

Tesis de Posgrado

Estudios sobre la maceración del maíz en la industria del almidón : la participación de los microbios

Pisarello, Lía Elisa

1952

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pisarello, Lía Elisa. (1952). Estudios sobre la maceración del maíz en la industria del almidón : la participación de los microbios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0742_Pisarello.pdf

Cita tipo Chicago:

Pisarello, Lía Elisa. "Estudios sobre la maceración del maíz en la industria del almidón : la participación de los microbios". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1952. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0742_Pisarello.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

7.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIA EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE QUIMICA

ESTUDIOS SOBRE LA MACERACION DEL MAIZ EN LA INDUSTRIA

DEL ALMIDON - LA PARTICIPACION DE LOS MICROBIOS

TESIS: Presentada para optar al
título de DOCTORA EN QUIMICA

por

LIA ELISA PISARELLO

TESIS 742

1952

42

Al Dr. Volfrido Cordelli.

St Paul Ferranola.

FOFNA-BA.

INTRODUCCION. OBJETO DEL ESTUDIO. PLAN.

El problema de la maceración del maíz, procedimiento utilizado para facilitar la separación de los distintos componentes del grano por la molienda húmeda, ha cobrado un interés particular desde que fué descubierta la propiedad de los líquidos de la maceración, de activar considerablemente la producción de penicilina por el *Penicillium notatum* ó *Penicillium chrysogenum*.

Es conocido que el procedimiento de obtención de almidón de maíz, tiene su origen en el empleo del anhídrido sulfuroso en solución acuosa, con lo cual la separación del almidón del gluten fué facilitada extraordinariamente. La fábrica de Trieste, donde se originó el procedimiento de la maceración, fué el punto de partida de la difusión de tal técnica por los países de Europa y luego en los Estados Unidos. Basta con recordar la fecha en que este procedimiento fué introducido en la industria para imaginar que su naturaleza y desarrollo estuvieron originados por un empirismo inteligente. Es fácil ver hoy en día que aún en los centros de mayor progreso industrial, la adhesión a una técnica rutinaria es una cosa esencial.

Apenas se analiza un esquema de un procedimiento de maceración en contracorriente, en el que el agua conteniendo SO_2 llega al maíz de mayor tiempo de maceración y que los líquidos de mayor duración en el proceso se encuentran con los maíces más nuevos, (a una temperatura de $50^{\circ}C$ aproximadamente) es fácil imaginar que en esas condiciones las bacterias termófilas lácticas, que tienen por "habitat" los granos

//////

de cereales, deben multiplicarse abundantemente, apenas el contenido de anhídrido sulfuroso se reduzca suficientemente.

Al iniciar los trabajos para la realización de esta tesis tuve oportunidad de recibir información directa del Ing. Soriano y del Dr. Sordelli, acerca de la importancia de los microbios lácticos en la maceración industrial del maíz.

Fué sometida por el Dr. Sordelli la idea de averiguar la posible participación de las bacterias lácticas en la transformación de las sustancias extraídas del maíz y aún de las del mismo grano, en la formación de los elementos esenciales para la activación de la producción de penicilina. Como es natural, se pensó en la transformación de las sustancias proteicas como el proceso más importante.

El plan de tesis fué concebido con esa idea y se le dió la forma necesaria para obtener respuesta al problema planteado.

Plan de tesis

Estudio sobre algunas exigencias nutritivas de una especie del género *Lactobacillus*.

- 1) Exigencias vitamínicas. Determinación de las necesidades de las siguientes vitaminas: B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido fólico.
- 2) Exigencias nutritivas con respecto al nitrógeno. Determinación de la capacidad de desarrollo en medios de cultivo sintéticos con nitrógeno amoniacal, nítrico y orgánico en forma de aminoácidos, peptidos y otras combinaciones complejas del nitrógeno.
- 3) Exigencias nutritivas con respecto al carbono y su relación con las carbohidrasas.

//////

Se utiliza como objeto de estudio una serie de cepas de Lactobacillus aisladas del líquido obtenido en el proceso de fermentación láctica en la elaboración industrial del almidón de maíz.

Plan

- a) Buscar un medio de cultivo básico desprovisto de vitaminas a objeto de estudiar las exigencias vitamínicas del organismo aislado.
- b) Reemplazar las substancias nitrogenadas en el medio de cultivo completo hallado. Estudiar entonces las exigencias nutritivas de esas bacterias respecto al nitrógeno.
- c) Reemplazar en el medio de cultivo las substancias hidrocarbonadas y estudiar las exigencias con respecto al carbono y su relación con la producción de carbohidrasas.

Los resultados logrados con dos cepas de Lactobacillus, una proveniente de la maceración del maíz, No. 116, aislada por el Ing. Soriano, y el Lactobacillus casei No. 154 de la colección del Instituto Nacional de la Nutrición, nos dió oportunidad de ver que el tema de tesis podía ser satisfecho, pero no tendría el significado que se le atribuyó al comienzo. Después de una investigación bastante larga, y cuyos resultados no aparecen en el texto de la tesis, decidí, con el consejo del Dr. Sordelli, ampliar el campo de la investigación y profundizar ciertos puntos del problema de la maceración del maíz.

Los primeros exámenes bacteriológicos realizados por Soriano y Sordelli en la refinería de maíz en el año 1945, pueden ser resumidos de la siguiente manera: las 14 muestras fueron tomadas en relativamente corto intervalo de tiempo de las distintas cubas de fer-

//////

mentación (I á VII) siendo dichas muestras analizadas la misma tarde. De todas esas muestras se hizo examen en fresco y siembras por el método de las gotitas de Lindner, usando como medio de cultivo mosto de malta. Las mismas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires, en placas de agar. El número de cepas obtenidas fué relativamente grande y fueron separadas en grupos de acuerdo al tipo de colonias. Parecían todas ellas perteneciente a la misma especie y las variaciones observadas fueron consideradas de poca importancia taxonómica. También se hizo un aislamiento de las bacterias de una muestra (la muestra 2) previo enriquecimiento en mosto. Los cuadros adjuntos dan una idea mejor de los resultados obtenidos. El número que corresponde a la columna "maíz", indica el lugar que tiene el maíz en la serie de la maceración, es decir, que el maíz I es el que tiene menos tiempo de maceración y el VII el de mayor y por tanto el líquido que macera al I es el de mayor vida y el del VII el de menor. Podría decirse también que esos números designan la cuba en que se encuentra el maíz. El número II corresponde al maíz de una cuba que tiene más tiempo de maceración en cualquier momento que el maíz de la cuba I y así sucesivamente con los demás.

De la observación del cuadro salta a la vista que la acidez va creciendo con la duración de la vida de los líquidos, o si se quiere, a medida que el maíz tiene menos tiempo de maceración. Un comportamiento inverso tiene el anhídrido sulfuroso.

La densidad, es decir, el total de sólidos disueltos, crece con el número de extracciones que ha realizado el líquido de maceración

//////

y varía desde 1,50Bé para el líquido nuevo con anhídrido sulfuroso que se usa para macerar el maíz más viejo antes de la molienda, hasta llegar a 4,50Bé para el líquido que macera el maíz más nuevo y que está pronto para ser descargado del sistema. La influencia del anhídrido sulfuroso se muestran también sobre el pH, y su acidez mineral se hace notar prácticamente hasta la cuarta o quinta cuba. De ahí en adelante, la activación fermentativa y el aumento de las sustancias reguladoras por extracción del maíz, estabilizan el pH alrededor de 4,3.

En cuanto a la flora bacteriana, se puede decir, que en la cuba VII en la que se encuentra el anhídrido sulfuroso en una concentración elevada (0,176%) y en la cuba VI, donde dicha concentración es aún de 0,06%, no existen bacterias. A partir de allí y con una concentración de anhídrido sulfuroso menor, la multiplicación de las bacterias ocurre regularmente y su número aumenta considerablemente.

Solo parte de estas afirmaciones pueden ser deducidas del cuadro. La mayor o menor frecuencia de cada tipo de bacteria (en verdad se trata solamente de tipo de colonia), no parece modificarse mucho a lo largo del proceso de maceración y puede decirse que la colonia más representativa de la flora, es la No.2 prácticamente para todas las cubas donde hay multiplicación bacteriana.

Estas apreciaciones acerca de la frecuencia del tipo de colonia, se encuentran confirmadas, en términos generales, por el aislamiento realizado después del enriquecimiento hecho en el agua de maceración del maíz II, como puede verse en el cuadro siguiente, en que el tipo 2 de colonia es el más frecuente, siguiéndole el 4.

//////

El Ing. Soriano que estudió la propagación de las cepas representativas de cada tipo, considera que se trata de la misma especie del género Lactobacillus.

En los resultados que se expondrán figurarán también algunos de los que pertenecen al plan inicial de la tesis.

El plan de tesis original, que hubo de ser modificado, es el siguiente:

Plan

Estudios sobre la maceración del maíz en la industria del almidón. La participación de los microbios.

I) Introducción. Objeto del estudio. Plan.

II) La maceración del maíz en la industria.

Importancia industrial de los extractos de maíz.

Aplicación del "corn steep" en la producción de penicilina.

Distintos procedimientos de la maceración del maíz.

Mecanismo de la maceración.

Participación de los distintos factores: temperatura, acidez, anhídrido sulfuroso, microbios.

Ejemplos representativos del proceso industrial del "steeping".

III) Microbiología en el proceso de maceración.

La flora en los líquidos en maceración. Aislamiento de las bacterias.

Características de las bacterias aisladas.

Clasificación.

Discusión. Resumen. Conclusiones.

//////

Muestra	Marz	T. de Mac.	Ac. en ClF	SO ₂ %	DBé (17.5cc)	pH	(x) Tipo de Colodias							
							1	2	3	4	5	6		
1	I	1h 50'	.606	0.014	4.2	4.3	2	19	1	5	0	0	0	0
2	I	2h 20'	.769	0.026	4.3	4.3	0	14	2	0	0	0	0	0
3	I	4h 50'	.727	0.015	4.6	4.3	0	5	0	0	0	0	0	0
4	II	7h 15'	.606	0.017	3.6	4.3	0	9	1	2	0	0	0	0
5	II	9h 30'	.597	0.015	3.5	4.3	0	1	0	1	0	0	0	0
6	III	12h 15'	.585	0.013	3.3	4.3	0	8	1	4	0	0	0	0
7	III	14h 20'	.499	0.0145	2.7	4.3	0	4	0	0	0	0	0	0
8	IV	16h 50'	.442	0.016	2.5	4.1	0	11	1	2	1	0	0	0
9	IV	18h 50'	.389	.015	2.2	4.1	0	6	0	1	0	0	0	0
10	V	25h 15'	.378	.017	2.2	4.1	0	5	0	5	5	1	0	0
11	V	27h 10'	.343	.0245	1.8	4.1	0	1	1	0	0	0	0	0
12	VI	29h 45'	.224	.052	1.6	4.0	0	4	0	0	0	0	0	0
13	VI	31h 40'	.244	.060	1.3	4.0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	VII	34h 15'	.219	.176	1.5	3.5	0	0	0	0	0	0	0	0

- (x) Alislados por el método de Lindner.

2 87 7 21 11 1

II

La maceración del maíz en la industria. Importancia de los extractos de maíz. Aplicación del "corn Steep" en la producción de penicilina. Distintos procedimientos de maceración del maíz. Mecanismo de la maceración. Participación de los distintos factores: temperatura, acidez, anhídrido sulfuroso, microbios. Ejemplos representativos del proceso industrial del "steeping".

En la obtención industrial del almidón, gluten y otros productos del maíz, se utiliza un procedimiento de maceración de éste antes de la molienda.

Esta maceración se lleva a cabo, generalmente, mediante un proceso a contracorriente, en medio ácido con anhídrido sulfuroso, en una concentración que oscila entre el 0,1% y 0,2% en el comienzo del proceso.

El líquido que se obtiene al finalizar el proceso, llamado "crude corn steep liquor" ó "steep water", ó "light Steep", ó macerado de maíz, es concentrado hasta un 50-60% de sólidos y es usado en la preparación de alimentos para el ganado, y actualmente, en mucho mayor escala, como componente de medios de cultivos en las fermentaciones industriales, siendo de ellas, la fermentación penicilínica sin duda alguna, la más importante.

Con la adición de macerado de maíz a los medios para la producción de penicilina, el rendimiento aumenta considerablemente. Este hecho descubierto por Moyer y Coghill (4) al agregar macerado a una solución mineral modificada de Czapeck-Dox, ha contribuido al desarrollo de la industria de la penicilina, y creado un interés en el estudio de los macerados y en el rol que desempeñan los mismos en

/////

la fermentación penicilínica. Estos mismos autores estudiaron además, la acción que tienen las diferentes fracciones del macerado sobre dicha fermentación.

Bowden y Peterson (1) consideran la posibilidad de que la acción del macerado sea debida a la existencia en él, de alguna sustancia, del tipo precursor, que sería utilizada por el hongo para la producción de penicilina.

También Ligget y Koffler (2) admiten esa posibilidad, pero, teniendo en cuenta las distintas fórmulas de las penicilinas, piensan que muchos compuestos químicos podrían servir potencialmente como precursores. Sin embargo, de todos ellos, sólo han encontrado en el macerado, dos compuestos, la feniletilamina y tiramina, que podrían ser considerados como precursores de la penicilina G.

Trabajos realizados por Knight y Frazier (3) con cenizas del macerado, muestran que el agregado de las mismas a medios de cultivos que no contienen macerado, aumenta la producción de penicilina.

Según otro grupo de investigadores, una mezcla de histidina, arginina, ácido glutámico y ácido succínico, sería la responsable por lo menos en parte, del efecto estimulante del macerado.

La acción de macerados diferentes, por provenir de diferentes compañías, o por pertenecer a distintos lotes de una misma, fué objeto de estudio por parte de Bowden y Peterson (1).

La experiencia la realizaron usando para la producción de penicilina, frascos de 500cc. de capacidad, agitados en agitador de vaivén. Encontraron que para esas condiciones de la experiencia la concentración óptima de macerado es del 2% de sólidos del mismo, y que macerados provenientes de una misma compañía podían diferir tanto

//////

entre sí, o más que con los de otras compañías. Para volúmenes de fermentación mayores (botellas y tanques), en que las condiciones de aireación son diferentes, la concentración óptima de macerado es del 4% de sólidos.

También estudiaron macerados que habían sido incubados a temperaturas entre 38o y 54oC. No encontraron diferencias apreciables en la producción de penicilina, si se los comparaba con los mismos sin incubar. Tampoco encontraron relación entre las cantidades de ácido láctico del macerado y las de penicilina producidas.

En cambio, macerados fermentados durante 24 horas, con aireación, por *Saccharomyces cerevisiae*, aumentan la producción de penicilina, en algunos casos hasta un 20%; la adición de 1% de células de levadura al macerado, produce también un incremento en el rendimiento de penicilina.

Los ensayos realizados por los mismos autores con otras sustancias, que podrían reemplazar al macerado, demuestran la escasa acción, si es que la tienen en la producción de penicilina.

Observando los datos de la composición química del macerado, que figuran en la tabla siguiente, se puede llegar a la conclusión de que constituye un excelente material para medio de cultivo.

Tabla

Agua	45 - 55%
N total (Kjeldahl)	2,7 - 4,5%
N aminoácidos	1,0 - 1,8%
N(amoniaco)	0,15-0,4%
Az. red. (glucosa)	0,10-11%

//////

Ac.láctico	5,0-15%
Cenizas	9,0-10%
Ac.volátil(acético)	0,1-03%
SO ₂	0,00 9-0,015%

El 95% del N total estaría en el macerado como amoníaco y aminoácidos, de los cuales la alnina es el que se encuentra en mayor proporción.

Las vitaminas del grupo B, se encuentran normalmente en el macerado, con excepción de la tiamina que se encuentra o, en muy pequeña cantidad, o no existe, destruída probablemente por el anhídrido sulfuroso en el proceso de la maceración.

El uso del macerado en microbiología es bastante reciente,. Además de su utilización en la industria de la penicilina, otras fermentaciones industriales se realizan o con el uso del macerado como medio de cultivo o como parte integrante del mismo.

Es así como se utiliza el macerado en la producción de ácido glutámico y en la de amilasa por *Aspergillus niger*; en la producción de sorbosa por *Acetobacter suboxydans*; en la riboflavina por *Ashbya gossypii* y muchas más. Una lista de un mayor número de procesos en los que se utiliza el macerado, puede verse en el trabajo de Ligget y Koffler (2).

En el laboratorio también el macerado tiene una gran aplicación ya que puede ser por si solo, o como complemento, un excelente medio de cultivo para un buen número de microorganismos.

Como puede verse en texto de este trabajo, el agregado de macerado a un medio para *Lactobacillus*, nos permitió obtener un me-

//////

dio óptimo para el desarrollo de las cepas en estudio.

La maceración del maíz para la obtención de almidón, se realiza actualmente, por un proceso a contracorriente, en medio ácido, y que, si bien varía en los detalles de una planta a otra, es en principio el mismo.

Al principio se usaba un procedimiento con una sola fase, que consistía en macerar el maíz en una cuba de madera, con agua caliente (52°C), acidulada con anhídrido sulfuroso para inhibir el desarrollo microbiano, hasta que el maíz estuviera suficientemente blando para ser molido. El almidón obtenido en estas condiciones es de muy buena calidad por su alta viscosidad.

Hasta ese momento lo único que se aprovechaba era el almidón, y todo el resto del grano, un 25% del contenido en base seca, era eliminado (5).

Para evitar las pérdidas de las sustancias solubles, hacer economía de agua y poder cumplir con las disposiciones sobre contaminaciones de los ríos por las aguas industriales, se comenzó a utilizar para macerar, agua que ya había sido usada en alguna otra fase del proceso. Se comienza entonces a usar el sistema a contracorriente, que en líneas generales es el siguiente:

Una vez que el maíz llegado a la planta ha sido limpiado, por medio de aire, de todo material extraño que pudiera tener, es colocado en grandes cubas de madera, abiertas, que se encuentran ordenadas en series de dos o más. Se macera el maíz en la primera cuba durante un determinado número de horas, al cabo de las cuales se pasa el agua a un nuevo maíz, contenido en otra cuba, y se agrega

//////

agua más diluída al maíz parcialmente macerado. Se prosigue de esta manera hasta que todas las cubas del sistema estén en operación, enviándose en este momento a molienda el maíz de mayor maceración. Al mismo tiempo una cuba vacía se llena con maíz nuevo que se cubre con el agua "más vieja" del sistema. El agua después de haber pasado a través de todos los maíces es finalmente eliminada del sistema y enviada a los evaporadores donde es concentrada hasta un 50-60% de sólidos.

El agua que se usa en la maceración es por lo general la que tiene mayor contenido de substancias solubles, de las aguas residuales de la extracción del almidón. Generalmente se usa el agua que proviene de los tanques de sedimentación del gluten.

Antes de entrar a las cubas de maceración, el agua pasa a través de torres donde se adiciona de la cantidad necesaria de anhídrido sulfuroso. Luego es calentada hasta la temperatura a que se efectuará la maceración. La temperatura empleada generalmente es de 52o C.

La cantidad de anhídrido sulfuroso que se usa varía entre 0,15 y 0,20% en el comienzo del proceso. El pH del agua que entra al sistema es de 3,5, creciendo lentamente en el transcurso de la maceración, teniendo un pH de 4,0 á 4,3 en el momento de la salida. La concentración de anhídrido sulfuroso en los líquidos, va disminuyendo gradualmente llegando a ser de 0,05% cinco horas después de la adición, y 0,01% al cabo de 10 horas. El pH del grano de maíz, que inicialmente es de 6,3 baja en una forma muy marcada, y es al final de solo 4,0.

/////

El tiempo total requerido en este proceso es de 40 á 48 horas.

Desde el punto de vista de la obtención del almidón, este sistema presentaría algunas desventajas. Debido a la temperatura relativamente alta a que se efectúa la maceración, y a la acidez del grano, se produciría una hidrólisis del almidón que lo haría perder su viscosidad. Otra objeción hecha al sistema es que, el antiséptico se agrega sobre el maíz más viejo, mientras que al más nuevo que introduce microorganismos al sistema, solamente llega una cantidad muy pequeña de anhídrido sulfuroso.

Para evitar estos inconvenientes se han propuesto distintas medidas como por ejemplo, cambiar la manera de hacer circular el agua, la aplicación del germicida en el punto más conveniente y también usar otros antisépticos.

Según Ferr (6), lo más importante sería el cambio de la circulación del agua, y para demostrarlo detalla un sistema que a su modo de ver sería la solución del problema de circulación.

La maceración en medio alcalino, ya en desuso, también fué considerada para evitar la hidrólisis del almidón.

El anhídrido sulfuroso parecería tener como principales objetivos durante la maceración, producir un buen ablandamiento del grano, reducir ó inhibir a la actividad de los microorganismos y blanquear al almidón.

Cox, Mac Master y Hilbert, (7), estudiaron los efectos que el anhídrido sulfuroso ejerce sobre el grano de maíz, durante la maceración. Desarrollaron un método que les permitió seguir los cambios que se producían en la estructura proteica del grano cuando

está sujeto al proceso de maceración. El anhídrido sulfuroso facilitaría la separación del almidón de las proteínas que lo rodean. A su vez las proteínas se van dispersando, siendo la concentración de anhídrido sulfuroso y la temperatura los factores - que más influyen. A mayor concentración y a mayor temperatura corresponde una mayor dispersión de las proteínas. Esta acción del anhídrido sulfuroso parecería ser debida a su poder reductor más que a su acción como ácido.

La acidez es necesaria para favorecer la maceración. Sin embargo, maceraciones realizadas con ácido clorhídrico, acético ó láctico, en concentraciones equivalentes a las del sulfuroso, no han dado resultados satisfactorios.

Parecería que lo importante es la producción del láctico por fermentación durante el proceso y que fermentaciones reguladas permitirían una buena maceración. Altas temperaturas (53o-54oC) serían favorables, mientras que, temperaturas más bajas (38oC), darían lugar a fermentaciones alcohólicas y a reacciones de putrefacción.

Algunos ejemplos del proceso industrial de maceración pueden verse en las páginas siguientes de este trabajo, donde se exponen algunos datos correspondientes a dos tipos de maceración, que en aquel momento, se aplicaban en la Refinería Argentina de Maíz.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bowden John P., and Peterson W. H., Arch. of Bioch., 2:387 (1946)
- 2.- Ligget Winston and Koffler H., Bact. Rev. 12:297 (1947)
- 3.- Knight S. G. and Frazier W. C., Science 102:617-618 (1945)
- 4.- Moyer A. J., and Coghill Robert D., J. Bact. 51:57-58 (1945)
- 5.- Greenfield R. E., and Cornell G. H., Ind. and Eng. Chem., 39: 583-588 (1947)
- 6.- Kerr R. W., Chemistry and Industry of starch. Academic press. N.Y. 1944
- 7.- Cox Mary J., Mac Masters M., and Hilbert C. E., Cereal Chemistry XXI: 447-465 (1944)
- 8.- Palazzolo, Ana Z. Rossi de (Tesis)

III

Microbiología del proceso de la maceración. La flora en los líquidos en maceración. Aislamiento de las bacterias.

Ensayos semejantes a los realizados por Soriano y Sordelli, fueron llevados a cabo con materiales recogidos en la usina de Baradero de la Refinería Argentina de Maíz. De ellos dan cuenta los protocolos que se exponen a continuación:

Primer grupo de ensayos

El material fué recogido personalmente en el mes de Abril de 1948, en Baradero y corresponde a dos tipos de maceración que se llevaban a cabo simultáneamente en esa época.

El uno (a) es el de la maceración en contracorriente, en la cual el maíz más nuevo se encuentra con el líquido de mayor vida y el maíz más viejo con agua sulfurosa; el líquido más viejo, y que ha extraído al maíz de seis tinajas, sale del sistema. El otro (b), pertenece a un tipo de maceración de uso poco frecuente y que podría ser descripto como de "tipo cerrado", con maceración de maíces de tres tinajas, y también en contracorriente, pero sin eliminar el líquido más viejo. Cuando la densidad de las tres tinajas ha llegado a un límite adecuado, se la mantiene, drenando solo una parte del líquido más viejo. La permanencia de un maíz con un mismo líquido es mucho más larga que en el sistema de seis tinajas. (Más ó menos el doble).

a) Maceración de seis tinajas

Se han elegido tres tinajas para tomar muestras: una con el líquido más pesado, otra con el menos, y otra intermedio. Las mues-

/////

tras fueron tomadas en dos momentos típicos a saber:

- 1) en el momento de terminar la carga de un nuevo maíz, y
- 2) en el momento antes de la molienda y cuando va a comenzar la carga de un nuevo maíz.

1) Al terminar la carga

<u>Líquido</u>	<u>Temperatura</u>	<u>HCL%</u>	<u>SO₂%</u>	<u>oBé</u>	<u>Morfología de las bact. en el líquido</u>	<u>Cultivo en agar</u>
1 medio	43oC	0,30	0,05	1,8 a 20oC	Bast. cortos, sueltos de a pares y en cadenas cortas sinuosas. Gram positivos.	Colonia opaca y rug. algo chica y transparente
2 pesado	40oC	0,55	0,02	3,27 a 20oC	Idem	Colonias chatas y espir.
3 SO ₂	44oC	0,20	0,12	0,3 a 20oC	Bact. anal. a las ant. y alg. más largas de a pares y en cad. curv.	No hay cultivo

2) Antes de la molienda

4 medio	48,5oC	0,44	0,04	2,4 a 20oC	Bast. cortos sueltos y de a pares.	Colonias grandes rug. centro blanco, opaco corona clara
5 pesado	44oC	0,58	0,02	3,1 a 20oC	Bast. cortos en escaso número.	Colonias rug. muy pocas.
6 SO ₂	50oC	0,25	0,10	1,2 a 20oC	Bast. cortos. Alg. formas largas. Alg. Gram. negativos.	No hay cultivo

//////

La flora es uniforme; por su examen directo se ven bacterias del tipo *Lactobacillus*. Las bacterias están solas, de a pares y en cadenas cortas. La tendencia a presentar formas curvadas y de bacterias largas, parece vinculada a la alta acidez.

En cuanto al cultivo en medio apropiado, se observan colonias de una relativa similitud, y del tipo de los *Lactobacillus*. En general son pequeñas, claras y brillantes; las hay también más grandes, con centro opaco y de aspecto rugoso. El cultivo obtenido a la tensión del oxígeno atmosférico no es nunca muy abundante. La forma de las bacterias es la misma que la observada en el material original.

De los líquidos con 0,10-0,12% de SO₂ no se obtiene prácticamente ningún cultivo. Como conclusión se puede decir que en los líquidos de maceración con pequeña cantidad de anhídrido sulfuroso (0,05-0,02) hay una flora láctica de un solo tipo de bacteria.

Probablemente se trate de una sola especie, de la que parecería haber cuando mucho variante, a juzgar por el tipo de colonia y por la diferente morfología de las bacterias. Esta presunción fué ya omitida por Soriano y Sordelli en su primer ensayo.

b) Maceración de tres tinajas (tipo cerrado)

El maíz más nuevo tiene 8 horas de maceración

<u>Líquido</u>	<u>Temperatura</u>	<u>HCl%</u>	<u>SO₂%</u>	<u>oBé</u>	<u>Morfología de las bact, en el líquido</u>	<u>Cultivo en agar</u>
7 Medio	49°C	0,88	0,016	4 a 20°C	Bacterias largas, curvadas, en cadena Cram posit. Algunas bacterias cortas.	Colonias pequeñas, re- gulares, bri- llantes y rug. centro opaco

////

<u>Líquido</u>	<u>Temperatura</u>	<u>HCl%</u>	<u>SO₂</u>	<u>oBé</u>	<u>Morfología de las bact. en el líquido</u>	<u>Cultivo en agar</u>
8 Pesado	46°C	1,39	0,012	7,2 a 20°C	Muy semejante a la anterior, con predominio de formas mas largas. Gran neg.	Semejante a la anterior.
9 SO ₂	47°C	0,54	0,084	0,7 a 20°C	Parecido a las dos anteriores.	Colonias de borde irreg.

La abundancia de cultivo parece mayor que en la maceración de seis tinas.

La flora parece monobacteriana, y en el agua sulfurosa el cultivo es prácticamente nulo. Las bacterias aisladas son idénticas tanto en morfología de los individuos como de colonias, con las aquellas de la maceración de seis tinas.

En conclusión, las bacterias de la maceración del maíz son de un solo tipo tratándose sin duda de una bacteria láctica del género *Lactobacillus*. La presencia de anhídrido sulfuroso en concentración de alrededor de 0,15 es suficiente para tornar prácticamente estériles a las aguas de maceración.

La flora es más abundante a medida que el agua de maceración pasa a maíces más nuevos.

Segundo grupo de ensayos

El material sobre el que se realizó este grupo de ensayos, fué enviado por las Refinerías de maíz. Como en el caso del primer grupo de ensayos, las muestras fueron tomadas de tres cubas, correspondiendo una al líquido más pesado, otra al menos pesado y la otra al intermedio.

////

<u>Cuba</u>	<u>Líquido</u>	<u>Ar. en ClH%</u>	<u>SO₂%</u>	<u>Morfología de las bact. en el líquido</u>	<u>Cultivo en agar</u>
B.	10 Pesado	0,72	0,006	Bact. cortas y alg. largas.	Mucho desarrollo, colonias chatas.
	11 Medio	0,43	0,022	Bact. cortas en me- diata cantidad.	Pocas colonias del mismo tipo an- terior.
	12 SO ₂	0,29	0,072	Bact. cortas en ca- dena con ten. a en- curvarse. Gram posit.	No hay cultivo
C.	13 Pesado	0,72	0,006	Bact. cortas y coco- bacilos. Gram negativ.	Poco desarrollo. Colonias rugosas con centro umbili- cado. Borde irregu- lar.
	14 Medio	0,43	0,016	Bact. cortas sueltas y en cadenas.	Poco cultivo, co- lonias pequeñas.
	15 SO ₂	0,36	0,08	Bact. cortas en peque- ña cantidad.	No hay cultivo.
D.	16 Pesado	0,5	0,01	Bact. muy cortas en nú- mero relat. pequeño	Desarrollo abun- dante Colonias cha- tas y rugosas.
	17 Medio	0,40	0,04	Bact. cortas en general Gram positivas	Poco desarrollo. Colonias chatas y rugosas
	18 SO ₂	0	0,11	Bact. en número rela- tivamente escaso.	No hay cultivo
E.	19 Pesado	1,04	0,006	Bastones Gram posit. solos y en cad. cortas.	Desarro. abundante Colonias rugosas de cent. umbilica- do bordes irregu- lares.
	20 Medio	0,72	0,021	Muy pocas bacterias.	Gran cantidad de col. semejantes a las anteriores
	21 SO ₂	-	-	-	-
B1	22 Pesado	0,86	0,006	Bact. cortas sueltas y en cadenas. Gram posit.	Poco desarrollo.

/////

<u>Cuba</u>	<u>Líquido</u>	<u>Ac. en ClH%</u>	<u>SO₂</u>	<u>Morfología de las bact. en el líquido</u>	<u>Cultivo en agar</u>
	23 Medio	0,5	0,02	Bact. cortas en gran abundancia	.Poco desarrollo
	24 SO ₂	0,25	0,09	Bact. cortas en mediana cantidad.	No hay cultivo

Este ensayo es más completo, por cuanto las muestras fueron tomadas repetidas veces, seis, en el curso de un día, y representan los maíces en muy parecidos grados de maceración pero en diversas cubas, B, C, E y E₁.

La flora es semejante a la observada en los líquidos del ensayo anterior. Las formas son también aquí, bastones cortos en su mayor parte. Solo hay algunas bacterias largas. Los bastones, por lo general, están solos, de a pares o en cadenas cortas.

Las colonias observadas en el cultivo de éstos líquidos en autolizado de levadura-agar 2β-glucosa 1β, son algo diferentes a las observadas en el ensayo anterior. Predomina el tipo de colonia rugosa y chata. Algunas de ellas presentan bordes irregulares y centro umbilicado. Solo dos muestras dan el tipo de colonia pequeña y transparente. Podría atribuirse esta diferencia a la mayor permanencia de los líquidos a temperatura no óptima para el cultivo de la bacteria y en un medio sin contener maíz.

En conclusión, también en éste caso las bacterias pertenecen a un solo tipo y los macerados con más SO₂ son prácticamente estériles.

Características de las bacterias aisladas

Habiéndonos satisfecho con la uniformidad de los resultados en los ensayos de aislamiento realizados por nosotros, y que son com-

//////

parables a los obtenidos por Sordelli y Soriano, procedimos a elegir un número de cepas que estimamos representativas de alguna "variante", juzgada por su tipo de colonia tal como lo hicieran Sordelli y Soriano, y estudiamos algunos de sus caracteres morfológicos de cultivo. Los cuadros que se adjuntan contienen en forma de tabla las observaciones realizadas.

Aparte de la diferencia en la tinción con Gram y en la morfología, sobre la que parece influir la velocidad del cultivo de las bacterias en los medios que se hacen mas o menos precozmente ácidos, no se observa ninguna propiedad distintiva de gran valor taxonómico, en ninguna de las cepas. Estas reflexiones cuadran también a los resultados observados en el autolizado de levadura, a pesar de las diferencias apreciables de la intensidad de cultivo de las distintas cepas, así como de la floculación. Este hecho de la forma errática de los resultados de cultivos en autolizado de levadura con glucosa, ha sido un hecho que vimos mucho antes de intentar estos ensayos, cuando tratábamos de conocer las propiedades de una cepa aislada por Sordelli y Soriano, de los macerados de maíz.

El cultivo escaso o nulo, es común a todas las cepas en agar-extrato de carne. En agar-autolizado de levadura se observa un cultivo algo mejor aunque sí sin excepción muy poco abundante. En el medio sintético de Snell y Strong (8) para el cultivo de *L. casei*, donde éste crece con tanta facilidad, no se obtuvo crecimiento o apenas pareció insinuarse. Estas conclusiones fluyen de los datos expuestos en los cuadros siguientes: acerca de la forma de cultivo

/////

en distintos medios, cuya composición figura más abajo. Ellos revelan uniformidad de comportamiento de todas las cepas aisladas, lo cual confirma la afirmación ya hecha de que parecería que un solo tipo de bacteria participa en la maceración industrial del maíz.

Cultivo prov. de Steeping	Tipo de colonias en el cultivo de aislamiento	Tipo de colonia sobre agar-autolizado levadura	Tipo de colonia sobre agar-extracto carne	Desarrollo en medio sintético	Desarrollo en autolizado levad.	Carácter del cultivo en autolizado de levad.
	I	II	III	IV		
1)	Chica y clara	Chica y clara	0	0	3 +	"coposo"
2)	rugosa y chata	bordes irreg. centro oscuro opacas y rugosas	0	0	3 +	Flocula. Los copos se deshacen y producen turbidez.
3)	Chica y clara	Chica y clara	0	0	3 +	igual que el anterior
4)	Chata, opaca rugosa	Irreg.- centro marcado	0	0	4 +	
5)	Chicas y trans.	0	0	0	2 +	
6)	Chatas, espi- rales	Cultivo en toda la sup.	0	4 + (x)	3 +	
7)	Chata, irreg. opaca	Colonias muy irregulares. Formas como de bacteriófago Transp. y como con inclusiones más opacas	0	0	2 +	

Los medios I- II- III- IV- son los descriptos en pág. 18 19 y 20
 Los números corresponden a los de los cuadros de pág.
 1 y 2 comprenden a los macerados medio y pesado al terminar la carga
 4 y 5 " " " " " antes de la molienda
 6 " " al macerado pesado de la serie circular.
 (x) No fué establecido si se trataba de la misma especie que las
 7 restantes del mismo experimento.

Cultivo prov.de liq. Steeping	Tipo de colonia		Tipo de colonia y desarrollo so- bre extrc.de lev.		Tipo de colonia y desarrollo sobre agar		Desarrollo en medio sintético		Desarrollo en autol.de lev. Glucosa		Carácter del cultivo
	I	II	I	II	I	II	III	IV	III	IV	
B (1) 1)	Chata rugosa y clara		irreg. opacas	muy peq. en gran cant.	0	4 +	0	4 +	flócula, los co- pos se desnacen y prod.turbidez		
2)	Rugosa y opaca		peq.de bordes irreg. opac-rug.	no hay desa- rrollo	0	4 +	0	4 +	pequeños copitos		
D (2) 1)	Rugosa y clara		cultivo muy pobre	0	2 +	2 +	2 +	2 +	con copos		
2)	Rugosa y opaca		0	0	1 +	1 +	1 +	1 +			
E (3) 1)	Peg. y transp.		0	0	+	+	+	+			
E (2) 1)	Rugosa y opaca		forma irreg.centro oscuro, opacas	grandes, cla- ras, tenues	0	4 +	0	4 +	muy abundante sin copos		
2)	Rugosa y bri- llante		0	0	3 +	3 +	3 +	3 +			
E (1) 1)	Peg. y opacas		peq. y opacas	0	+	+	+	+			
2)	Rugosa y gran- de clara		0	0	2 + +	2 + +	2 + +	2 + +	turbidez sin copos		
3)	Chicas y trans.		peq.lisas y trans.	0	+	+	+	+			
4)	Rugosa, grande opaca		0	0	3 +	3 +	3 +	3 +	con copos		

Características de las bacterias aisladas

Introducción

A los efectos de realizar un estudio más metódico y ordenado de las cepas que habían sido aisladas, antes de buscar su ubicación sistemática, intentamos previamente una agrupación de las mismas en grupos uniformes.

El cuadro de la página siguiente da una idea de ese intento preliminar.

Como se podía presumir, esto no tuvo mucho significado, pues de los sucesivos cultivos, las bacterias revelaron formas de colonias diferentes de las que sirvieron para su agrupación. Esto sirve de explicación a la contradicción que aparece en algunos casos del cuadro siguiente cuando se compara la morfología de las colonias con la descrita para las mismas en páginas anteriores.

En pocas palabras se podría decir, que las variaciones observadas en las cepas aisladas no parecen ser ni importantes ni permanentes, por lo menos cuando se las juzga por los pocos caracteres que fueron determinados hasta el presente.

La selección de un número relativamente pequeño de cepas (diez) entre las cuales creíamos tener representantes de los diferentes "tipos" de bacterias lácticas aisladas por nosotros, no nos permitió adelantar mucho en nuestros intentos de estudio sobre la ubicación sistemática y manejo fácil de cultivos de tipo industrial, pues tropezamos al cabo de dos años largos de estudio con la misma dificultad que al comienzo, que era la de obtener un cultivo regular y

//////

Clasificación en grupo de los cultivos, de acuerdo al tipo
de colonia en medio de agar-levadura

- 2E5 Colonias grandes y opacas
- 2B2 "D9" Bordes irregulares, centro oscuro
- 2-2 Colonias grandes y opacas.
- 1-2 Colonias pequeñas y claras
- 2-3 "D1" Igual que la 11E2*
- 11E2 "D4" Colonias lisas transparentes.*
- 12E2 "D2" Colonias lisas transparentes.*
- 11E1 "D10" Colonias grandes, borde irregular, chatas, rugosas,
con centro más oscuro.*
- 12E3 Colonias pequeñas, borde irregular, chatas, rugosas, opacas.
- 4-1 "D6" Igual al 11E1.*
- 8D1 "D8" Igual al 2-1.*
- 2B1 "D7" Igual a 2-1.*
- 2-1 "D3" Bordes irregulares, centro oscuro, superficie rugosa.*
- 1-
- 1-1 Colonias pequeñas, claras.
- 4-2 "D5" Colonias muy tenues.*

* Todas las cepas marcadas en esa forma se eligen como tipo de un grupo, para hacer los ensayos de identificación.

abundante de las bacterias en medios líquidos y sólidos. Tres hechos nos llamaron principalmente la atención.

1o. Las bacterias cultivaban con relativa abundancia \pm 4000 millones por cm^3 , en los macerados de maíz industriales y también en los ensayos de reproducción experimental del proceso industrial.

2o. Dichas bacterias crecían escasamente en todos los medios de cultivos ensayados.

3o. Bacterias lácticas de colección, que podrían tener alguna analogía con las aisladas del "corn steep" cultivaban muy bien en los medios naturales y en los sintéticos ensayados, contrastando de manera notable los resultados con los logrados con las bacterias del "corn steep".

a) Exigencias nutritivas de las bacterias del "corn steep"

Estudio comparativo preliminar

Después del fracaso de los demás medios aconsejados por la literatura para el cultivo de las bacterias lácticas, decidimos utilizar el que pareció menos malo, el autolizado de levadura (extracto de levadura, agua de levadura, etc.).

Se utilizaron al comienzo indistintamente levadura de cerveza y levadura de pan, decidiendo por último, emplear la de pan a pesar del menor rendimiento de extracto seco para el mismo peso de levadura prensada.

Como resultado de las experiencias del plan de investigación de la maceración del maíz obtuvimos un macerado no fermentado, que fué transformado en un medio de cultivo estéril por filtración por

//////

Seitz, en el cual crecieron también medianamente las bacterias lácticas del macerado, elegidas para el estudio, las que fueron regularmente cultivadas en este medio, (macerado de maíz ó extracto de maíz) además de serlo en el autolizado de levadura.

El azar hizo que encontráramos el medio óptimo cuando se realizó un repique, con pipeta, de un cultivo en extracto de levadura a un macerado de maíz, creciendo las bacterias como no lo hicieran nunca (desarrollo de 8 a 10 mil millones por centímetro cúbico). Demás está decir que fué necesario llevar a cabo un buen número de ensayos para saber cual era la causa de ese crecimiento insólito.

En otro trabajo que trata de los factores de crecimiento requerido por las bacterias del "corn steep", se estudiará particularmente este asunto del medio óptimo para su cultivo, limitándonos ahora a decir que dicho medio óptimo está constituido por una mezcla en partes iguales de un autolizado de levadura de pan, esterilizada por el calor, y de un macerado de maíz, obtenido con agua saturada de cloroformo, filtrado por Seitz. En este medio líquido las bacterias del "corn steep" cultivan muy bien, rápidamente, y en el medio sólido (2% de agar), las colonias desarrollan rápidamente y son relativamente grandes.

En el curso del trabajo resolvimos limitar el número de cepas estudiadas a cinco, las que corresponden a 12E4, 2-1,4-2, 8D1, 2B2 y cuya designación de D2, D3, D5, D8, D9, fué luego cambiada por los números 1, 2, 3, 4, 5, que se utilizará en todo el trabajo. En el cuadro siguiente figura la equivalencia de términos que sirve pa-

//////

ra establecer el origen de cada cepa.

Designación original	Designación provisoria	Designación definitiva	Aislada del líquido:	Corresponde a grupo(pag. (18-21)
12E-4	D2	1	Pesado (Mac.6 tinas)	19
2-1	D3	2	Pesado (Serie circular)	8
4-2	D5	3	Medio (mac. 6 tinas)	1
8D-1	D8	4	Pesado (Mac. 6 tinas)	16
23-2	D9	5	Pesado (mac. 6 tinas)	10

El cultivo de estas cinco cepas fué estudiado cuidadosamente en ensayos repetidos muchas veces utilizando medios sintéticos apropiados al desarrollo de las bacterias lácticas más exigentes del género *Lactobacillus*, incluyendo al *L. lactis* y *L. leichmanii*, sin lograr que cultivaran o cuando lo hicieron fué en grado muy escaso, hecho que de por sí parecería diferenciar de manera terminante las bacterias del "corn steep" de las demás bacterias lácticas utilizadas en la comparación.

b) Morfología de las colonias y de las bacterias

Las fotografías de las páginas siguientes permiten apreciar el tipo de colonia y el de las bacterias crecidas a 37°C, en medio y sólido y líquido respectivamente.

Se utilizó el medio de maíz-levadura en partes iguales.

Como término de comparación se presenta la documentación correspondiente a colonias y bacterias de las especies *L. plantarum*,

//////

L. fermentii, *L. casci* y *L. delbrueckii*, utilizando el mismo medio para su cultivo.

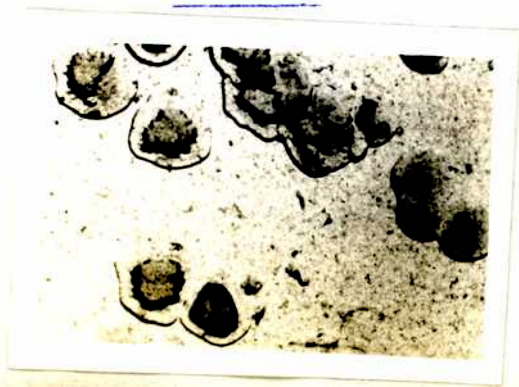
Las colonias fueron observadas en un medio sólido, al 2% de agar en el medio básico maíz-levadura. La siembra fué hecha diluyendo un ansa de cultivo de 16 horas a 37°C en el medio maíz-levadura líquido, en 0,2cc de agua de maíz. De esa dilución, se tomó un ansa que se extendió con espátula de Drigalsky en la placa de Petri con el medio sólido. Fueron incubados a 37-40°C en una atmósfera de nitrógeno con \pm 6% de oxígeno, dentro de un secador cuya atmósfera fué mantenida a una humedad conveniente por la adición de 5cc de glicerina en el fondo. A las 48 horas el cultivo es muy abundante. Se dejan las placas a temperatura ambiente al aire, y se sacan fotografías a las 96 horas de la siembra.

A pesar de que las fotografías son bastante ilustrativas, es conveniente describirlas, pues algunos detalles observados con el microscopio no pueden ser vistos en la documentación fotográfica.

Todas las colonias revelan una elevación central más o menos marcada, que es un carácter que entendemos importante para la diferenciación de todas las cepas aisladas, de las otras que sirvieron como término de comparación. La descripción de cada una de ellas, obtenida por la observación al microscopio y por inspección directa es la siguiente:

Cepa 1

Todas las colonias muestran elevación central más o menos marcada, que hace parecer más intenso el color amarillento que



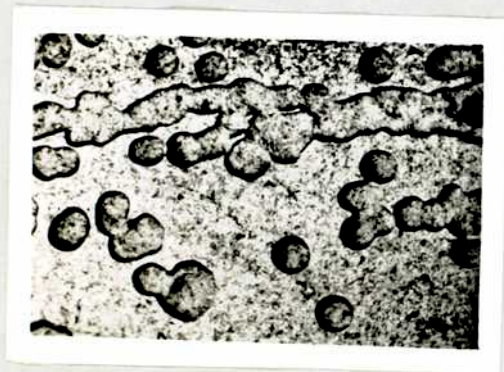
//////

Cepa 1

tiene la colonia. No se nota un borde diferenciado, de modo que no existe depresión central.

Cepa 2

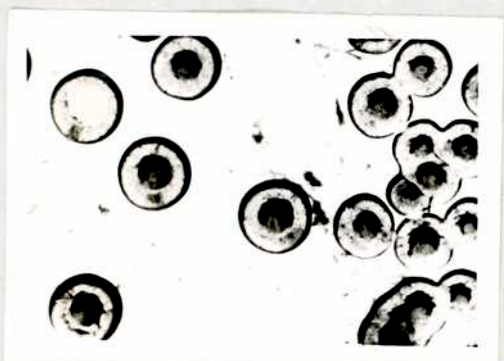
Análoga al tipo 1, pero la elevación central más marcada. Hay un reborde diferenciado que hace aparecer una zona circular de depresión, que se ve en la mayor parte de las colonias de la ilustración. El color es también amarillento.

Cepa 3

Distingue a ésta la falta de color de las colonias, y además, que son bastante transparentes, existiendo sin embargo muy pocas con un color amarillento o si se quiere, menos transparentes, que las hace parecer amarillentas, de tal modo que estas colonias aparecen muy diferentes en la fotografía. Se podría decir que es semejante a la 2, pero las características están muy atenuadas. Muestran estas colonias, como las de la cepa 2, un reborde y una depresión circular.

Cepa 4

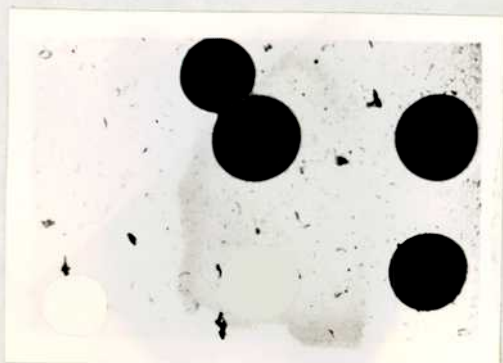
Análoga a la cepa 2, pero la zona central intermedia y periférica es mucho más marcada, a pesar de que la fotografía no lo revela claramente.

Cepa 5

El centro es elevado como en la cepa 1, pero son más regulares las colonias y más nítidos los bordes, lo que podría ser debido al mejor cultivo obtenido en el medio de agar. No existe reborde y por tanto está ausente la depresión circular.

L. casei

El cultivo es muy abundante, las colonias son elevadas, de bordes lisos y de superficie lisa: son opacas y de color amarillento, no observándose textura alguna en su interior. No hay elevación central ni en el borde, ni ninguna de las características que distingue a las 5 cepas descritas anteriormente.

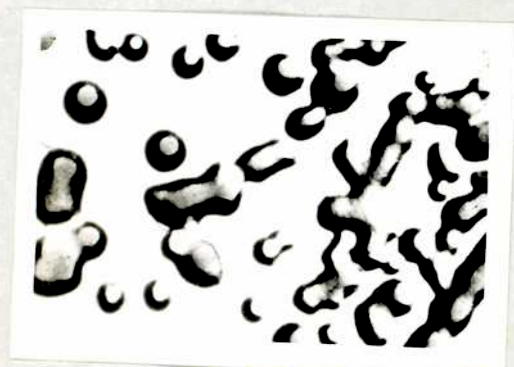
L. plantarum

El aspecto de las colonias es muy semejante al *Lactobacillus casei*.

//////

L.fermenti

Colonias convexas no elevadas, sin textura, sin centro elevado, ni borde. Se diferencia del *L.casei* y del *L.plantarum*. Son menos coloreadas y opacas que *L.plantarum* y *L.casei*, y se pueden diferenciar bien de estas dos y también de las cepas 1, 2, 3, 4, 5.

L.delbrueckii(?)

Tiene semejanza con el *Lactobacillus casei* y también con el *Lactobacillus plantarum*.

Morfología de las bacterias

Los Preparados se hacen de un cultivo de 22 horas a 36°C. Se centrifuga el cultivo y del sedimento tomado con un ansa muy pequeña se hace una extensión en un porta, sin frotar, de modo que el preparado seque muy rápidamente. Las bacterias fueron coloreadas por el método de Gram-Nicolle.

Las fotografías fueron obtenidas con 1320 aumentos.

La mayor parte de las bacterias son Gram positivas y una menor proporción toman debilmente el Gram.

Las cepas 1, 2, 3, 4, 5, muestran una morfología semejante, aunque difieren especialmente en la longitud. De ellas la cepa 4,

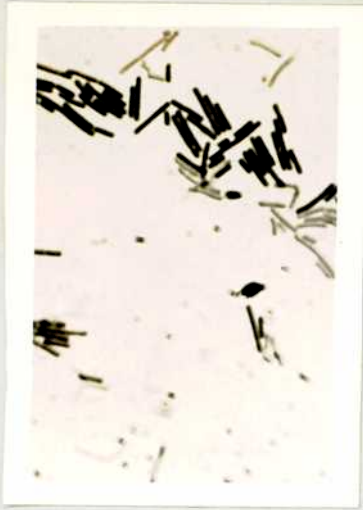
se diferencia substancialmente por una mayor longitud de los bastones, por su tendencia a disponerse en forma filamentososa y a constituir como haces por asociación paralela de varios filamentos.

Las especies *L. casei* y *L. delbrueckii* tienen una cierta semejanza en la disposición de las bacterias, aunque es más evidente en *L. delbrueckii* la existencia de pequeñas cadenas de pares de bacterias. Sus dimensiones son también las más parecidas.

En cuanto al *L. fermenti* tiene analogía con las cepas 1, 2, 3, 4, y 5.

En el cuadro de la página siguiente figuran las dimensiones.

Copa	Origen	Gram	Dimensiones	Morfología	Colonias
1	liq. 12E-4	post.	2-4,5x0,6 μ	bastones	amar. convexa sin borde nit.
2	liq. 2-1	post.	2,3-4x0,7 μ	bastones	elev. central marcada. Zona circ. de depresión
3	liq. 4-2	post. y neg.	1.5-3x0.5 μ	bastones	trans. lepr. cent. y reborde
4	liq. 6D-1	post.	2,3-5x0,6 μ	bastones y filamentos	análogo a la 2
5	liq. 2E-2	post.	2,3-4x0,5 μ	bastones	del tipo de la 1
L. casei		post.	1,5 x 0,4 μ	bastones cortos	elev. bordes y sup. lisos.
L. plantarum		post.	0,7-1,5x0,7 μ	bastones cortos	parecidos al L. casei
L. fermenti		post.	1.5-3x0,6 μ	bastones	conv. no elev. sin cent. elev. ni borde
L. del-brueckii	Colec. Ing. Soriano	post.	1-2 x 0,5 μ	bastones	semej. a L. casei y L. plantarum



Cepa 1



Cepa 2



Cepa 3



Cepa 4



Cepa 5



L. casei



L. plantarum



L. fermenti



L. delbrueckii(?)

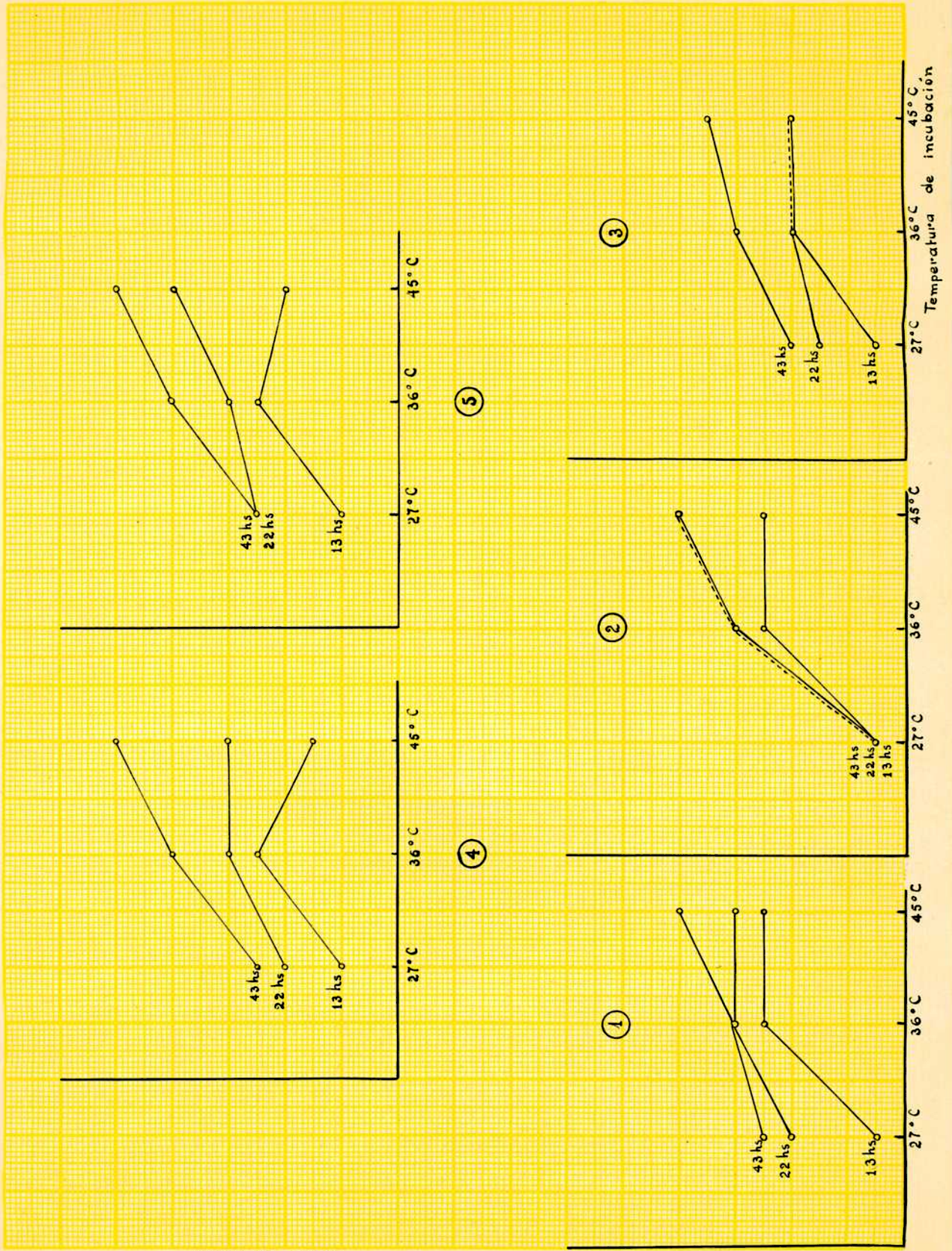
c) Temperatura óptima de cultivo

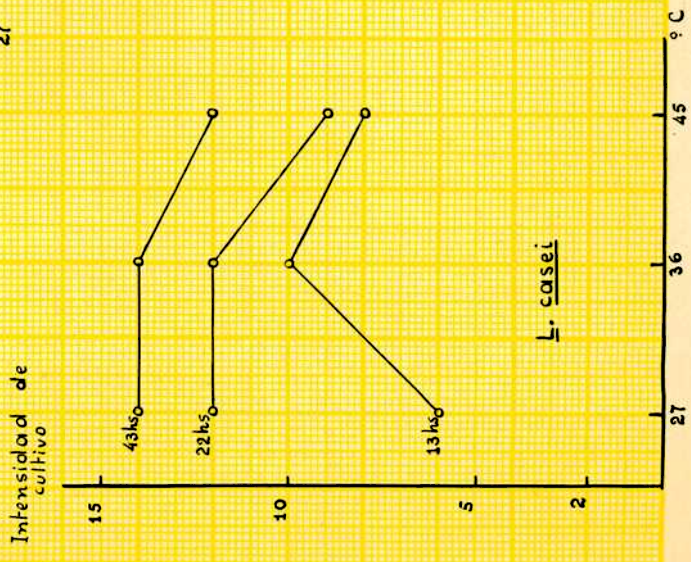
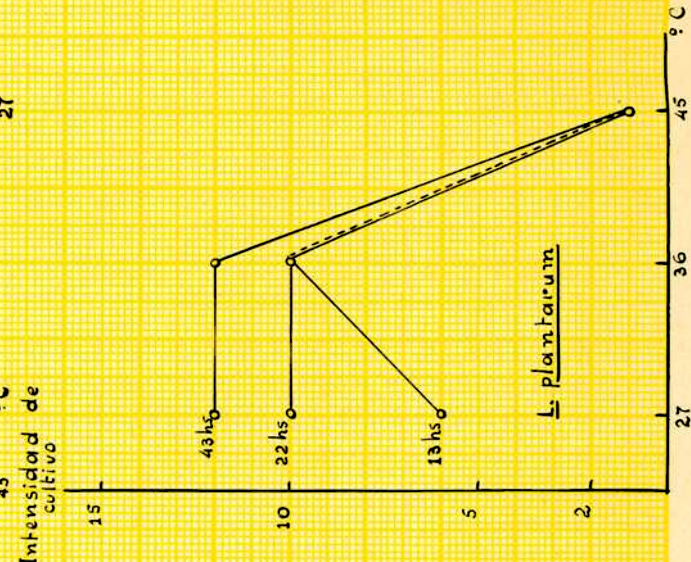
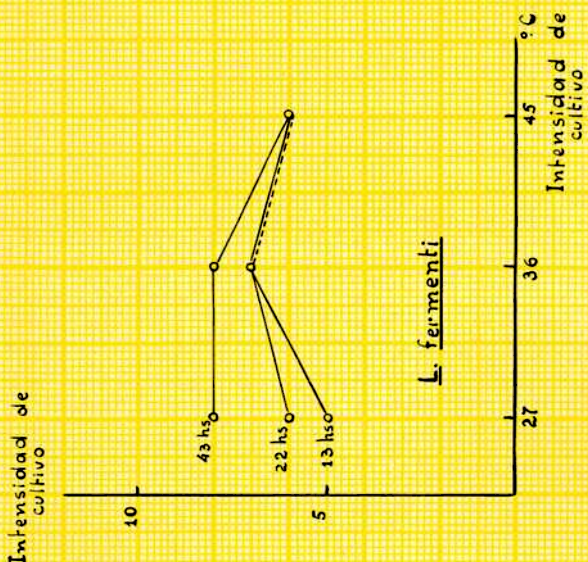
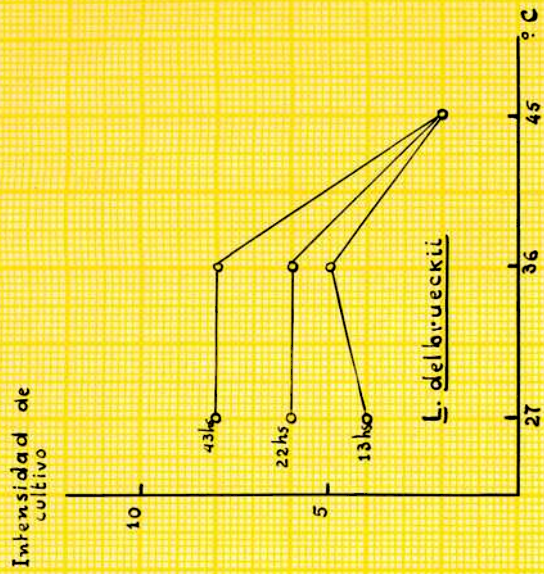
Se utilizó el medio de cultivo M.L. A los efectos de conocer de mejor manera el comportamiento de cada cepa se hicieron determinaciones por simple apreciación de la turbidez, expresando el grado de cultivo en mil millones de bacterias por centímetro cúbico.

En el cuadro y curvas siguientes se puede apreciar el comportamiento de las cepas 1, 2, 3, 4 y 5 en comparación con *L.casei*, *L.plantarum*, *L.fermenti* y *L.delbrueckii*.

Cepas	<u>Tiempo de incubación</u>								
	13 horas			22 horas			43 horas		
	27oC	36oC	48oC	27oC	36oC	48oC	27oC	36oC	48oC
1	1	5	5	4	6	6	5	6	8
2	1	5	5	1	6	8	1	6	8
3	1	4	4	3	4	4	4	6	7
4	2	5	3	4	6	6	5	8	10
5	2	5	4	5	6	8	5	8	10
<i>L.casei</i>	6	10	8	12	12	9	14	14	12
<i>L.plant.</i>	6	10	1	10	10	1	12	12	1
<i>L.fermen.</i>	5	7	6	6	7	6	8	8	6
<i>L.delbruec.</i>	5	5	2	6	6	2	8	8	2

Grado de cultivo





Es evidente con la inspección de los gráficos del cuadro que las cinco cepas aisladas son termofílicas y el óptimo de cultivo se obtiene a la temperatura de 45oC, con respecto a las de 37oC y 23oC. Es sin embargo bien abundante el cultivo a temperatura de 37oC. Las cepas *L.casei* y *L.plantarum* revelan como les corresponde un menor crecimiento a la temperatura de 45oC; su óptimo está alrededor de los 28oC. En cuanto al *L.fermenti*, corresponde en cierto modo al comportamiento que le asigna la literatura, a pesar de que es considerado una bacteria relativamente termofílica, aunque no del tipo del *L.delbrueckii*, cuyo óptimo va desde 37oC á 60oC y más. En cuanto a la cepa de *L.delbrueckii* estudiada por nosotros, no corresponde a la descripción de la literatura en lo que se refiere al óptimo de temperatura, ya que la misma sería de 23oC.

Si se debiera considerar la temperatura de cultivo como carácter importante para la identificación, las cepas estudiadas 1 á 5, aisladas del "corn steep", solo podrían pertenecer al grupo de los *Lactobacillus Termofílicos* (*Thermobacterium* de Orla-Jensen, *L.fermenti*, *L.delbrueckii*), pues no queda ninguna duda de que se trata de especies termofílicas. El comportamiento incierto del *L.fermenti* y el anómalo del *L.delbrueckii* no debe ser considerado como elemento definitivo de juicio.

d) Acción fermentativa sobre azúcares.

Los ensayos fueron practicados por cultivos a 37oC con un medio de agua de levadura diluída al 1:4 y fermentados durante 72 horas a 27oC con levadura fresca.

La producción de acidez fué determinada por acidimetría con -

//////

azul de bromo tinol como indicador.

Los resultados que están expuestos en el gráfico y cuadro siguiente, revelan un comportamiento relativamente uniforme de las cinco cepas, pero no idéntico. La diferencia principal la revelan la lactosa y la rafinosa. La fermentación de la leche también muestra diferencias.

Como punto de comparación puede verse el gráfico representativo de la fermentación por *L.casei*, *L.plantarum*, *L.fermenti* y *L.delbrueckii*(?). El espectro fermentativo de cualquiera de ellos difiere de cualquiera de las cinco cepas estudiadas provenientes del macerado de maíz. Igual caso ocurre con los datos de la literatura.

Clasificación. Identificación

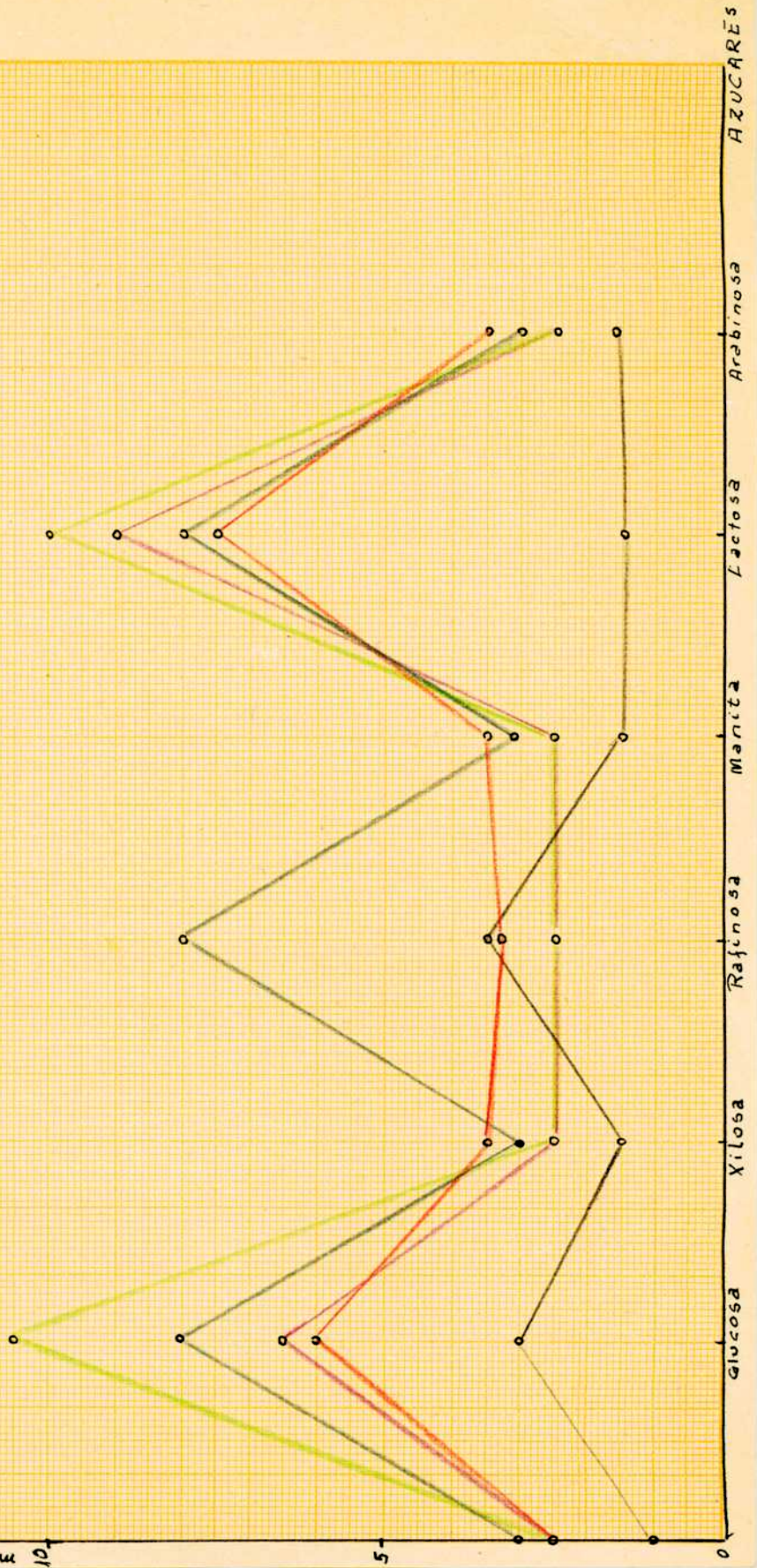
La identificación de las bacterias aisladas, que sin duda pertenecen al género *Lactobacillus*, no es un asunto fácil pues por una parte se observa una cierta dispersión de sus propiedades, y por la otra no se encuentra justificación para identificar a ninguna de ellas con ninguna de las cuatro especies con las que se las pudo comparar directamente. Tampoco se encuentra posible identificación con cualquiera de las demás bacterias del grupo.

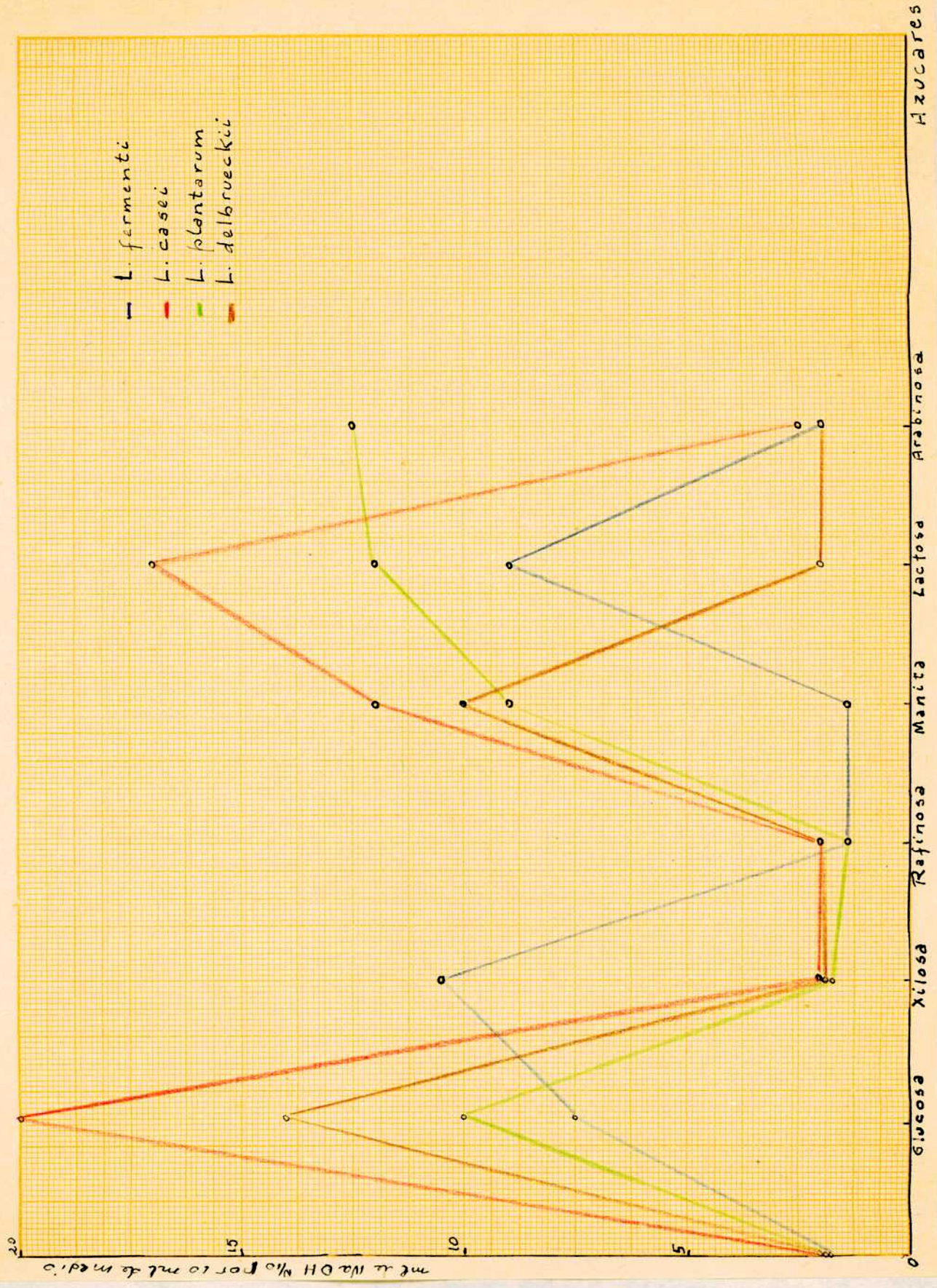
En el cuadro siguiente se encuentran resumidas las propiedades de las bacterias 1, 2, 3, 4, 5, y *Lactobacillus delbrueckii* (), *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus pastorianus* y *Lactobacillus fermenti*.

//////

ml me de NaOH N/10 por 10 ml de medi.

- ① Ceba
- ② Ceba
- ③ Ceba
- ④ Ceba
- ⑤ Ceba





Azúcares

- L. fermenti
- L. casei
- L. plantarum
- L. delbrueckii

ml. de NaOH % for 10 ml. de medio

Glucose Xilosa Rafinosa Manita Lactosa Arabinosa

Discusión

Es evidente que la maceración industrial del maíz es un proceso complejo en el que intervienen factores controlables con facilidad, como la temperatura, las relaciones de volúmenes de maíz y agua, los tiempos de maceración, el número de etapas de la misma, los cortes de líquidos y agua, la constitución del agua que entra en el proceso, el contenido de anhídrido sulfuroso en éste o en los demás líquidos etc., y otros que no son susceptibles de controlar, o mejor dicho, no son susceptibles de control, el maíz y la fermentación.

Por el juego y ajuste de los diferentes factores controlables mencionados, la industria resuelve el problema de la obtención de buen almidón con el mayor rendimiento. De los otros dos, uno, el maíz constituye en verdad el problema, y el otro, la fermentación, es verosimilmente uno de los elementos esenciales que una vez determinado por la variación adecuada de los factores controlables conduce a buen término la maceración con el propósito de obtener mucho y buen almidón. Qué sucede con el macerado para producir penicilina es una cuestión distinta y seguramente independiente de la obtención óptima de almidón. No está dicho, y no está publicado tampoco, que exista asociación entre la buena obtención de almidón y la obtención de un buen macerado para penicilina, o de un mal macerado, o que no sean dos atributos asociados el del buen y mucho almidón con el del buen o mal macerado para penicilina. La verdad es que como el sistema tiene tantas variables que lo determinan, es

//////

posible esperar apriorísticamente, que puedan ser buenos o malos los resultados para el almidón e indistintamente malos o buenos los resultados para la penicilina.

Como no nos ha sido posible, por falta de recursos materiales adecuados, investigar de manera suficientemente correcta la buena producción de almidón, a pesar de un número muy grande de experimentos realizados, no podemos establecer como era nuestro propósito la asociación entre anhídrido sulfuroso, acidez y fermentación con la producción de almidón.

Parecería sin embargo, como cosa muy verosímil, que la acidez, su decurso en el proceso, y el contenido de anhídrido sulfuroso, son fundamentales en el buen resultado de la obtención de almidón, y que el ácido láctico interviene de igual modo, sea cual fuere su origen, sea por fermentación o por adición directa.

Por tanto parecería aceptable admitir, que la fermentación láctica es un elemento de gran importancia en la maceración industrial de maíz para producir almidón. En lo tocante a la penicilina, es verosímil que tenga importancia pues la opinión corriente así lo admite. Desgraciadamente nuestros intentos de averiguarlo han sido frustrados por la complejidad del proceso y por las dificultades del trabajo, de modo que lo consideraremos como una cuestión abierta.

La investigación realizada es solo una etapa preliminar de un estudio más vasto y la contribución de éste trabajo debe ser considerada como un aporte al conocimiento de la flora láctica del "steeping" de una fábrica de almidón.

//////

Su significado es por tanto de alcances muy limitados y plantea más problemas de los que resuelve.

La fermentación, si es que en verdad es esencial para el buen "steeping", tendría las funciones importantes del punto de vista industrial, de producir acidez a poco costo y de impedir la creación de una flora indeseable en el proceso pues los líquidos de maceración de maíz, después que el tenor de SO_2 se reduce, son un buen medio de cultivo para muchos microbios.

Resumen

Se expone el problema y se examinan hechos que constituyen antecedentes, así como la literatura.

En la parte experimental se investiga la variación de constitución de los líquidos durante la maceración, observándose como es conocido el aumento de concentración de sólidos, la reducción del contenido de SO₂ y el aumento de la acidez. Esta se inicia cuando el contenido de SO₂ deja de ser inhibitorio de la multiplicación de bacterias lácticas termofílicas.

La acidez máxima titulable (pH 8,3), proveniente del ácido láctico y de sustancias acídicas del propio maíz, depende del tipo de maceración. Es verosímil que en un determinado tipo de maceración la acidez máxima sea la limitante de la propia fermentación láctica o del contenido de azúcares fermentescibles.

La flora observada es del tipo láctico y puede ser definida como unibacteriana. Hay cierta diferencia entre las cepas aisladas pero ella no parece ser suficiente para establecer una diferenciación de especies.

Se expone la investigación morfológica y de las propiedades bioquímicas de las bacterias del "corn steep" comparativamente con varias otras especies de *Lactobacillus*.

La bacteria láctica pertenece al género *Lactobacillus* y es del tipo termofílico, es productora de ácido inactivo y no puede ser identificada con ninguna de las bacterias descritas y reconocidas como especies en el 'Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 6a. edición del año 1948.

Tiene exigencias nutritivas muy peculiares y cultiva mal en los medios de uso habitual para bacterias lácticas. Se describe un medio de cultivo adecuado, el cual es también excelente para las demás especies de *Lactobacillus*.

Conclusiones

Del examen y estudio del proceso de la maceración del maíz, tal como se emplea en la industria del almidón, se ha podido establecer la participación de la fermentación láctica, la cual es debida, aparentemente, a una sola especie de propiedades particulares que la distinguen de las especies conocidas y que son aceptadas en el Manual de Bergey del año 1948, 6a. edición.

J. Ferrás

Dr. Elio Carrillo

FOFABA.

Indice

	<u>Pag.</u>
Introducción. Objeto del estudio - Plan	1-6
La maceración del maíz en la industria	8-15
Bibliografía	16
Microbiología del proceso de la maceración	17-26
Características de las bacterias aisladas	27-28
Exigencias nutritivas de las bacterias del "corn steep".	28-30
Morfología de las colonias y de las bacterias	30-37
Temperatura óptima de cultivos	38-39
Acción fermentativa sobre azúcares	39-40
Clasificación. Identificación	40
Discusión	41-43
Resumen	44-45
Conclusiones	45