sustrato 10 cc. de solución al 1% de almidón soluble Merck.

Del líquido hidroalcohólico (40 cc.) se tomaron 0,4 ml. para la titulación, a fin de tener la misma concentración que el líquido inicial. Los resultados se expresan en mg. de glucosa por cc. de líquido.

<u>Material</u>	<u>Volumen</u>	<u>Título</u>
(a)	0,4 cc.	0,2
(b)	0,1 "	0,2
(c)	0,1 "	5,6
(d)	0,1 "	5,68
(e)	-	0,2

//////

La solución acuosa de enzima se dejó en heladera durante varios días y se volvió a determinar su poder amilolítico, comprobando que <sup>se</sup> mantiene constante.

### Conclusiones

1° - Por alcohol al 70% se puede precipitar totalmente las enzimas amilolíticas de los macerados de cultivos de *A. Orizae*, y ponerlas nuevamente en suspensión, separándolas del precipitado proteico inactivo,

2° - La suspensión acuosa de enzima es estable.

#### e) - Conservación y manipuleo de los precipitados

Se efectuó la precipitación por alcohol de 70% sobre macerado

N° 11. Se separó por decantación la solución hidroalcohólica y se llevó a estufa a 37° el precipitado húmedo, dejándolo una semana hasta sequedad.

Al cabo de este tiempo se puso en suspensión con agua destilada el residuo seco, se centrifugó durante 3 minutos a 2500 revoluciones por minuto y se tituló el poder amilolítico del líquido opalescente obtenido. Resultó ser de 4,85 mg. de glucosa por cc.

### Conclusiones

El desecamiento de los precipitados en estufa a 37° disminuye un 15% aproximadamente su poder amilolítico. El producto obtenido es fácil de conservar y posee buena actividad.

#### f) Comparación del poder amilolítico con la Takadiastasa

Los ensayos anteriores llevaron a encarar la posibilidad de produ-

cir un preparado enzimático sólido, comparable en actividad amilolítica a la takadiastasa.

### Parte experimental

A 10 cc. de líquido de maceración (1:3) colocados en tubo de centrifuga se les añadió alcohol hasta llegar a 70%. Se centrifugó, se separó el líquido por decantación, se secó el precipitado impuro obtenido y se pesó, resultando 0,32 gramos.

Se suspendió este precipitado en 5 cc. de agua destilada y se volvió a centrifugar. Se separó lo más completamente posible por decantación, se agregaron al precipitado otros 5 cc. de agua destilada, se lo puso en suspensión y se centrifugó nuevamente, separando por decantación. Los líquidos reunidos alcanzaron a 9,6 cc. El precipitado inactivo restante se lavó con alcohol y desecó en estufa a 37° dando 0,21 gramos.

La solución acuosa conteniendo la enzima se llevó a otro tubo de centrifuga y se precipitó nuevamente con alcohol, obteniéndose un precipitado muy pequeño, que no se pudo extraer del tubo. Se centrifugó y se separó el líquido por decantación. El precipitado restante se puso en suspensión con 10 cc. de agua destilada, resultando una solución ligeramente opalescente, cuyo poder amilolítico, determinado por el Wohlgemuth, resultó semejante al que tenía el volumen de macerado del que se partió.

Se determinó igualmente el poder amilolítico de soluciones de distintas muestras de Takadiastasa, entre ellas la Parke Davis, resultando comprendido entre 250 y 400 gramos de almidón hidrolizados por gramos de producto.

### Cálculos

1 cc. de macerado equivale a 0,33 gramos de afrecho emmohecido.  
 Título del afrecho : 6,8 gramos de almidón por gramo de afrecho.  
 10 cc. de macerado producen 0,32 gr. de precipitado impuro activo  
 0,32 gr. de precipitado impuro equivalen a 3,3 gr. afrecho  
 1 gr. de precipitado impuro equivale a 10 gr. de afrecho emmohecido

Título del ppdo. impuro: 68 gr. de almidón por gramo de ppdo.  
 Peso del ppdo activo (2ª pptación): 0,08 gramos (por diferencia)  
 0,08 gr. de ppdo activo equivalen a 3,3 gr. de afrecho emmohecido  
 Título del ppdo activo (2ª pptación) :  $\frac{3,3 \times 6,8}{0,08}$

280,5 gr. almidón por gramo de precipitado

### Conclusiones

Se llegó a preparar en escala de laboratorio un producto sólido impuro, formado por una parte activa soluble en agua y una parte inactiva e insoluble en agua.

Se ha obtenido un producto sólido purificado, soluble en agua, de actividad amilolítica del orden de las takadiastasas comerciales.

### Observación

En estos controles se ha evitado emplear el grado Lintner como unidad, porque tratándose de eliminación de almidón no son equivalentes las actividades de amilasas de distinto origen respecto de su poder reductor (16).

### 5°- Concentración de enzimas por congelamiento

Los resultados de la precipitación con alcohol plantearon la necesidad de encarar la concentración de los macerados enzimáticos

iniciales, a fin de disminuir el consumo del mismo. Por otra parte, con extractos más concentrados el control estequiométrico de las determinaciones se puede hacer con mayor exactitud.

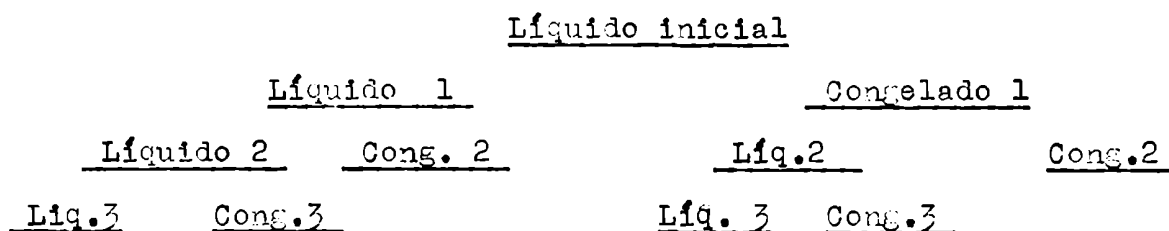
En la literatura no hemos hallado ningún detalle concreto sobre el método de congelamiento, fuera de la cita de su existencia. En los ensayos efectuados se estableció la siguiente técnica:

Parte <sup>X</sup> experimental

Se partió de macerados obtenidos por tratamiento de afrecho enmohecido con tres veces su peso de agua común, filtrados a presión y neutralizados a pH 7. Se pusieron en heladera y una vez producida la congelación se separaban dos porciones, una sólida y otra líquida, que se pesaron para establecer la proporción de cada una.

Se complementaron los ensayos en medio neutro con otros efectuados en medio ácido (pH 3) y en medio alcalino (pH 11).

Sobre el líquido obtenido se hizo un segundo y un tercer congelamiento y sobre el sólido se lo licuó primero y luego se hicieron dos nuevas congelaciones, de acuerdo al esquema siguiente:



Se determinó el poder amilolítico de las dos porciones obtenidas durante el primer congelamiento en medio neutro, ácido y alcalino, con los siguientes resultados:



	<u>Alcalino</u>	<u>Acido</u>	<u>Neutro</u>
Peso de liq.inicial:	81 gr.	82,3	81,4 gr.
Peso de liq.final 1 :	6,8 "	8,2	6,5 "
Concentración	11,9 veces	10,0 veces	12,5 veces
Título liq.inicial	4,2	4,2	4,2
Título liq.final 1 :	14,6	15,1	15,0

Estos resultados demuestran que conviene más trabajar en medio neutro.

Se efectuaron entonces controles para determinar el grado de conservación de la enzima, titulando con el método colorimétrico de Folin las dos porciones obtenidas por un primer congelamiento en medio neutro :

<u>Material</u>	<u>Cantidades</u>	<u>Título por gramo</u>	<u>Título total</u>
Liq. inicial	100,1 gr.	3,60	360
Liq. final 1	8,35 "	15,40	129
Congelado 1	91,75 "	2,46	226

La pérdida de poder amilolítico durante la operación es: 360 - 355,5, lo que representa aproximadamente 1,4 %.

En otros ensayos la pérdida llegó como máximo a 2,7%.

El aumento del poder amilolítico se puede seguir tomando la densidad de los líquidos con balanza de Mohr, haciendo previamente determinación de tal actividad para fijar la equivalencia de los valores.

Agregamos tres ejemplos de diferencia de densidad entre la porción sólida y la líquida producidas por un primer congelamiento:

<u>Líquido 1</u>	<u>Congelado 1</u>
1,0661	1,0118
1,0529	1,0154
1,0390	1,0048

Se estudió por último la posibilidad práctica de la triple congelación, controlando la variación del poder enzimático de las sucesivas porciones obtenidas.

Interesaba en primer lugar el líquido 1. Con él se efectuó una segunda congelación, separándose dos partes: Líquido 2 y congelado 2. No se pudo efectuar una tercera congelación del líquido 2 por la pequeña cantidad obtenida.

Como en el Congelado 1 contenía aún casi  $2/3$  del poder enzimático inicial, se lo volvió a licuar a temperatura ambiente y se efectuó con él una segunda congelación, obteniéndose un líquido 2' y un congelado 2' que se despreció.

El líquido 2' se volvió a congelar, dando una pequeña cantidad de líquido 3', y un congelado 3' que también se despreció.

Se determinó el peso y el poder amilolítico de cada una de las porciones obtenidas, con los siguientes resultados:

<u>Material</u>	<u>Peso</u>	<u>Título por gr.</u>	<u>Título total</u>	<u>Pérdidas</u>
Líquido inicial	100 gr.	3,60	360	a - (b+c)
Líquido 1:	9,9 "	13,9	137,9	5,9
Congelado 1:	90,1 "	2,40	216,2	354,1 b - (d+e) 3,8
Líquido 2:	1,2 "	43,6	52,3	
Congelado 2:	8,7 "	9,4	81,8	134,1 c - (f+g) 4,1
Líquido 2:	8,2 "	9,1	74,6	
Congelado 2:	81,9 "	1,68	137,5	212,1
Líquido 3'	0,9 "	28,3	25,4	

Se observa que aumentó la concentración con sucesivos congelamientos, pero al mismo tiempo disminuye la cantidad de enzima utilizable porque una parte pasa a los congelados que deben desecharse por su escasa actividad.

Conviene de cualquier manera utilizar el líquido 1 mezclado con el líquido 2', ya que son los de mayor volumen, obteniéndose así cerca de las dos terceras partes del poder enzimático total del macerado inicial.

Las pérdidas de poder enzimático son relativamente pequeñas.

### Conclusiones

1° - Por congelamiento se puede concentrar macerados enzimáticos.

La enzima se concentra fuertemente en la porción líquida después de la congelación.

2° - Por sucesivos congelamientos de ambas porciones se puede llegar a grandes concentraciones de enzimas, pero las pérdidas por dilución en el congelado limitan su aplicación. En la práctica conviene concentrar entre 5 y 10 veces.

3° - El poder enzimático disminuye poco durante el congelamiento y los manipuleos subsiguientes. No pasa en ningún caso del 3%.

4° - En trabajos de rutina se puede usar como control de la actividad enzimática el aumento de densidad de las porciones líquidas, estableciendo con una determinación previa la equivalencia de valores.

6° - Concentración al vacío

Se realizó un ensayo previo colocando una cápsula con líquido de maceración en un desecador al vacío conteniendo  $\text{SO}_4 \text{H}_2$ .

////

Se obtuvo después de un mes un residuo siruposo con poder amilolítico inferior al inicial.

Se abandonó este método por carecer de elementos para concentración a baja temperatura.

#### 7° - Preparación de un producto similar a la Polidasa C.

La polidasa C no es un producto purificado. Se trata en realidad de afrecho emmohecido tratado con alcohol para destruir las esporas, y prensado y desecado convenientemente.

#### Parte experimental

Se prepararon cultivos de *A. Orizae* en escala semiindustrial, sobre 500 gramos de afrecho. Una vez bien esporulados se trataron con suficiente cantidad de alcohol a 96° para que la concentración pasara de 70%, y se dejaron una hora. Se prensaron lo más perfectamente posible y se desecaron después en estufa a 37°.

Sobre el material original y sobre el material tratado con alcohol y desecado se determinó el poder amilolítico, comprobando una disminución de solo 5% sobre el inicial, expresando ambos en gramos de glucosa por gramo de afrecho seco,

#### Observaciones

El alcohol de 70° no extrae las amilasas del afrecho y destruye las esporas. Resulta así un producto con buen poder amilolítico, que no contamina los sustratos sobre los que actúa. Se conserva perfectamente. La actividad de este preparado no se pudo comparar directamente con la Polidasa C, pero su aplicación a la sacarificación de granos para la producción de alcohol permitió controlar los datos obtenidos con

////

los indicados en la bibliografía, resultando la actividad concordeante (110).

#### Conclusiones

Se ha preparado un producto similar a la Polidasa C.

CAPITULO 6º

APLICACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS A

OPERACIONES INDUSTRIALES

CAPITULO 6°- APLICACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS A OPERACIONES INDUSTRIALES

Los productos obtenidos con posibilidades de aplicación industrial fueron:

- 1°- Afrecho emmohecido desecado al aire libre.
- 2°- Afrecho emmohecido tratado como Polidasa C.
- 3°- Líquidos de maceración de afrecho emmohecido.
- 4°- Sólidos obtenidos por precipitación de dichos líquidos con alcohol de 70%.

Para los ensayos que siguen utilizamos solamente los tres primeros, ya que los últimos resultan demasiado costosos para tales aplicaciones.

Los controles efectuados abarcaron los siguientes puntos:

- a) - Clarificación de jugos de frutas
- b) - Purificación de pectinas
- c) - Producción de alcohol
- d) - Sacarificación de granos de cereales

Los distintos extractos enzimáticos empleados se compararon en su actividad con malta, pectinol D y takadiastasa.

a) - CLARIFICACION DE JUGOS DE FRUTAS

El objeto del tratamiento consiste en obtener una bebida clara, esteril y estable, que retenga el valor alimenticio y las propiedades organolépticas de la fruta fresca de la que proceden.

Para tales fines se aplican en la industria productos ricos en enzimas pectinolíticas, sustancias clarificantes de acción mecánica y enzimas "clarificantes", de acción compleja, pero cuyo efecto final es provocar una mayor velocidad de filtración y obtener un producto más limpio.

Es con estos motivos que se usa la malta (a veces con muy poco éxito),

y diversos productos enzimáticos elaborados con *Aspergillus Niger*, *Flavus Orizae*, *Tamarisii*, etc., y con *Penicillium* y *Rhizopus*.

Las patentes norteamericanas para el uso de tales productos son de los años 1924, 1930 y 1933. Las germanas son de 1937, utilizando *Aspergillus*. (ver Tauber. Enzyme Chemistry).

### Parte experimental

Se controló el aumento en la velocidad de filtración y la acción clarificante producidos en los jugos de frutas por los macerados enzimáticos o por el afrecho emmohecido, determinando el tiempo y la temperatura más convenientes.

#### 1° - Sobre jugo de uvas

Se empleó jugo de uvas preparado para producir vino, guardado en heladera y sin ningún tratamiento previo:

Cantidad de jugo	Cantidad de enzima	Actividad de la enzima	Relación <u>Enzima</u> <u>jugo</u>	Tiempo de acción	Temp.	cc. Filt. en igual tiempo	Aspecto del filtrado
100 cc.	Testigo	-	-	1/2 h.	30°	30	muy turbio
100 cc.	1 cc.	3,2 gr/cc.	1:100	1/2 h.	30°	59	turbio
100 cc.	10 "	3,2 gr/cc.	10:100	1/2 h.	30°	64	menos turbio
100 cc.	2 gr. afrecho	9,6 gr/gr.	2:100	1/2 h.	30°	66	menos turbio

A la temperatura de 30° y con media hora de maceración los resultados no son satisfactorios. Se observa que un aumento grande de líquido enzimático produce muy pequeño aumento de velocidad de filtración, sin clarificar completamente el jugo.



Observaciones

La cantidad de líquido filtrado se determinó empleando embudos del mismo tamaño, llenados de líquido hasta la misma altura al mismo tiempo. El líquido filtrado se recogía en probetas graduadas y se comparaba la velocidad de filtración y la limpidez respecto del testigo. Se efectuó un segundo ensayo a 50° de temperatura, manteniendo durante una hora la acción y filtrando después con la técnica indicada. Se emplearon diferentes concentraciones de macerados (expresados en cc.) y de afrecho emmohecido seco (expresados en gr.), con los siguientes resultados:

<u>Cantidad de jugo</u>	<u>Cantidad de enzima</u>	<u>Actividad de enzima</u>	<u>Relación enzima jugo</u>	<u>cc. filtrados en tiempo</u>	<u>Aspecto del filtrado</u>
100 cc.	Testigo			35	Muy turbio
200 cc.	2 gr.	9,6	1:100	94	Casi limpio
400 cc.	2 "	9,6	1:200	98	Casi limpio
600 cc.	2 "	9,6	1:300	90	Casi limpio
800 cc.	2 "	9,6	1:400	83	Casi limpio
1000 cc.	2 "	9,6	1:500	80	Casi limpio

Observaciones

- No se observó aumento del poder reductor en los líquidos filtrados respecto del líquido original, probados por el Fehling al ferricianuro. Esto hace suponer que la acción clarificante se basa más en la destrucción de proteínas y pectinas que en los almidones del jugo.

Conclusiones

Los líquidos macerados y el afrecho emmohecido actúan sobre los jugos

de uva disminuyendo su viscosidad y facilitando su clarificación por filtración.

Las mejores condiciones de tiempo y temperatura son 1 hora a 50°. Con afrecho tipo Polidasa C, se lograba suficiente clarificación a concentración 1: 500.

Los mismos resultados se mantienen en muestras de tres litros.

## 2° - Sobre manzanas

Se usaron manzanas "cara sucia" y "deliciosa". Se exprimieron en una prensa agregando agua destilada para que fuera pasando todo en forma de papilla, excepto la cáscara. El jugo obtenido no da color azul con el iodo, sino rojizo, lo que indica ausencia de almidón y presencia de dextrinas.

Se emplearon líquidos de maceración de poder amilolítico 3,2 y afrecho tipo Polidasa de poder 9,6, haciéndolos actuar a temperatura ambiente (20°-25°) durante tiempo variable:

<u>Cantidad de jugo</u>	<u>Cantidad enzima</u>	<u>Tiempo</u>	<u>cc. filtrad. en tiempo</u>	<u>Aspecto</u>	<u>Observaciones</u>
100 cc.	Testigo	1 h.	30	turbio	No se lee a través
100 cc.	1 cc.	1 h.	80	menos turbio	Se alcanza a leer a través del tubo
100	1 cc.	24 hs.	91	Límpido	Se lee perfectamente
500	1 gr.	1 "	77	menos turbio	Se alcanza a leer a través del tubo
500	1gr.	24 "	88	límpido	Se lee perfectamente

////

3° - Sobre naranjas

Se usó jugo de naranjas obtenido por expresión.

Se ensayaron distintas concentraciones y tiempos a dos temperaturas: los ensayos en 24 horas a temperatura ambiente (20-25°), y los ensayos en una hora a 50°.

<u>Cantidad de jugo</u>	<u>Cantidad enzima</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Temper.</u>	<u>cc.filtr.</u>	<u>Aspecto</u>	<u>Observaciones</u>
100	Testigo	1 h.	50°	38	turbio	no se lee
100	0,5 cc.	1 "	50°	94	menos turbio	se lee mal
100	4 cc.	1 "	50°	96	menos turbio	se lee mal
100	4 cc.	24 "	amb.	96	casi limp.	se lee mejor
100	1 gr.	1 "	50°	93	menos turbio	se lee mejor
100	1 gr.	24 "	amb.	96	casi limp.	se lee mejor
300	1 gr.	24 "	amb.	94	menos turbio	se lee poco
500	1 gr.	24 "	amb.	91	menos turbio	se lee mal

Conclusiones

Las muestras de jugo de naranja probadas no se clarifican bien con el afrecho tipo Polidasa C ni con los macerados enzimáticos.

4° - Sobre jugos de frutas elaborados industrialmente

Se efectuaron ensayos con jugos de frutas producidas en una fábrica y facilitados gentilmente en el momento adecuado de fabricación.

Se probó primero durante una hora a 50°.

////

<u>Jugo de</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Enzima</u>	<u>cc.filtr. en tiempo</u>	<u>Aspecto</u>	<u>Observaciones</u>
Ciruela	100 cc.	Testigo	30	turbio	no se lee a través
"	100 cc.	1 cc.	20	más límpido	se lee a través
"	300 cc.	1 gr.	35	más límpido	se lee a través
Manzana	100 cc.	Testigo	35	turbio	no se lee
"	100 cc.	1 cc.	35	más límpido	se lee
"	300 cc.	1 gr.	41	más límpido	se lee
Frambuesa	100 cc.	Testigo	32	turbio	no se lee
"	100 cc.	1 cc.	32	menos turbio	se lee poco
"	300 cc.	1 gr.	35	más límpido	se lee
Membrillo	100 cc.	Testigo	32	turbio	no se lee
"	100 cc.	1 cc.	35	menos turbio	se lee poco
"	300 cc.	1 gr.	38	más límpido	se lee

De acuerdo a estos resultados se ensayó con mayor cantidad de líquido y durante 24 horas a temperatura ambiente (20°- 25°). Estas condiciones son las adecuadas para el trabajo industrial, donde se dejan los jugos a los que se les ha agregado las enzimas, de un día para el otro a la temperatura ambiente, antes de filtrar.

<u>Jugo de</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Enzima</u>	<u>Aspecto</u>	<u>Observaciones</u>
Ciruela	500 cc.	5 cc.	límpido	Se lee perfectamente
"	500 cc.	1 gr.	límpido	Se lee perfectamente
Manzana	500 cc.	5 cc.	menos límp.	Se lee
"	500 cc.	1 gr.	menos límp.	Se lee
Frambuesa	500 cc.	5 cc.	límpido	Se lee bien
"	500 cc.	1 gr.	límpido	Se lee bien
Membrillo	500 cc.	5 cc.	límpido	Se lee perfectamente
"	500 cc.	1 gr.	límpido	Se lee perfectamente

Tanto los macerados como el afrecho tipo Polidasa C actúan bien como clarificantes de jugos de ciruela, frambuesa y membrillo, y algo menos eficazmente sobre jugo de manzana.

5° Ensayos comparativos con Pectinol D.

Se consiguió obtener en el mercado una pequeña muestra de Pectinol D, empleado especialmente como clarificante de jugos de frutas. Se efectuaron con él ensayos comparativos, preparando una solución al 1% y empleando 100 cc. de jugo para cada ensayo, agregando distintas cantidades y dejando 1/2 hora a 50°.

Los resultados obtenidos se indican en los siguientes cuadros:

a) - Jugo de ciruela

<u>Macerado</u>	<u>Pectinol D</u>	<u>Aspecto del filtrado</u>
2 cc.	-	Menos turbio
4 cc.	-	Límpido
-	2 cc.	Casi límpido
-	4 cc.	Límpido

Resultado

Se necesita doble cantidad de líquido de maceración que de Pectinol D al 1%. - Ambos resultaron eficaces.

b) - Jugo de manzana

<u>Macerado</u>	<u>Pectinol D</u>	<u>Aspecto del filtrado</u>
2 cc.	-	Menos turbio
4 cc.	-	Casi límpido
5 cc.	-	Límpido
-	2 cc.	Turbio y más oscuro
-	4 cc.	Turbio y más oscuro
-	5 cc.	Turbio y más oscuro

Resultado

El líquido de maceración es más eficaz que el Pectinol D para la clarificación de jugo de manzana.

Este último oscurece los jugos, dejándolos turbios.

c) Jugo de frambuesa

<u>Macerado</u>	<u>Pectinol D</u>	<u>Aspecto del filtrado</u>
2 cc.	-	Menos turbio
4 cc.	-	Casi límpido
5 cc.	-	Límpido
-	2 cc	Menos turbio
-	4 cc.	Casi límpido
-	5 cc.	Límpido

Resultado

El líquido de maceración y el Pectinol D actúan con igual eficacia en la clarificación de jugo de frambuesa.

d) Jugo de membrillo

<u>Macerado</u>	<u>Pectinol D</u>	<u>Aspecto del filtrado</u>
2 cc.	-	Casi límpido
4 cc.	-	Límpido
-	2 cc.	Menos turbio
-	4 cc.	Menos turbio
-	5 cc.	Más límpido

Resultado

El líquido de maceración es mejor que el Pectinol D para la clarificación de jugo de membrillo. Este último es poco eficaz.

Conclusiones

Se probaron líquidos de maceración y afrechos emmohecidos preparados como Polidasa D para la clarificación de jugos de frutas. Resultan eficaces para la mayoría de los jugos probados, en las condiciones industriales de tiempo y temperatura.

La comparación de los líquidos con solución al 1% de Pectinol D demuestra que ambos tienen una eficacia semejante.

b) -- PURIFICACION DE LICORES PECTICOS

El uso de las frutas en la fabricación de pectinas exige que se las emplee antes de su madurez, porque durante ésta se produce una considerable disminución de las mismas.

En ese momento los frutos contienen también cantidades considerables de almidones y sustancias proteicas, que resultan difíciles de separar de las pectinas por métodos físicos, y que es necesario hacerlo porque provocarían en los productos finales una turbidez indeseable. En la industria se emplean para tal fin preparados enzimáticos que se hacen actuar sobre los licores pécticos durante un cierto tiempo. Para probar la acción de los macerados enzimáticos y del afrecho tratado como Polidasa C se efectuaron ensayos comparativos con malta y takadiastasa Parke Davis.

Se emplearon licores pécticos procedentes de fábrica y listos para purificar y regulados o no en su pH.

Se probó únicamente la posibilidad de aplicación de los preparados enzimáticos sin efectuar un control riguroso de las condiciones, por cuanto no podíamos disponer de material en forma suficiente para hacerlo en la forma en que se practica en la industria.

Parte experimental

/////

1° - Con macerados

Se tomaron muestras de licor péctico, que daba color azul con el agua de iodo y se trataron con distintas cantidades de líquido de maceración a 38° de temperatura:

<u>Licor</u>	<u>Macerado</u>	<u>Reacción con sol. 0,01 N de I<sub>2</sub></u>			
		<u>1/2 h.</u>	<u>45'</u>	<u>1 h.</u>	<u>12 horas</u>
100 cc.	0,1 cc.	azul	azul	azul	violeta azulado
100 cc.	1,0 cc.	azul	azul	azul	incoloro
100 cc.	2,0 cc.	azul	azul	azul	incoloro
100 cc.	3,0 cc.	azul	viol.	incol.	incoloro
100 cc.	4,0 cc.	incol.	incol.	incol.	incoloro

2° - Con solución de Takadiastasa P.D. al 1%

<u>Licor</u>	<u>Takadiastasa</u>	<u>Reacción con sol. 0,01 N de I<sub>2</sub></u>			
		<u>1/2 h.</u>	<u>45'</u>	<u>1 h.</u>	<u>12 horas</u>
100 cc.	0,1	azul	azul	azul	violeta azulado
100 cc.	1,0	azul	azul	azul	incoloro
100 cc.	2,0	azul	azul	azul	incoloro
100 cc.	3,0	azul	azul	azul	incoloro
100 cc.	4,0	azul	azul	azul	incoloro

Conclusiones

De los dos ensayos anteriores resulta que los macerados enzimáticos resultaron más activos que la Takadiastasa Parke Davis al 1%.

3° - Con afrecho tipo Polidasa D y con Malta

Se empleó igual peso de afrecho y de malta (1 gr.) sobre 100



de licor péctico con los siguientes resultados:

<u>Material</u>	<u>Reacción con sol. 0,01 N de I<sub>2</sub></u>					
	<u>10'</u>	<u>20'</u>	<u>30'</u>	<u>50'</u>	<u>75'</u>	<u>12 hs.</u>
Afrecho	Violeta azulado	Violeta azulado	Violeta azulado	Violeta intenso	Violeta rojizo	Violeta claro
Malta	Idem	Idem	Idem	Violeta azulado	Violeta azulado	Violeta azulado

### Conclusiones

El afrecho enmohecido tratado como Polidasa C actúa en cantidades equivalentes a la malta con eficacia ligeramente mayor en la purificación de los licores pécticos.

La eliminación de los almidones es muy rápida, mientras que la descomposición de las dextrinas es más lenta en las condiciones en que se trabajó. El afrecho tipo Polidasa C. descompone las dextrinas mejor que la malta.

El tratamiento con afrecho produce de inmediato un aclaramiento del licor péctico. Se separan con facilidad los grumos y se filtra fácilmente, obteniéndose un líquido límpido.

### c) PRODUCCION DE ALCOHOL

La intervención de los hongos en la producción de alcohol etílico tiene dos aspectos: el empleo de los mismos como encargados de realizar la fermentación alcohólica (proceso Amyló primitivo (100 y 101), o el aprovechamiento de su poder sacarificante para obtener un mosto fermentescible a partir de materiales ricos en almidón, que se fermentan después con una levadura.

En este segundo caso se busca reemplazar el uso de la malta, que tiene algunos inconvenientes, por preparados enzimáticos obtenidos a par-

tir de cultivos de hongos (4).

La producción directa de alcohol a partir de materiales ricos en almidón por acción de mohos no tendrá aplicación hasta que se elimine el olor y sabor desagradables de las bebidas obtenidas. Es interesante en cambio probar la posibilidad de obtener por este medio, alcohol industrial, donde carezca de importancia sus caracteres organolépticos.

#### Parte experimental

Se siguió el proceso indicado por Underkofler, Fulmer y Schoene (57) para el ensayo de fermentación, pero sin contar la levadura encargada de producir la fermentación alcohólica.

Se procedió de la siguiente manera:

En un erlenmeyer de 500 cc. se introdujeron 50 gramos de harina de maíz y 250 cc. de HCl 0,04 N. Se hizo una cocción en autoclave a 1 y 1/2 atmósferas durante media hora. Se enfrió a 50° y se inocularon cantidades variables de afrecho emojecido de distintas procedencias (entre 5 y 10 gr. sobre base seca). Se agitó para mezclar uniformemente y se llevó a estufa a 30°. Después de 5 días de incubación se midió el volumen final y se destiló una parte alícuota. Sobre el destilado se determinó el alcohol por el método de uno de nosotros (102). El rendimiento se calculó respecto de la cantidad de almidón inicial, titulada según el A.O.A.C (103).

<u>Cultivo A.O.</u>	<u>% de afrecho respecto del maíz</u>	<u>Rendimiento en alcohol % del teórico</u>
24	10,4	5,9
26	18,6	5,1
77	10,2	4,6

////

Conclusiones

- La producción directa de alcohol por el hongo es pequeña en las condiciones empleadas. El rendimiento calculado respecto de la cantidad teórica de alcohol que debía producir es inferior al 6%.

d) - SACARIFICACION DEL MAIZ

En la industria del alcohol se tiende cada vez más al empleo de afrecho emmohecido como sustituto de la malta durante los procesos de sacarificación (78, 110).

Siguiendo la norma trazada, se controló en ensayos de laboratorio la capacidad de las cepas de *A. Orizae* para la producción de un buen maische de maiz, controlando su acción con un ensayo de fermentación.

Parte experimental

Los ensayos se efectuaron sobre 100 gramos de maiz molido empleando afrecho emmohecido de distintas procedencia y en concentraciones variables:

<u>Cultivo A.O.</u>	<u>% afrecho respecto del maiz</u>	<u>Rendimiento de alcohol % del teórico</u>
24	14	93
24	10	93
26	14	92,8
26	10	92,5

La técnica empleada está descrita en detalle en el trabajo de Roberts, Laufer, Stewart y Saletan sobre sacarificación de trigo por amilasas de hongos (110).

La cantidad de alcohol producida se determinó por el método indicado

(102) previa destilación del líquido alcohólico producido.

Conclusiones

El afrecho emmohecido con cepas de A. Orizae es un buen preparado sacarificante para la obtención de mostos a base de maíz.

.-.-

RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

- 1° - Se aislaron y estudiaron por primera vez en el país, cepas de *A. Orizae* de aplicación industrial.
- 2° - Se prepararon productos comerciales del tipo de la Polidex y de la Takadiastasa, ricos en enzimas amilolíticas.
- 3° - Se determinaron las condiciones fundamentales de óptima producción, actividad y conservación de dichos productos.
- 4° - Se comprobó su eficacia en la clarificación de jugos de frutas y en la purificación de pectinas, y se estudiaron las posibilidades de otras aplicaciones industriales.
- 5° - Como consecuencia de los ensayos efectuados, se acumularon experiencias sobre métodos de control y condiciones de trabajo para el aislamiento y purificación posterior de enzimas amilolíticas.

*Tracoli*

*Alfonso*

I N D I C E

Página

PARTE GENERAL

- 1° - Introducción.....
- 2° - Estado actual del problema ,.....
- 3° - Posibilidades teóricas y prácticas .....

PARTE EXPERIMENTALCAPITULO I . Aislamiento de cepas de Aspergillus orizae

- a) Aislamiento de cepas de Aspergillus orizae..... 12
- b) Sistemática microbiológica ..... 15
- Conclusiones ..... 19
- Medios de cultivo empleados ..... 20

CAPITULO II Comprobación de la actividad enzimática de las cepas obtenidas especialmente con respecto a las enzimas amilolíticas.

## 1- Control de métodos

- a) Métodos amilolíticos..... 24
- 1- Método original de Lintner modificado ..... 26
- 2- Método clásico de Wohlgemuth modificado ..... 28
- 3- Método de Waksman modificado ..... 31
- 4- Micrométodo de Sastri y Sreenivasaya ..... 31
- 5- Método cualitativo para seleccionar cepas con poder amiloclástico ..... 31
- 6- Método industrial para poder sacarificante..... 32
- Conclusiones ..... 32

b) Métodos proteolíticos	
1- Método cualitativo para la selección de cepas..	33
2- Método de Hata modificado .....	33
3- Método de Gross Fuld .....	34
4- Método de Willstatter y Waldschidt-Leitz modif...	34
Conclusiones .....	35
2 - Comprobación de enzimas en el A. orizae .....	36
a- Selección de cepas con poder amiloclástico ....	37
b- Enzimas del micelio joven del A.orizae.....	41
c- Comprobación de enzimas amilolíticas en exuda- dos .....	43

### CAPITULO III Condiciones de óptima producción y actividad enzimática

#### Condiciones de óptima producción

1 - Control de alimentos para el A. Orizae	
a- Productos naturales .....	46
b- Acción de carbohidratos .....	48
c- Influencia de las sales minerales .....	51
d- Acción de la humedad.....	52
2 - Control sobre factores ambientales	
a- Ensayos con medio de agar de Czapek .....	54
b- Ensayos con afrecho .....	57
1 - variaciones de pH .....	59
2 - variación del pH durante el desarrollo .....	59
3 - límites de pH .....	60
4 - control del tiempo de cultivo en la producción.	63
3 - Control sobre factores adversos al crecimiento	
1 - control de esterilización.....	65
2 - números del repique del cultivo .....	66
3 - toxicidad de los metales .....	67
4 - acción de antisépticos .....	68
<u>Condiciones de óptima actividad enzimática .....</u>	<u>71</u>

CAPITULO IVEnsayos de cultivo y de actividad en escala de laboratorio y semiindustrial con fines de aplicación práctica

1-	Cultivo en medio líquido	
a-	Velocidad de crecimiento .....	72
b-	pH óptimo en función del carbohidrato empleado ...	73
c-	Rendimiento en función del tiempo .....	73
d)	Influencia de la cantidad de almidón .....	74
e-	Poder amilolítico .....	74
	Conclusiones.....	75
2-	Cultivo en medio sólido	
a-	Ensayos sobre cantidades progresivas de medios de cultivo .....	76
b-	Control de temperatura .....	78
c-	Control de la cantidad de afrecho .....	79
d-	Control de la cantidad de azúcares fermentescibles.	79
e-	Control de humedad.....	79
f)	Control de contaminaciones.....	80
g)	Influencia del método de desecamiento sobre el poder.....	80
h)	Control del tiempo en la producción de enzima.....	83
3-	Evolución de la producción de enzimas en escala industrial	
	Conclusiones .....	86
4-	Factores que influyen en la actividad amilolítica de los macerados.	
a-	Resistencia al calor en función del pH .....	91
b-	Resistencia al calor en función del tiempo .....	93
c-	Influencia del pH .....	93
d-	Influencia de los electrolitos .....	94



	5	Curva de la actividad amilolítica de los macerados	98
<u>CAPITULO V</u>		<u>Ensayos de enriquecimiento y purificación de enzimas</u>	
	1	Conservación de los macerados	
	a-	Acción del cloruro de sodio .....	101
	b-	Influencia de los conservadores orgánicos .....	102
	c-	Conservación en heladera .....	103
	d-	Conservación por congelamiento .....	104
	2	Tiempo de maceración .....	105
	3	Influencia de la cantidad de agua empleada.....	106
	4	Precipitación de enzimas por el alcohol etílico ...	107
	a-	Concentración mínima para la precipitación .....	108
	b-	pH óptimo para la precipitación con alcohol .....	109
	c-	Poder proteolítico de los precipitados .....	112
	d)	Precipitación y redisolución fraccionadas .....	113
	e-	Conservación y manipuleo de los precipitados ....	115
	f-	Comparación del poder amilolítico con la Takadias- tasa .....	115
	5	Concentración de enzimas por congelamiento .....	117
	6	Concentración al vacío .....	121
	7	Preparación de un producto similar a la Polidasa C..	122
<u>CAPITULO VI</u>		<u>Aplicación de los productos obtenidos a operaciones industriales</u>	
	1	Clarificación de jugos de frutas .....	124
	2	Purificación de licores pécticos.....	132
	3	Producción del alcohol por el hongo .....	134
	4	Sacarificación del maíz .....	136
		Resumen de los resultados obtenidos .....	138
		Bibliografía .....	143

- (1). Sherman, Kendall y Clark.- J.Am.Chem.Soc. 32, 1073 (1910).
- (2). Sumner.- Annual Review of Biochemistry (1935).
- (3). Nord y Werkmann.- Advances in enzimology and related subjects (1941)
- (4). Takamine.- J.Ind.Eng.Chem. 824 (1914).
- (5). Bloede.- U.S.Patent 1.257.307 (1918).
- (6). Waksman.- J.Am.Chem.Soc. 42, 293 (1920).
- (7). Chim. Biol. 3, 51 (1921).
- (8). Anon. Jap.Med.Literature. 5, 44 (1920).
- (9). Compton. Proc. Roy. Soc. London. 92, 1 (1921).
- (10). Thom y Church.-Abstr.Bact. 6: 265-331, (1922).-
- (11). Brit. Patent. 179.012 (1921).
- (12). U.S.Patent. 1.437.816 (1922).
- (13). Fulmer y Werkmann.- Biochem. Z. 145, 442 (1924).
- (14). Terroine, Traitman, etc.-Comp<sup>t</sup> rend. 178,1488 (1924).
- (15). Harada.-Ind Eng.Chem. 23,1424 (1931).
- (16). Harada.-Ind.Eng.Chem.Anal.Ed.3,1,(1931).
- (17). J.prakt.Chem.34,386,(1886).
- (18). Bull Agr Chem.Soc (Japan) 2,129,(1926).
- (19). J.Soc.Chem.Ind.Japan.- 32, 243 (1929).
- (20). Funke. Rev. Trav.botan.Neerlandais. 24, 583 (1928).
- (21). J.Biol.Chem.Japan.- 11,111 (1929).
- (22). Yamagishi.- Science Repts.Tohoku Imp.Univ.- 3, 179 (1928).-
- (23). Prescott y Dunn.- Industrial Microbiology.- (1940).
- (24). Barham.- Ind.Eng.Chem.(anal.ed.).- 11, 31, (1939).
- (25). Challenge.- Jour.Chem.Soc. (1929).
- (26). Bull.Agr.Chem.Soc.Japan.- 5, 38 (1929).
- (27). Corvellino y Gregorini.- Gazz.Chim.Ital.- 60, 244 (1930).
- (28). Jour,Am.Chem.Soc.- 53, 774, (1931).
- (29). J.Am.Chem.Soc.- 53, 1651 (1931).
- (30). Gazz.Chim.Ital.- 63, 296 (1933).
- (31). Sastri y Sreevenivasaya.- Mikrochemie. 34, 14 (1933).
- (32). Barham y Smits.- Trans. Kansas.Acad.Sci.- 37, 91 (1934).
- (33). Friedeman.- Science.- 80, 34 (1934).
- (34). Barham.- Ind.Eng.Chem.- 28, 567 (1936).
- (35). Tauber.- J. Biol.Chem.- 113, 753 (1936).
- (36). Bergman, Ross.- J.Biol.Chem.- 111, 225 (1935).
- (37). J.Biol.Chem.- 111, 678 (1935).
- (38). J.Biol.Chem.- 111, 771 (1935).

- (39). Saul, Event y Nelson.- J.Biol.Chem.- 11, 95 (1935).
- (40). J.Biol.Chem.- 11, 411 (1935).
- (41). Caldwell y Doebeling.- J.Biol.Chem.- 110, 739 (1935).
- (42). Sherman, Caldwell y Doebeling.- J.Biol.Chem. 104, 501 (1934).
- (43). J.Gen.Physiol.- 14, 713 (1931).
- (44). Caldwell y Tyler.- J.Am.Chem.Soc. 53, 2316 (1931).
- (45). Sherman, Caldwell y Adams.- J.Biol.Chem. 88, 295 (1930).
- (46). Kitano.- Jour.Soc.Chem.Ind. Japon.- 40, 37 (1937).
- (47). Wallerstein. U.S.Patent 2.097.481 (1937).
- (48). Caldwell y Doebeling.- J.Am.Chem.Soc.- 59, 1835 (1937).
- (49). Biokimiya.- 1, 331,(1936).
- (50). Univ.Del Agr.Expt.Sta.Bull.- 204, 89 (1936).
- (51). Buger, Johnson y Peterson.- J.Biol.Chem.- 117, 429 (1937).
- (52). Kita.- J.Soc.Chem.Ind.- 38, 508 (1918).
- (53). Z.phisiol.Chem.- 250, 104 (1937).
- (54). Uemura.- J.Agr.Chem.Soc.Japan.- 13, 1146 (1937).
- (55). U.S.Patent. 102.315 (1914).
- (56). Warburg y Christian.- Biochem.Z.- 298, 150 (1938).
- (57). Fulmer y Underkofler.- Ind.Eng.Chem.- 31, 734 (1939).
- (58). Tokuoka.- J.Agr.Chem.Soc.Japan.- 15, 43 (1939).
- (59). Tokuoka.- J.Agr.Chem.Soc.Japan.- 15, 33 (1939).
- (60). Tokuoka.- J.Agr.Chem.Soc.Japan.- 15, 414 (1939).
- (61). Biokimiya.- 4, 50 (1939).
- (62). Kibi.- J.Agr.Chem.Soc.Japan.- 14, 1094 (1938).
- (63). Kibi.- J.Agr.Chem.Soc.Japan.- 12, 885 (1936).
- (64). Takeda.- J.Agr.Chem.Soc.Japan.- 15, 442, (1939).
- (65). Wallestein.- Ind.Eng.Chem.- 31, 1218 (1939).
- (66). J.Agr.Chem.Soc.Japan.- 15, 753 (1939).
- (67). Otani.- J.Agr.Chem.Soc.Japan.- 15, 59 (1939).
- (68). Iowa State Coll.J.Sci.- 14, 78 (1939).
- (69). Giral.- Fermentos (1939).
- (70). Biochem.J.- 557 (1938).
- (71). Chem.Zentr.B.- 1, 1887 (1939).
- (72). Chimie & Industrie.- 43, 3 (1940).
- (73). Comt.Rend.- 209, 244 (1939).
- (74). Ind.Eng.Chem.- 32, 544 (1940).
- (75). Chem.Industrie.- 52, 450 (1943).
- (76). J.Biol.Chem.- 144, 419 (1942).
- (77). Schultz, Fischer y Atkin.- Ind.Eng.Chem.(an.ed.) (1943).
- (78). Hai, Fulmer y Underkofler.- Ind.Eng.Chem.- 35, 814 (1943).

- (79). Ind.Eng.Chem. 32, 784 (1940).
- (80). Jozsa y Yore.- Ind.Eng.Chem.(an.ed.). 3, 1 (1931).
- (81). British Patent. 253.549 (1926).
- (82). Van Slyke.- Advances in Enzimology (1942).
- (83). Tadokoro.- Fac.of Agr. Hokkaido,Imp.University Saporu Japan (1926).
- (84). Falk.- The Chemistry of Enzyme acción.--(1924).
- (85). Euler.- Chimie der Enzyme.--(1925).
- (86). Smith.- Industrial Mycology.-- (1942).
- (87). Wohlgemuth.- Biochem.Z.- 39, 324. (1902).
- (88). Lintner.- J.Prakt.Chem.- 34, 386 (1886).
- (89). Feigl.- Qualitative Analysis by Spot Tests. (1939).
- (90). Tamiya.- Advances in Enzimology. 2, 183 (1942).
- (91). Sherman.- J.AM.Chem.Soc.- 43, 2454 (1921).
- (92). Atkinson.- Proc.Roy.Soc.London.- 32, 311 (1881).
- (93). Fruit.Product.J.- 17, 72 (1939).
- (94). Rona.- Biochem.Z.- 217, 42 (1930).
- (95). Akamatsu.- Biochem.Z.- 142, 184 (1923).
- (96). Matsumoto.-Acta Schol.Med.Univ.Imp.Kioto.- 285, 10 (1928).
- (97). J.Agr.Soc.Chem.Japan.- 15, 753 (1939).
- (98). Meyer.- Advances in Colloid Science.--
- (99). Uyemura.- Jour.Agr.Chem.Soc.Japan.- 15, 74, (1939).
- (100). Oshima y Church.- Ind.Eng.Chem.- 15, 67 (1923).
- (101). Owen.- Ind.Eng.Chem.- 15, 67 (1923).
- (102). Galli.- Z.Angew.Chem.- 36, 17 (1923).
- (103). Guagnini.- Rev Asoc.Bioq.Argentina,- 35, 13 (1944).--
- (104). A.O.A.C. 1940.--
- (105). Kitano.- Jour.Soc.Chem.Ind.Japan.- 40, 37 (1937).--
- (106). Wilstätter y Walaschmidt-Leitz.- Biochem.J. 23, 1229 (1933).
- (107). J.Biol.Chem.- 134, 301 (1940).--
- (108). Cruess.- Commercial Fruits.- (1939).
- (109). Kutez.- J.Agr.Exp.Sta.Bull.- 589, 1 (1930).
- (110). Marshall.-Fruits.Products.Jour.- 16, 329 (1937).
- (111). Roberts, Laufer y Stuart y Sanetan.-Ind.Eng.Chem. 36, 811 (1944).
- (112). Kenneth.- Iowa State Coll.J.Sci.- 16, 55 (1941).
- (113). Godwin. La industria Química Argentina.C.P.I. (1944).
- (114). Williman y Kertez.- Agr.Exp.Sta.Tech.Bull.- 178, 1 (1931).
- (115). Kopaczewsky.- Biochem.Z.- 44, 349 (1912).--
- (116). Meyers.- J.Am.Chem.Soc.- 40, 1713 (1918).--
- (117). Sherman y Wayman.- 43, 2454 (1921).

- (117). Thaysen y Galloway. Microbiology of Starch and Sugars. (1931).  
(118). Lafar. Handbuch der Technischen Mycologie. (1904 - 1914).  
(119). Sanguinetti.- Ann.Inst.Pasteur.- 11, 264, (1897).  
(120). Thom.- U.S.Dept.Agr.Bureau of Animal Ind.Bull.- 118 (1910).

-.-

Fichas referentes a cada capítulo.

Capítulo 1º.-

3 - 10 - 13 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 32 - 61 -  
84 - 85 - 97 - 120 - 118.-

Capítulo 2º.-

1 - 2 - 6 - 7 - 16 - 17 - 24 - 31 - 37 - 40 - 53 - 76  
77 - 79 - 80 - 86 - 87 - 88 - 102 - 103 - 105 - 117.-

Capítulo 3º.-

8 - 9 - 14 - 15 - 16 - 21 - 29 - 30 - 33 - 34 - 38 -  
39 - 44 - 48 - 51 - 52 - 54 - 58 - 59 - 60 - 62 - 66  
89 - 96 - 98 - 99.-

Capítulo 4º.-

4 - 5 - 19 - 22 - 55 - 63 - 67 - 72 - 78 - 82 - 112 -  
114 - 115 - 116.-

Capítulo 5º.-

11 - 18 - 20 - 35 - 36 - 41 - 42 - 43 - 45 - 46 - 56  
70 - 73 - 81 - 90 - 91 - 92 - 93 - 94 - 95 - 104 - 106.-

Capítulo 6º.-

12 - 47 - 49 - 50 - 57 - 65 - 68 - 69 - 71 - 74 - 75 -  
78 - 80 - 100 - 101 - 110 - 111 - 107 - 108 - 113 - 119.  
83.-

-.-