

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Mieles Finales como Materia Prima
para
las Industrias Bioquimicas

TESIS

*QUE PARA SU EXAMEN PROFESIONAL
DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO.
PRESENTA LA ALUMNA*

MARGARITA MIRUS GARCIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Prop. Lit. Reg.

A la memoria de mi amado padre:

SEÑOR DON COSME R. MIRUS.

A mi querida madre:

SEÑORA DOÑA MAGDALENA G. VDA. DE MIRUS.

A mis queridos Hermanos:

MEDICA CIRUJANA, AMADA DEL CARMEN MIRUS,

MARIA GUADALUPE MIRUS,

PROFA. MAGDALENA MIRUS DE SANCHEZ,

JOSEFINA DE LA LUZ MIRUS,

MARIA DE JESUS MIRUS,

COSME AGUSTIN MIRUS.

*A la Memoria del Ilustre Maestro
de la Facultad de Ciencias Químicas, el*

SEÑOR INGENIERO QUIMICO DON ROBERTO MEDELLIN.

Con sincera gratitud:

A MIS MAESTROS.

A LOS SEÑORES INGENIEROS DE LA
INDUSTRIA AZUCARERA Y ALCOHO-
LERA DE MI PAIS, QUIENES COOPE-
RARON A LA OBTENCION DE LOS
DATOS NECESARIOS PARA EL DESA-
RROLLO DE LA PRESENTE.

A los Señores Químicos e Ingenieros Químicos:

DON MARCELINO GARCIA JUNCO,
DON DAVID MONTAÑO M.,
DON ALBERTO BUSTAMANTE,
DON LORENZO PASQUEL,
DON EDMUNDO DE JARME,
DON JUAN MANUEL NORIEGA,
DON CARLOS BRAVO,
DON JUAN MANUEL NORIEGA JR.,
DON EDUARDO PAZ HERRERA.

A los Señores Doctores:

DON ISAAC OCHOTERENA,
DON LUIS BENITEZ SOTO,
DON FRANCISCO PAZ,
DON VICTOR FERNANDEZ MANERO,
DON MIGUEL E. BUSTAMANTE.

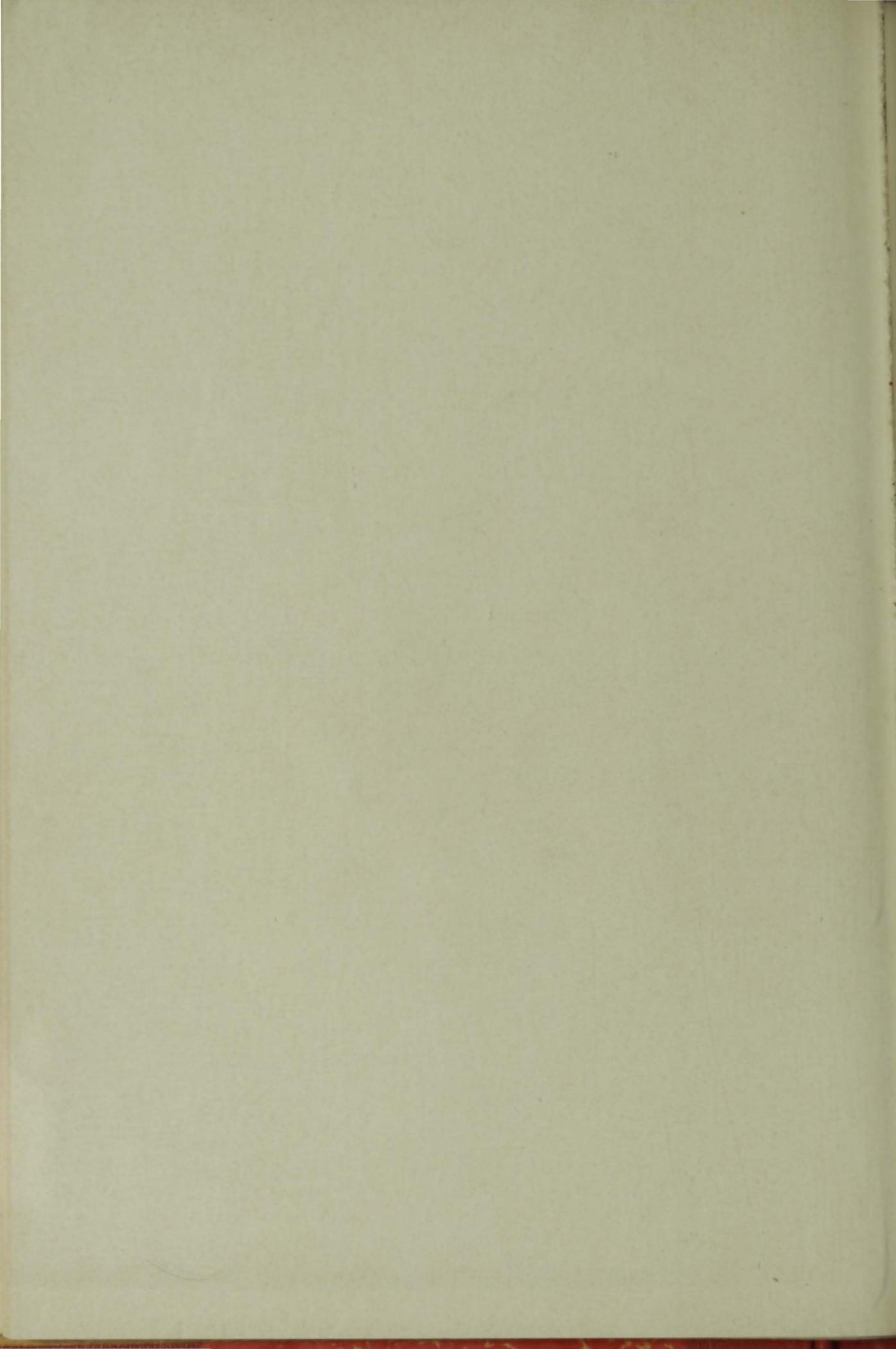
A LOS INGENIOS E INDUSTRIAS
DE MI PATRIA.

S U M A R I O

- I.—ESTUDIO ANALITICO DE LAS MIELES FINALES.
- II.—INVESTIGACION, AISLAMIENTO Y ADAPTACION DE MICRORGANISMOS QUE EN LAS MIELES FINALES SE DESARROLLAN, CON FINES INDUSTRIALES; TRATANDO DE OBTENER COMO PRINCIPAL OBJETIVO EL BACILO TETRYL PARA LA FERMENTACION BUTANOL ACETONICA.
- III.—TERMO - BACILO ¿"X"? (NUEVO MICROORGANISMO) FENOMENOS DE IRRADIACION MITOGENETICA.
- IV.—BACILO BUTIRICO (NUEVO MICRORGANISMO).

I

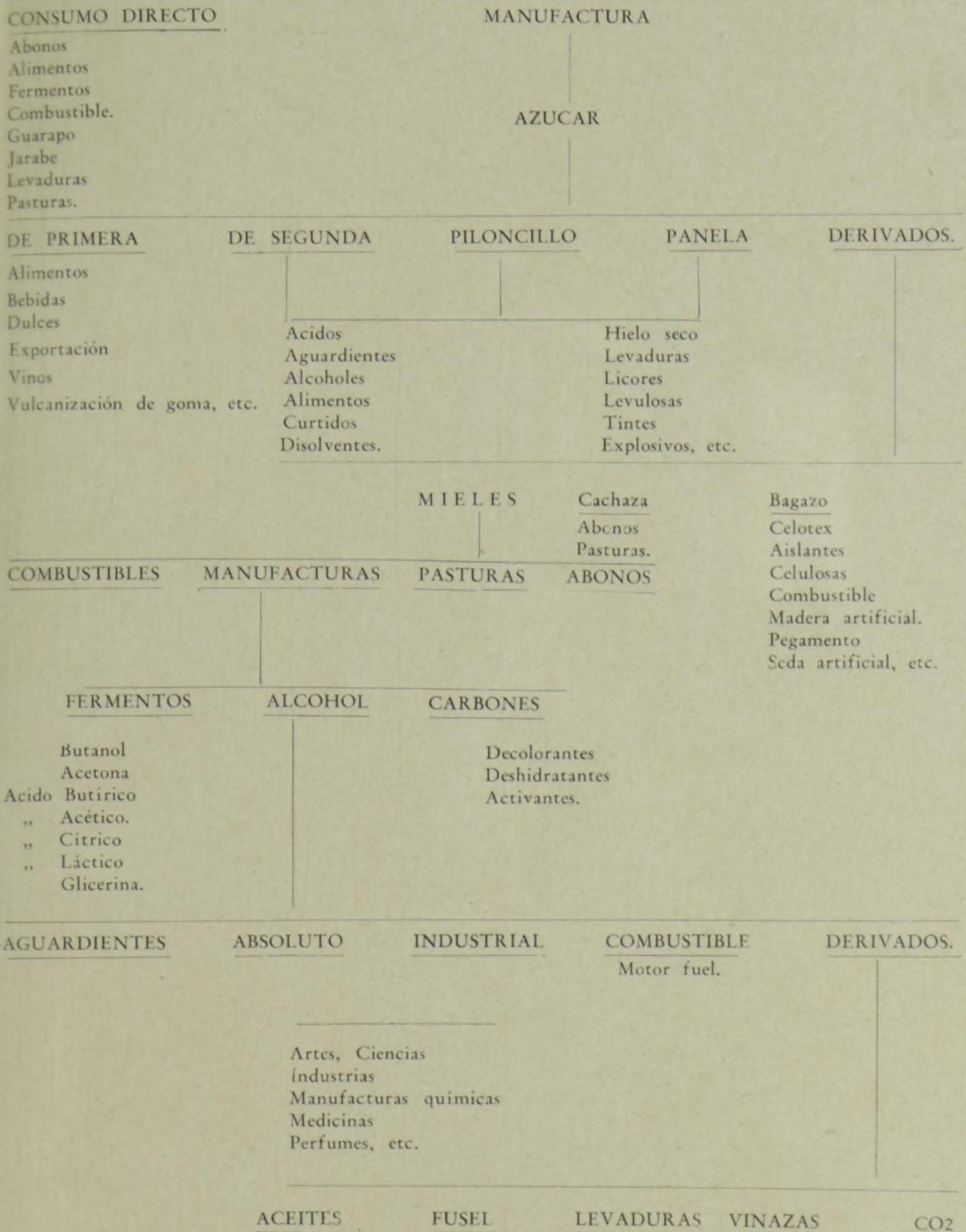
ESTUDIO ANALITICO DE LAS MIELES FINALES

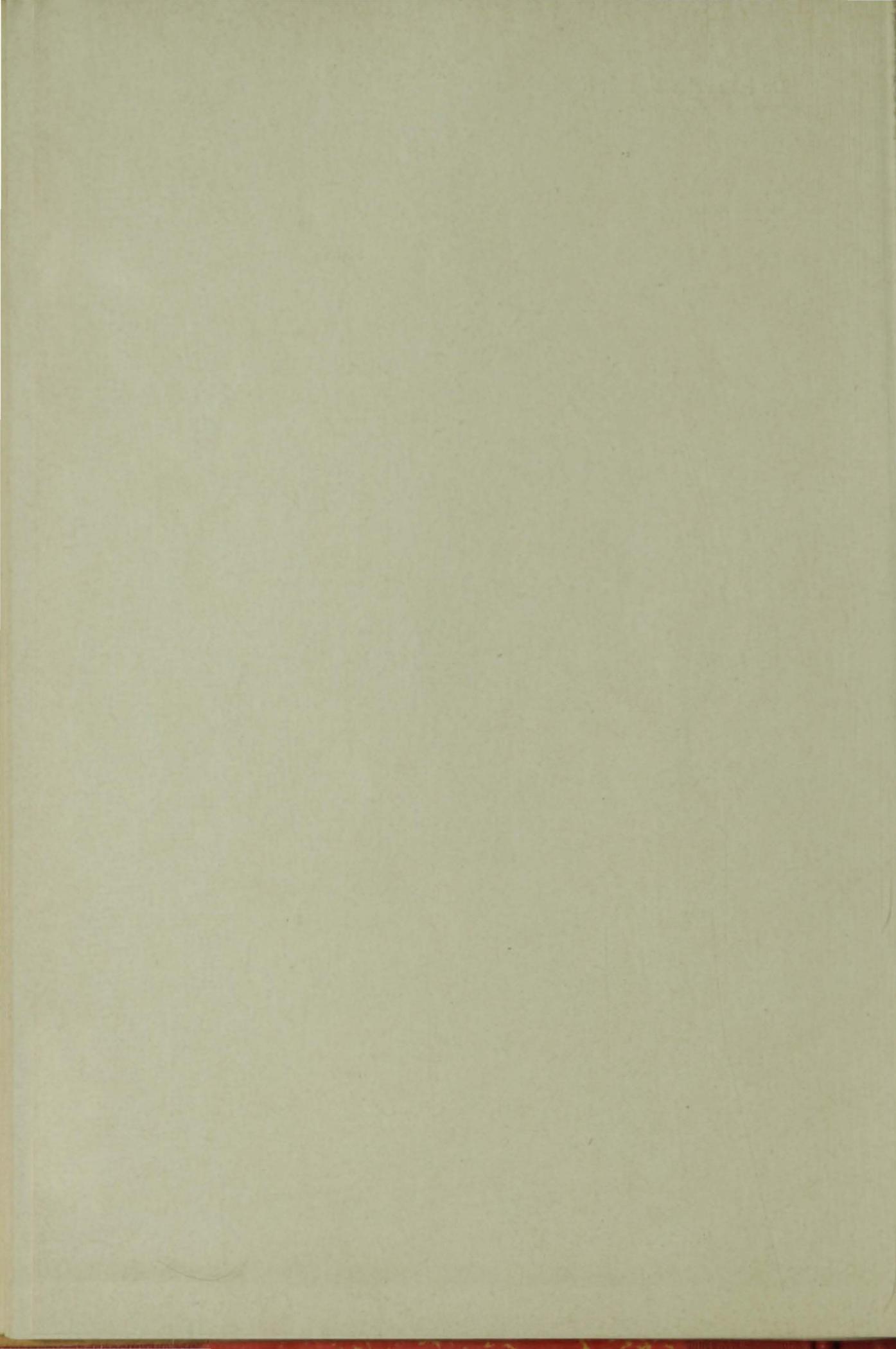


Se ha dicho, y con razón, que "el desperdicio de un siglo puede ser la industria del siglo siguiente".

De las mieles finales, o mieles incristalizables, sub-producto de la industria de la caña de azúcar, puede obtenerse lo que el siguiente cuadro del Aprovechamiento de la caña de azúcar, expresa:

C A Ñ A





Para la realización de los aprovechamientos mencionados en el cuadro anterior, se llevó a cabo el aislamiento de los microorganismos utilizados en algunas de las más importantes fermentaciones, las cuales, imitando el ejemplo de otros países, podrán ser desarrolladas en escala industrial.

MATERIA PRIMA

Respecto a la utilización bioquímica de las mieles finales, se sabe que cada uno de estos tipos de fermentación requiere tratamiento especial del medio, la selección de tipos específicos de agentes de fermentación, definido ciclo de fermentación así como una escala definitiva de temperaturas óptimas.

Por lo que toca a la materia prima, debemos considerar todas estas fermentaciones bajo un solo estudio, dado que en éstas se utilizan mieles finales.

Se dirá sobre el tratamiento que tiende a mejorar la eficiencia de todos estos tipos de reacción de fermentación, explicando cómo estas fermentaciones son afectadas por la composición inherente y calidad de la materia prima usada.

Primeramente hablaré sobre la existencia de distintas sustancias inhibitoras que pueden ocurrir en las mieles, así como del tratamiento específico para el mejor desarrollo de los agentes de fermentación. En seguida, se mencionarán promotores y aceleradores de fermentación; tratando de explicar las razones causantes de su acción para obtener beneficios mejores.

A

Cualquiera que sea la fuente de obtención o la composición de las mieles finales, se encontrará, con respecto a su pureza, un contenido de sustancias en variadas proporciones que causarán más o menos inhibición en el desarrollo del agente de fermentación empleado. Estas sustancias inhibitoras pueden ser clasificadas de acuerdo a su origen, como sigue:

I.—Aquellas que son propias en las mieles, tales como caramelo y sales de calcio.

II.—Contaminantes de composición metálica, incidentales en el proceso de la fabricación, como Fe y Cu .

III.—Aquellas sustancias que ocurren desarrollándose durante el almacenaje de los mieles; como ácidos láctico, acético, oxálico, cítrico y fórmico.

IV.—Aquellas que desarrollan durante el curso del proceso de fermentación, como resultado de la contaminación original de las mieles.

V.—Excesiva contaminación inicial bacteriana.

DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE INHIBIDORES

El análisis superficial del material crudo o mieles, no descubre estas sustancias inhibitoras, en cambio, el análisis bioquímico a cargo de la fermentación industrial, usualmente recurre a fermentaciones preliminares de laboratorio y a análisis químicos para determinar las deficiencias del material crudo en elementos nutritivos necesarios al agente de fermentación, así como a la indicación de sustancias tóxicas.

Lamentablemente, en muchas destilerías o plantas bioquímicas que utilizan mieles en sus procesos de fermentación, el material crudo es obtenido de muchas fuentes (circunstancia que no ocurre en México), de tal modo que es imposible investigar éstas propiamente, respecto a su potencial fermentativo, antes de usarlas en escala industrial. En tales casos, el superintendente de la planta recurre a hacer mostos de una manera convencional y tomando en cuenta los experimentos y errores de la planta, determina el tratamiento mediante el cual éstos darán eficiencia máxima. Desde luego que es una forma costosa de experimentar, pero es inevitable en donde no hay facilidades de tener laboratorio para llevar a cabo estas pruebas preliminares.

Trataremos ahora de las sustancias inhibitoras según se han clasificado antes en el sentido de los procedimientos que son responsables de su existencia, haciendo referencia al método de mitigar su acción perniciosa sobre el agente de fermentación empleado. Tales sustancias pueden ser responsables de fermentaciones inactivas o tardías, y por ende, de rendimientos deficientes.

I.—CAMELO Y SALES DE CALCIO.

Se dice con frecuencia que el caramelo es responsable de bajos resultados en destilerías de mieles, y que este menoscabo de fermentación es efectuado por la acción antiséptica directa del mismo caramelo. Sin embargo, esto es discutible, ya sea que su concentración en las mieles alcance un punto en donde éste actúe como una sustancia decididamente inhibitora.

Brand (*Zeit. Für d. ges. Brauwesen* (1893) Bd. 16,5303), ha demostrado que el caramelo no debe ser mirado de gran significación como un inhibidor del crecimiento en levadura en la proporción en que puede ocurrir en una cervecería, mientras que sus concentraciones en mieles finales, pueden alcanzar muy altas proporciones; cuando de tal caso se trate, su presencia en grandes cantidades será asociada con otros cambios que han tomado lugar en la composición de las mieles, y por lo tanto, será el último responsable de los disturbios experimentados en las fermentaciones. Ejemplo: La presencia de cantidades excesivas de caramelo indicaría en primer lugar un valor ficticio en la determinación de azúcares totales obtenidos por el análisis, y esto probablemente también sería aso-

ciado con la presencia de productos de descomposición viscosa; ambas condiciones se opondrían al éxito fermentativo de las mieles.

Con la relación al proceso de manufactura, los técnicos en estos asuntos esperan encontrar más sustancias de las clasificadas como inherentes, en unas mieles ordinarias, que en unas mieles producidas *ver vi* gracia por el proceso de sulfitación.

En el proceso ordinario de clarificación, la descomposición de algunos azúcares reducidos es siempre inevitable, y las oportunidades para la formación de caramelo son aumentadas por el incremento viscoso del producto y su consecuente susceptibilidad para localizar sobre calentamientos en los tachos. Así es que la eficiencia de la fermentación de estos tipos de mieles será reducida, primero, por una valuación o apreciación ficticia de los azúcares presentes, debido a la existencia en ellas mismas de reductores no azúcares, y, segundo, por la inhibición efectiva de los productos de descomposición formados.

El tratamiento de este tipo de mieles, consiste grandemente en levantar la acidificación del medio hasta el máximo al cual el agente de fermentación trabajará apropiadamente, y por dejar la densidad al punto económico más bajo con el objeto de disminuir tanto como sea posible la viscosidad.

II.—CONTAMINANTES METÁLICOS.

Cuando se investigan los contaminantes metálicos, hay que tomar en consideración la factoría donde las mieles fueron producidas y la destilería donde éstas se utilizan; porque no existe récord de ningún caso, según el Doctor Owen, de que tales contaminaciones se originen en cantidades apreciables en la caña de azúcar a partir de la cual derivan las mieles, o bien, del suelo en el cual ha sido desarrollada la caña.

Mientras que el NaCl puede ocasionar altas concentraciones de azúcar en la caña debido a su acción melasigénica cuando el vegetal se ha desarrollado en tierras bajas, cerca del mar, la concentración de sustancias metálicas positivamente tóxicas que en la caña misma se encuentran, probablemente nunca llegará al punto donde las mieles mismas puedan ser comparativamente inhibitorias de la fermentación; sin embargo, en las destilerías los disturbios ocasionados por las contaminaciones de Cu, son frecuentes.

Este contaminante puede ser derivado del sistema de propagación de la levadura o tinajas de levadura si en cualquiera de estos casos el medio fermentado está en contacto directamente con el Cu. En los rendimientos pobres y resultados incompatibles, en muchas ocasiones se ha hallado como causa la corrosión del forro de estaño de las tinajas de levadura, debido a una capa muy tenue de cobre formada por el contacto del medio con el recipiente durante un período de fermentación, y la disolución de esa misma capa en el período siguiente.

Los efectos perniciosos de la contaminación del cobre pueden ser fácil y rápidamente corregidos por la adición de carbón Darco u otros carbones activados según se expresa en (Cent. Für Bakt. (1928), tomando en cuenta las substancias tóxicas presentes. El carbón es adicionado en ambas partes a la cuba de propagación de la levadura y al mosto por fermentar. El Dr. Owen, y Calma, han encontrado en investigaciones al respecto, que puede ser corregida por este medio, como diez veces la dosis letal del Cu.

El contaminante Cu. frente a la levadura es engañoso en sus efectos, porque su acción es más o menos acumulativa, revelándose su presencia primero en un grado moderado de estacionamiento en la fermentación, y finalmente, en la reducción de la cantidad disponible de semilla; debido a ésto, habrá necesidad de el recultivo de la raza original para devolver a ésta su vigor, y de propagarla en suficiente volúmen, en los aparatos para el efecto.

III.—INHIBIDORES DESARROLLADOS DURANTE EL ALMACENAJE.

De las substancias encontradas en las mieles, debido al desarrollo en ellas de microorganismos durante el período de almacenaje, se pueden tener ácidos como oxálico, butírico, acético, cítrico, etc. El ácido oxálico resulta del crecimiento de hongos en la superficie de las mieles, donde se encuentra una capa de la miel fina y diluída. Los ácidos butírico y acético, pueden encontrarse únicamente donde las mieles han estado guardadas en tanques abiertos o expuestas a la intemperie y almacenadas en pilas colocadas en el suelo; en este último caso, el desarrollo de la bacteria del ácido butírico puede proseguir sin ser detenido tras largos períodos y las mieles finales pueden contener apreciables cantidades del ácido.

Loew, en (Lafar. Technische Mikologie, Bd. V, p.137), ha demostrado que el ácido oxálico en cantidades relativamente pequeñas es bastante perjudicial a la levadura y ha encontrado que este mismo, en la proporción de 1%, retarda el crecimiento de la levadura. Will, a su vez, ha demostrado que una solución al 10%, mata completamente la levadura en cinco minutos.

Lebedeff (Wochenschrift Branerei, 24, 182 - 184, 198-99, (1927), demuestra que aún a la concentración de 0.001%, el ácido oxálico ejerce una acción perjudicial sobre la levadura cuando ésta crece en soluciones de azúcar, mientras que, en concentración de 0.1 a 0.2%, todas las levaduras son destruídas; sin embargo, cuando este ácido se encuentra en el mosto de cerveza a una concentración mayor de 0.05%, sirve primeramente como estimulante a la levadura, pero enseguida perjudica a la zima-sa y, por último, al poder de desarrollo de la levadura.

Las sales del ácido oxálico son mucho menos nocivas a la levadura

que el ácido libre, pero se ha encontrado que el oxalato de calcio perjudica a ésta en una concentración de 0.25%. De acuerdo con estos efectos del ácido, bien se puede preguntar si la presencia de oxalato de calcio en mieles puede todavía inducir a una detención de la fermentación aún después de la dilución usual al preparar el mosto.

La sensibilidad de las levaduras al ácido obutírico es bien conocida y Zikes, en (*Jour. Inst. Brewing*, 21, (1915)), ha demostrado que son afectadas por el ácido con relativa facilidad. Los técnicos en estos asuntos están reconocidos a Neale y Maercker por haber demostrado el efecto de este ácido en medios mieles, en los cuales encontraron que una concentración de 0.05% de ácido butírico, retarda el crecimiento de las levaduras, y al 1.0% completamente lo inhibe.

Sin embargo, Hayduck, refiriéndose a los trabajos de Müller (*Zeit. Für Spiritusindustrie*, (1881), S. 341) que han sido publicados últimamente, indicó que una concentración de 0.5% de ácido butírico sólo retarda ligeramente la fermentación, pero el crecimiento de la levadura es positivamente más retardado. En relación a esto, Julin (*Zeit. Für Spiritusindustrie* (1886), S. 219), encontró que aún cantidades tan pequeñas como 0.005%, retardan el desarrollo de la levadura.

Así que a partir de las observaciones anteriores, concentraciones comparativamente bajas de ácido butírico, bien pueden ocurrir en mieles que han sido expuestas a la humedad, y por tanto imparten pérdidas en las propiedades fermentativas de los medios confeccionados con éstas.

Por lo que toca a los efectos perjudiciales de ácido, acético sobre el crecimiento de la levadura y la fermentación, varían de acuerdo a dos motivos, como Zikes (*Jour. Inst. Brewing*, 21 (1915)), ha demostrado: el ácido se encuentra o no desarrollado dentro del substracto durante la fermentación, o si es adicionado a partir de una fuente extraña.

Lafar (*Cent. Für Bakt*), (1885), Bd. 1, S. 10), en sus investigaciones encontró que algunas razas de levadura varían grandemente respecto a su sensibilidad con este ácido, y Meissner (*Erlangener Dissert.* Berlín, 1897), demostró en un estudio comparativo con levaduras Saaz, Froberg y Logos que, mientras una concentración del ácido al 0.25% completamente suprimieron las dos primeras levaduras, y 0.375% la tercera levadura, quince razas de levadura de vino fueron capaces de completar su fermentación en una concentración del ácido cético al 1%.

ACIDO CITRICO.—Kayser (*Ann. Pasteur*, (1896), Bd. 10, S. 51), demuestra que las levaduras son fuertemente sensitivas al ácido cítrico, y en una adición de 0.2 a 0.4%, bajaron grandemente la rapidez de la fermentación.

Considerando el hecho de que el ácido cítrico puede estar presente en las mieles como un producto de fermentación llevada a cabo durante su almacenaje, encontramos que este ácido jamás puede lograr más que

concentraciones mínimas, y su presencia puede ser manifestada por el grado de inactividad fermentativa de los medios mieles.

ACIDO FORMICO.—El ácido fórmico es fuertemente inhibidor. Henneberg (Welt Spiritusindustrie, (1906), 29-34) prueba que una cantidad tan corta como 0.08% de este ácido, debilita los cultivos de la levadura, y a la concentración de 0.2%, impide completamente su desarrollo.

Las cantidades apreciables que ocurren en las mieles, de este ácido, han sido demostradas por Zerban (Jour. Assoc. Official Agricultural Chemists Aug. 1932), quien encontró en mieles cubanas cantidades tan altas como 0.139 y 0.154%, y también, como dato curioso, cantidades de 0.678 y 0.791% en mieles filtradas de refinería. Así es que la experiencia demuestra que es muy difícil utilizar mieles de refinería en las destilerías de alcohol, a menos que éstas sean usadas como sigue:

I.—Unidas a las mieles de caña usualmente en volúmenes iguales;

II.—Inoculadas muy lentamente con levadura y,

III.—Por la adición de cantidades mas o menos grandes de sustancias nutritivas para las necesidades de la levadura.

El tratamiento indicado para evitar la lentitud de fermentación ocasionada por estas sustancias inhibidoras, es añadir cantidades mayores de levadura a efecto de establecer una concentración de semilla relativamente alta en el sembrado original de la fermentación; y ésta puede ser exitada por el uso de cantidades más liberales de alimento para la levadura, así como un período de aereación más sostenido del medio.

Si fuera económicamente practicable, los ácidos volátiles mencionados como sustancias inhibidoras podrían ser removidos del medio acidificando éste con H_2SO_4 y esterilizando después, para expulsar los ácidos orgánicos que están libres; pero ésto rara vez será practicable en las plantas promedio, de modo es que puede recurrirse a las recomendaciones dadas.

IV.—INHIBIDORES DESARROLLADOS DURANTE LA FERMENTACION.

Llevando a consideración las sustancias inhibidoras que se desarrollan cuando el mosto está fermentando, las cuales son debidas a contaminaciones llevadas a cabo en las mieles usadas, tenemos la existencia de la mayoría de los ácidos discutidos anteriormente. Sin embargo, es dudoso, pues no se ha probado que los ácidos cítrico y oxálico puedan ser formados simultáneamente mientras la levadura trabaja;; seguramente que esto no se realiza en donde las levaduras son activas, y en donde el medio o substracto está bajo fermentación vigorosa. De hecho, la mayoría de estas sustancias inhibidoras, pueden únicamente ser producidas en apreciables cantidades antes o después del período máximo de fermentación de la levadura.

Debe hacerse notar la efectividad del CO₂ en fermentaciones alcohólicas para proteger al medio en fermentación del desarrollo de contaminantes extraños; este punto generalmente pasa desapercibido a pesar de tener tan gran significado, ya que rendimientos de alta eficiencia en medios hechos de mieles esterilizadas, dependen de la rapidez inicial de la fermentación de la levadura y de la actividad sostenida hasta que todos los azúcares fermentables sean consumidos.

Por otra parte, debemos tener en cuenta la acción tóxica ejercida sobre la levadura por sustancias inhibidoras que han sido producidas por contaminación del medio, las cuales intensifican su acción si la temperatura llega a ser más alta que la óptima o máxima del crecimiento de la levadura siendo así como una sustancia ligeramente tóxica en sus principios, puede llegar a ser altamente perjudicial para el desarrollo de la levadura.

Hayduck (Lafar. Technische Mykologie, Bd. V, S. 291), encontró que cuando el ácido láctico llega a una concentración de 1.35%, ejerce una acción retardatoria sobre el desarrollo de la levadura, y que a una concentración de 0.5% la estimula. Este ácido es uno de los antisépticos más efectivos para proteger contra las contaminaciones a los mostos de granos, precisamente por la alta tolerancia de las levaduras al mismo. Sin embargo, el ácido láctico desarrollado a temperaturas arriba de 40 y 41 grados centígrados en los medios mieles, puede ejercer una acción muy perjudicial sobre la levadura así como también puede ser responsable del gran retardo en la eficiencia de la fermentación.

El efecto retardatorio del ácido láctico se atribuye, parcialmente, a la acción tóxica del mismo a temperaturas, altas, pero en gran parte se debe a la competencia que efectúa la bacteria del ácido para consumir el azúcar y los ingredientes nutritivos del medio.

Así pues, las curvas de temperatura de fermentaciones alcohólicas llevadas a cabo con éxito, alcanzarán su máximo en las últimas etapas del período de fermentación, mientras que rendimientos ineficientes o insatisfactorias atenuaciones, estarán en relación con las curvas que atañen a un nivel de 40 grados centígrados o más arriba, antes que la reducción de los azúcares en el medio llegue a menos del 2%.

V.—CONTAMINACIONES INICIALES BACTERIANAS.

Al considerar las contaminaciones iniciales bacterianas en las mieles finales estaremos confrontando un fenómeno que se presume, pues, mientras es cierto que muchos casos de rendimientos y fermentaciones lentas de algunas tipos de mieles son atribuidos a una alta contaminación bacteriana, también puede ser que otras causas sean realmente responsables.

Al tiempo de ir a utilizar las mieles, éstas necesitan contener pocas células vegetativas, viables, aun cuando estas últimas pueden encon-

trarse en ocasiones, en un contenido de varios miles de esporas por gramo. Infortunadamente, existen muy pocos datos a este respecto, no obstante que la bacteriología de los azúcares y de los productos intermedios en su manufactura ha sido bien abarcada por investigadores.

A Church se agradece (Sugar, (1920), Bacteria in Cane Sugar Products), una de las pocas contribuciones respecto al contenido microbiano de las mieles. En las investigaciones a ese respecto, el número de bacterias en las mieles tomadas directamente de las centrífugas varía entre diez y dos mil por gramo; mientras que las esporas de hongos y levaduras que en algunos casos se encuentran, están a una concentración de 230,000, no habiéndose hallado nunca abajo de 40,000.

Ahora bien, las bacterias no pueden desarrollar dentro de las mieles, excepto que estas últimas sean diluidas o cuando en ellas se ocasiona un film diluido en la superficie por absorción de humedad; siendo entonces contaminadas del exterior. Es indudable que bajo ciertas condiciones de almacenaje, puede haber considerable desarrollo de microorganismos en la superficie de las mieles; pero es dudoso que éstos puedan alcanzar tales concentraciones que llegaran a ser nocivas después de haberse diluido las mieles con cinco o seis veces su volumen de agua.

De las bacterias que puede decirse constituyen la flora normal de las mieles, la mayoría son aerobias, y por lo mismo, difícilmente pueden actuar en un medio en donde tienen que aguantar activa fermentación alcohólica. La mayoría de estas bacterias tienen un pH óptimo entre 6.0 y 7.0, de ahí que pueden ser retardadas por la acidez inicial del pH promedio en los medios. Por lo tanto, parece que donde las contaminaciones microbianas de las mieles resultan ser un factor real, perjudicando la eficiencia de la fermentación industrial, se encuentra que se debe no al contenido excesivo de microorganismos, sino a formas excepcionales de estos contaminantes; concibiéndose así que existan en unos tipos de mieles algunos microorganismos específicos capaces de vivir unidos con levaduras, y los cuales forman sustancias tóxicas o toxinas específicas que son inhibitorias al crecimiento normal y actividades de la levadura.

El Doctor Owen considera estas investigaciones necesarias para dar valor a la frecuente afirmación que se hace de contaminaciones microbianas de mieles, siendo un factor importante en la causa de fermentaciones industriales ineficientes. Ha llamado la atención del propio Doctor, casos en donde se culpa a las contaminaciones bacterianas de las mieles, de fermentaciones alcohólicas muy deficientes en las destilerías donde la presencia de estas infecciones ha sido revelada por el hecho de existir concentraciones relativamente altas de compuestos de azufre en los aguardientes con alto porcentaje de alcohol, destilados a partir de medios así infectados. Se cree, en tales casos, que las bacterias reductoras han sido responsables, realmente, de las dificultades encontra-

das. Este estudio merece más extensas investigaciones para la identidad de tales especies, su origen y concentración.

B.—PROMOTORES Y ACELERACIONES DE LA FERMENTACION

Podemos considerar los factores que influyen la fermentación de mieles, bajo los siguientes puntos de vista:

- I.—La concentración de azúcares en el medio.
- II.—El pH del medio.
- III.—El efecto de la acumulación de los productos finales.
- IV.—El efecto de los coloides.
- V.—La presencia de las cantidades minuciosas de sustancias que algunas veces no se encuentran en ciertos tipos de mieles finales.
- VI.—La presencia de cantidades y clase de sustancias nutritivas adecuadas, como son nitrógeno y fosfatos.
- VII.—Actividad de las células del agente de fermentación, frente a los azúcares residuales.

I.—CONCENTRACION DE AZUCARES EN EL MEDIO.

Para la concentración de azúcares en el medio, se hará lo posible por determinar los factores inherentes que limitan las cantidades de carbohidratos que el agente de fermentación puede utilizar eficientemente en el medio sobre el cual se desarrolla.

Las limitaciones que impone la selección de un óptimo de concentración de azúcar para cada tipo de fermentación recaen, naturalmente, bajo los siguientes puntos:

- a).—El tiempo o período de fermentación.
- b).—La influencia de sólidos no azúcares, en el material crudo.
- c).—La tolerancia del agente de fermentación a los productos de su metabolismo, y
- d). La temperatura a que llega durante la fermentación.

Es obvio que nosotros no podemos fijar nuestros medios para ser fermentados a densidades o concentraciones de azúcares que necesitarán períodos prolongados para la consumación de los azúcares presentes. Sin embargo, esto no es adaptable a los vinos, pues precisamente es lo que se hace en el caso de éstos y de otras bebidas en donde el período de fermentación es de varias semanas en lugar de días; la diferencia en este caso es que se ejerce un cuidadoso control para el mantenimiento de temperaturas bajas, y que los sabores o aromas y calidad son de más importancia que la conversión eficiente de los azúcares en el producto final.

Períodos prolongados de fermentación en la producción de sustancias químicas por medio de procesos bioquímicos, en la instalación de la

rábrica introducen riesgos de contaminación y hacen necesarios en muchos casos métodos complicados de control y de temperatura, los cuales no son compensados con las economías obtenidas. Por esto se deben fijar los mostos de mieles a todos los procedimientos bioquímicos descritos a una concentración de azúcar tal, que los organismos utilizados como agentes de fermentación no sean inhibidos por la acumulación de los productos de fermentación antes de que todos los azúcares presentes sean consumidos.

La concentración podría ser de 10 a 15% de azúcar en la fermentación para alcohol etílico; a partir de 7 a 10% en la fermentación butanol acetónica, y aún más bajo en la fabricación de levaduras comprimidas. En este último caso, no es ya cuestión de la inhibición de los microorganismos por sus productos de metabolismo, sino de mantener una solución de poca viscosidad la cual admita la aereación máxima posible y el movimiento libre para la agitación de la levadura presente, así como el libre acceso a los alimentos nutritivos en solución que se encuentren en el medio. Por consiguiente, deberán tenerse en cuenta dos factores involucrados en el problema único de concentración óptima de azúcar para cualesquier fermentación industrial: Ejemplo: El efecto del azúcar mismo y el de los sólidos no azúcares que ocurren en la miel.

Consideraremos ahora los caminos y medios para promover la eficiencia de fermentación a concentraciones más altas que las que ordinariamente se emplean.

Por el hecho de que la concentración de los sólidos no azúcares en el medio afecta la rapidez con que los azúcares en solución pueden llegar a la esfera activa de las células del agente de fermentación, y también porque la densidad del medio reacciona sobre la velocidad del movimiento de los gases formados y retarda su liberación, a partir de la solución en fermentación, cualquier substancia inerte de consistencia sólida, tiende a acelerar la fermentación, así como a proteger al organismo a partir de los efectos perjudiciales de la acumulación de los productos de su metabolismo.

Por lo tanto, en la preparación del medio de granos, las partículas sólidas presentes en el medio actúan como aceleradores y como zonas protectoras o esferas para los agentes de fermentación. El Doctor Owen ha encontrado que esto es cierto también, en el caso del bagazo de caña, y en una extensión mucho más grande, con carbón activado. (Owen, W. L., and Denson W. P. *Cent. für Bakteriologie* 77, (1929). Usando muy pequeñas cantidades, aproximadamente dos libras por mil galones de medio, se encontró que la densidad de éste podía ser aumentada a 30 Brix en donde sin la adición de este material inerte, 20 grados Brix fué el punto máximo del cual pudieron obtenerse eficientes rendimientos.

Además, se ha encontrado que no solamente pueden los medios ser fermentados a 30 Brix con tanta eficiencia como los de 18 a 20; tam-

Sién la rapidéz de la fermentación es acelerada, tanto que el período requerido para la consumación completa de los azúcares es aproximadamente el mismo.

Sin embargo, frecuentemente la selección de la concentración de azúcar se relaciona con la tolerancia de la raza de levadura o especie de bacteria utilizada como agente de fermentación, en algunos casos, razas de levadura pueden adaptarse a concentraciones de alcohol las cuales en otras razas, inhibirían su desarrollo.

Pueden ser aclimatadas con éxito razas de levadura tanto a densidades y a temperaturas altas, como el Doctor Owen ha encontrado; (Chaturvedi, H. S. Jour. Science and Technology Vol. 1, (1935), aunque ésto se acompaña usualmente de una fermentación más lenta. De una manera similar los agentes de fermentación para la mayoría de los otros procesos fermentativos, con especialidad para butanol y acetona, ácido butírico, etc., pueden ser gradualmente aclimatados para adaptarse a concentraciones más altas de azúcar que las que normalmente toleran cuando ellos se encuentran por primera vez aislados a partir del lugar en donde habitan.

II.—EL pH DEL MEDIO.

El sostenimiento del pH óptimo del medio, es importante en todas las fermentaciones para la concentración necesaria y deseada de iones Hidrógeno:

Para la acción eficiente de las enzimas de que se trate;

Para la protección del agente de fermentación empleado contra la entrada de especies extrañas de microorganismos los cuales tienen en este caso un óptimo diferente al del agente mismo; y

Para la cración de la reacción propia necesaria para control del equilibrio y su dirección hacia fines definidos.

Nosotros tenemos que considerar tanto el pH final como el inicial para estas fermentaciones; ver vi gracia, en las fermentaciones de alcohol etílico, no se puede fijar arbitrariamente ningún estándar con relación al pH inicial.

Hildebrandt, (Hildebrandt, F. M. Jour Ind. and Eng. Chem., Vol. 21 (1929), ha demostrado que un pH óptimo, aproximadamente de 5, es correcto para el promedio mieles; esta acidez deberá ser determinada por pruebas preliminares, y la única regla que seguir, es fijar el pH en tal grado que no aumente la acidificación mientras la fermentación continúe: esto puede ser obtenido en diferentes mieles por la adición de 0.2 a 2.00 c.c. de ácido sulfúrico por litro.

En la fermentación butanol acetónica, los medios son usualmente fijados a un pH de 5.8 a 6.2, el cual cae rápidamente durante las primeras 10 a 20 horas de la fermentación, y entonces aumenta hasta su valor original. La adición de carbonato de calcio sirve para neutralizar los ácidos

formados durante el período inicial, y así no permite el cambio de equilibrio a favor de la producción de ácidos, o de otra manera, impide que esa fase ácida llegue fuera de control. En forma similar, diríamos que la acidez titulable aumenta rápidamente, y entonces cae a un punto usualmente bajo de nivel inicial, siendo así como la presencia de contaminantes tóxicos puede frecuentemente ser descubierta a partir de la curva del ácido titulable. Para evitar estas contaminaciones, se aplica, así como en la fermentación del alcohol etílico, la presencia de carbón activado sumamente dividido, el cual sirve como una protección para el organismo y acelera la velocidad en la fermentación.

Se debe tener presente que el pH es de capital importancia para determinar si el medio por sembrar es o no adecuado; en la mayoría de los casos, la concentración de iones H. es la que debe ser cuidadosamente observada y comprobada durante el curso de la fermentación; debiendo guardarse las curvas, (ejemplo: la fermentación butanol acetónica), mientras que, en las fermentaciones de alcohol etílico, la acidez titulable final y el incremento sobre la reacción inicial del medio, es de importancia final.

Es de tomarse en cuenta que en algunos medios de constitución buffer, debido a fosfatos o proteínas, la acidez titulable puede incrementar rápidamente y alcanzar serias proporciones sin haberse notado materialmente alteración alguna del pH., inicial, demostrándonos esto el valor de las titulaciones haciéndonos considerarlas indispensables durante todo su recorrido, según las fermentaciones de que se trate.

También es necesario tener en consideración el óptimo de concentración de azúcar, así como el pH. óptimo, para aclimatar al organismo a la reacción que puede ser la mejor designada para la conversión eficiente de azúcares en los productos finales deseados. La adaptación puede ser por el lado ácido, en el caso del alcohol etílico o ácido butírico, y por el lado alcalino, como en el caso de fermentación para glicerina. Para su éxito final, esta aclimatación depende de la selección de razas o especies, teniendo una aptitud natural para las condiciones a las cuales éstas han sido acostumbradas, y cuidando la aclimatación a través de pasos sucesivos, incrementando gradualmente la acidéz o alcalinidad, como lo requiera el caso. De este modo, las levaduras y bacterias pueden ser aclimatadas a través de un recorrido en acidez a partir de 2.0 a 8.0 aproximadamente.

III.—EL EFECTO DE LA ACUMULACION DE LOS PRODUCTOS FINALES.

En la fermentación industrial de las mieles o de cualquier substrato conteniendo carbohidratos, se puede limitar la densidad o caso de los medios, por los efectos perniciosos de los productos de su metabolismo sobre los agentes de fermentación. Este efecto como en la fermentación del

alcohol etílico, puede ser mirado dentro del complejo "alcohol temperatura", en esta forma muchas levaduras pueden ser aclimatadas a altas concentraciones de alcohol cuando las temperaturas se conservan bajas, mientras que, pocas pueden soportar los efectos combinados de altas concentraciones de alcohol y altas temperaturas, simultáneamente.

Por ejemplo, en los clásicos trabajos de Muller Thurgau, (Thurgau, Müller. *Lafar Technische Mykologie*, Bd. 4, S. 131), se demostró que para el estudio particular de levaduras, la concentración límite del alcohol a varias temperaturas fué el siguiente:

<i>Temperatura.</i>	<i>Fermentación suspendida por:</i>
36° C.	3.8% de alcohol por peso.
27° „	7.5% „ „ „ „
18° „	8.8% „ „ „ „
9° „	9.5% „ „ „ „

Ejemplos de razas de levaduras capaces de fermentar a altas concentraciones de azúcar, produciendo y tolerando altas cantidades de alcohol, pueden ser demostrados por el caso del *Saccharomyces Vordemanii*, tan descrito por Went y Geerligts en (Went, J., and Geerligts, P. *Archief Voor de Java Suikerindustrie*, 1904), el cual rápidamente fermenta soluciones conteniendo 18 a 19% de glucosa, mientras Inui, en (Inui, T. *Jour. Coll. Sci. Tokyo Univ.* 1901), describió una especie de levadura conocida como *saccharomyces awamonii* (Loc. Cit.), la cual es primeramente retardada por una conc. de 13% de alcohol prosiguiendo así mientras no llega a enriquecerse a una concentración de 20% en la que su actividad es completamente suspendida.

Estos ejemplos se refieren a fermentaciones rápidas y no a fermentaciones lentas que se usan en la industria del vino en donde el bajo recorrido de fermentación y las temperaturas controladas, protegen a la levadura de la acción perniciosa del complejo "alcohol temperatura" a que anteriormente nos referimos.

De todos los factores que pueden ser incluidos al tratar de la promoción o aceleración de fermentación, uno de los de importancia primordial y que debe recibir mayor atención, es la adaptación del agente de fermentación a sus propios productos de metabolismo.

En la fermentación del alcohol etílico, estas eficiencias pueden ser logradas, especialmente en destilerías tropicales, si se dá más atención a la aclimatación de la levadura usada para el ocaseo alto de temperaturas de los medios, siendo esta circunstancia una condición inevitable debido al predominio de temperatura en las aguas usadas.

En investigaciones de laboratorio, el Doctor Owen aclimató con éxito razas de levaduras ordinarias a temperaturas y concentraciones de alcohol,

las cuales al principio redujeron la eficiencia de fermentación hasta un 50% de su potencial, pero después de un número de pases y sucesivas exposiciones a estas condiciones infavorables, adquirieron tal resistencia que fueron obtenidos rendimientos normales de alcohol.

En muchas de estas fermentaciones la aclimatación del agente de fermentación a sus productos de metabolismo obtenido, es comparativamente fácil; en otras, es más difícil de realizar, debiéndose, en parte, probablemente a la reducción de la fase de tención superficial del medio fermentado; la aclimatación del agente de fermentación a altas concentraciones de alcohol butílico y acetona es extremadamente difícil e incierto, y de aquí que la realización debe ser ocasionada por las aptitudes inherentes del organismo seleccionado hacia el medio empleado, y su inicial tolerancia para los productos formados.

Como se ha mencionado, en muchos casos, aunque no en todos, la presencia de carbón activado o partículas de material inerte finamente dividido, tiende no solamente a acelerar la rapidez de fermentación, además actúa como un protector de las células microbianas, y permite entonces sucesivamente soportar de otro modo los efectos perniciosos de sus propios productos. A este respecto, también la curva de crecimiento del organismo tiene un pronunciado aguante en la última eficiencia de la conversión de carbohidratos en los productos deseados de la fermentación. Por ejemplo, el usar semilla sin madurez, consistiendo de una predominancia de células jóvenes; en el sembrado de los medios para la fermentación del alcohol etílico, puede ser responsable de un temprano cese de la actividad de fermentación, y un incompleto acabado de los azúcares presentes. En otras fermentaciones, el uso del material semilla en el preciso estado de desarrollo, es de mucha mayor importancia en lo que atañe a la eficiencia final. Algunas fermentaciones envuelven la utilización de las formas espora de bacterias como el agente de fermentación, condición que deberá ser sostenida y que asegurará la prolongación del estado vegetativo de los organismos hasta que los azúcares hayan sido grandemente consumidos.

IV.—EL EFECTO DE LOS COLOIDES.

Es bien conocido, y un hecho que puede ser confirmado por todo bacteriólogo que ha tenido experiencia en fermentaciones industriales, que es muy difícil, si no imposible, obtener tan eficientes rendimientos a partir de azúcares en medios sintéticos, como se obtienen prontamente a partir de fermentaciones que ocurren en mieles, o en muchas fuentes naturales, tales como jugos de frutas, o medios de granos, donde existen coloides.

Ensayando cómo se pueden suplantar los materiales nutritivos requeridos para fermentaciones eficientes a partir de soluciones artificiales sintéticas, el Doctor Owen raramente obtuvo rendimientos comparables a aquellos comunes a la fermentación industrial de mieles.

La dificultad ha sido atribuída en varias ocasiones, a la carencia de biotina o sustancias promotoras del crecimiento y la falta de vestigios mínimos de sustancias raras como manganeso, e igualmente cobre o hierro, que ocurren naturalmente en las mieles en cantidades adecuadas.

La adición de cantidades aún ínfimas de mieles a soluciones de azúcares a las cuales los varios ingredientes nutritivos han sido adicionados, frecuentemente bastan para rendimientos eficientes. Respecto a ésto, se han dado casos como en los Estados Unidos, en donde el abastecimiento de mieles, al llegar de los trópicos consistía principalmente en jugos de caña invertidos, o azúcares crudos convertidos en mieles con el propósito de salvaguardar la caña, la cual, debido a la existencia, y prevaleciendo las cuotas del azúcar podía no haber sido utilizada en forma de azúcar. Algunas de estas mieles de alto contenido en azúcar comparadas a las mieles finales, ordinarias, pueden ser miradas como mieles artificiales y su fermentación introduce problemas igualmente más difíciles que el uso de mieles de remolacha para este propósito.

Como es bien conocido, la fermentación eficiente de mieles finales de remolacha envuelve adiciones especiales de materiales nutritivos para hacerlas comparables al trabajo de las mieles de caña, y usualmente se ha encontrado que el mejor proceso, después de todo, es mezclar las mieles de remolacha con iguales volúmenes de mieles de caña antes de usar el medio.

V.—LA PRESENCIA DE CANTIDADES MINUCIOSAS DE SUBSTANCIAS.

Así como en la fertilización de las plantas hay elementos de nutrición clasificados como aquellos que son esenciales y que nunca faltan en la tierra, también hay elementos esenciales que se supone puedan encontrarse rara vez en adecuadas cantidades y por ende tienen que ser suplantados. Lo mismo ocurre con las mieles finales y por lo tanto hay que suplantarlos para una eficiente fermentación.

Generalmente se presta atención a las necesidades de nitrógeno de la levadura, y más raramente a la necesidad de adición de fosfatos. Sin embargo, Hildebrandt, "(Hildebrandt, F. M. Jour Ind. and Eng. Chem., Vol. 22, 1011 - 15 (1930))", ha encontrado que la adición de sulfato de magnesio en lavadura sembrada a la proporción de uno en 5,000; sulfato de cobre en proporción de uno a 2,000 y una adición similar de cianamida de sodio, produjo muy significativo estímulo en la fermentación debida a la levadura en medios mieles. Desde luego que este asunto es dejado a decisión, pues se cree que estas adiciones fueron efectivas porque las mieles particularmente usadas fueron deficientes en estas sustancias, o que éstas, que debieran ser miradas como tóxicas en grandes cantidades, en menor proporción fueron estimulantes.

En pruebas de mieles muy altas, el sulfato de magnesio es frecuentemente recomendado como uno de los elementos de crecimiento, el cual

debe ser adicionado a los medios para obtener eficientes rendimientos, aunque no existen datos favorables para indicar si tales adiciones se reflejan o nó, incrementando los rendimientos de alcohol.

La adición de fosfatos en la forma de fosfato ácido de calcio, es frecuentemente indicada, especialmente en el uso de mieles finales de Puerto Rico, donde usualmente es adicionado en la proporción de dos a cinco libras por mil galones de medio.

A veces es difícil determinar en el caso de una substancia adicionada, si el efecto benéfico va a ser atribuído al hecho de que ésta supla algunas faltas de sustancia nutritiva que existan en el substracto, o bien, que esta adición sea puramente estimulante. Por ejemplo, el efecto estimulante del sulfato de manganeso podría fácilmente ser asignado a su acción nutritiva directa, puesto que las levaduras contienen algo de manganeso en el constituyente inorgánico de las células. De otro modo, sería fácil de asignar la acción estimulante de pequeñas cantidades de formaldehído el cual, se ha visto que acelera la fermentación y la eficiencia final.

Generalmente se presta a confusión el tratar de diferenciar la acción estimulante de una substancia sobre el agente de fermentación mismo, y en tal virtud como una substancia inhibidora sobre las contaminaciones de organismos extraños. Por ejemplo, en el proceso Effront, en el cual sales del ácido fluorhídrico son empleadas como inhibidoras de contaminación en la fermentación alcohólica de medios mieles; el agente de fermentación (en éste caso la levadura), es primeramente aclimatada a una concentración de la sal la que efectivamente inhibe los organismos que no están aclimatados, y tiempo después la principal fermentación es llevada a cabo en esa concentración de fluoruros.

VI.—LA PRESENCIA DE CANTIDADES Y CLASE DE SUBSTANCIAS NUTRITIVAS.

Cuando se procede con mieles finales típicas de 50 a 55% aproximadamente de azúcares, el proceso usual es adicionar una libra de sulfato de amonio, por mil galones del medio y no se requiere otro material nutritivo. Únicamente en casos raros se indica la adición de fosfato como en la fermentación del alcohol etílico de mieles finales. Sin embargo, cuando se fermentan altos medios con alto porcentaje de azúcar, o mieles finales invertidas, tenemos un material diferente, como puede verse a partir de los siguientes análisis comparativos de dos tipos de mieles. . . .

	<i>Tipos de azúcares bajos.</i>	<i>Tipo Invertido azúcares altos.</i>
BRIX	84.52	83.57
SUCROSA	36.39%	19.87%
AZUCARES INVERTIDOS.	15.26%	55.29%
AZUCARES TOTALES	55.65%	75.16%
INVERSION TOTAL	53.46%	76.15%

En el azúcar bajo, o miel final normal, nosotros tenemos en cenizas y orgánicos no azúcares, un valor de 31.06, mientras que en la segunda o tipo invertidas, tenemos un valor únicamente de 8.41 para la ceniza y residuo no azúcar. Es obvio que las mieles de alto tipo de azúcar requerirán mucho más sulfato de amonio para asegurar la fermentación de estos azúcares que las de bajo tipo, debiendo para la diluciones de alto tipo, traer el azúcar del medio final dentro de los límites requeridos que puedan ser efectivamente fermentados por la levadura, y por la deficiencia natural de esas mieles en proteínas. Pero para adicionar de 5 a 10 veces el sulfato de amonio ordinariamente usado con mieles finales normales se introducen complicaciones y dificultades, las cuales muchas destilerías han experimentado por la utilización en esta forma del material crudo.

Las grandes cantidades de sulfato de amonio que se necesitan para este tipo de mieles, resultan en un satisfactorio recorrido de la fermentación inicial, pero propiamente por la acumulación de iones SO_4 en el último estado, la fermentación es comunmente muy ineficiente y termina rápido, lejos de la consumación de los azúcares presentes. Esta dificultad puede ser evitada agregando aproximadamente la mitad de la adición normal de sulfato de amonio y reemplazando el equivalente de la cantidad normal en la forma de hidróxido de amonio, cuando la fermentación está aproximadamente a la mitad de su camino.

En tales casos se ha encontrado que una fuente barata de proteínas, tal como sangre seca o desperdicios de las fábricas de carne enlatada, puede ser más eficiente y más económica que el nitrógeno inorgánico, con el provecho adicional de la acción bofer y la pérdida de la reacción ácida a partir de los iones SO_4 acumulados. En todas estas fermentaciones industriales, por lo que toca a la nutrición necesaria del agente de fermentación empleado, el remedio deberá ser obtenido por las pruebas de laboratorio, en las cuales, las deficiencias de las mieles en cuestión, serán reveladas estableciendo una comparación de las eficiencias de fermentación sin la adición de material nutritivo, y con adición de éste.

En tales pruebas, se emplea la cantidad de ácido, las cantidades de materiales nitrogenados, fosfatos, y los estimulantes que han sido descritos anteriormente; todos éstos valuados adecuadamente y el resultado se llevará al proceso de la planta. En las pruebas de laboratorio para la fermentación del alcohol etílico, la eficiencia de fermentación puede ser cabalmente exacta determinándola meramente por registro de la pérdida de peso en los frascos que contienen el mosto, tratado en varias formas como antes se indicó. Se ha encontrado que pruebas hechas en 200 a 300 c.c. de mosto, dan índices muy satisfactorios para resultados obtenidos en la práctica industrial.

En todas estas pruebas de escala de laboratorio, la mayor parte de las fermentaciones será invariablemente retardada, y las eficiencias finales, usualmente más lentas que la actual recuperación en la fábrica; aunque se empleen cultivos puros de levadura, adecuados al control bacteriológico

y químico. La explicación de esto, es que, en grandes volúmenes de líquido fermentado, el volumen de los gases que escapan crea más agitación en el líquido que la que ocurre en los frascos del laboratorio, y el desarrollo natural del calentamiento en grandes volúmenes de líquido dá un levantamiento uniforme de temperatura al mosto el cual parece sincronizar con lo que desea y requiere el desarrollo de las células.

Para duplicar las condiciones industriales en pruebas de laboratorio, sería de desearse tener las fermentaciones conducidas en grandes receptáculos donde la porción de un galón puede ser inoculada, y hacer provisiones por el aumento lento de la temperatura durante todo el período de fermentación. Esto puede ser llevado a cabo por el uso de un baño de agua con control de temperatura, de tal manera que la misma pueda ser subida gradualmente y su curva sea formada para sincronizar con el desarrollo de calor en grandes fermentaciones empleadas en la práctica industrial. También es necesario tener agitadores en los vasos de fermentación para estimular tan estrechamente como sea posible el movimiento del líquido durante la fermentación en práctica, y cuando la agitación y la temperatura se mantienen controladas, se hallará que la eficiencia industrial y el tiempo de fermentación, pueden ser confrontados.

Sin embargo, para duplicar la práctica industrial en una forma más estrecha, es aconsejable usar semilla idéntica a la utilizada en la factoría de fermentación con la aereación y tratamiento que ésta recibe en la fábrica, ya que está dotada con un grado de vigor que difícilmente puede ser igualado por el más esmerado cultivo de laboratorio.

VII.—ACTIVIDAD DE LAS CELULAS DEL AGENTE DE FERMENTACION, FRENTE A LOS AZUCARES RESIDUALES.

En algunas fermentaciones debemos mirar el agente de fermentación entre levaduras, bacterias y hongos, como un sistema osmótico utilizando únicamente sustancias disueltas las cuales pueden penetrar las paredes de las células, siendo afectadas en su crecimiento y actividad zimógena por la rapidez con que estos materiales nutritivos y estimulantes entren a las células de los organismos en estudio.

Al tratar con medios mieles para una fermentación industrial, debemos empezar con un substracto regularmente rico en carbohidratos fermentables, pero éstos son progresivamente disminuídos durante el curso de la fermentación hasta que se llega en las últimas etapas a un medio empobrecido, en el que los sólidos no azúcares predominan sobre los carbohidratos fermentables presentes, de este modo crean una condición donde las células del agente de fermentación están rodeadas de un medio pobre en azúcares en lugar de uno rico en éstos.

La eficiencia final de la fermentación por lo tanto, dependerá de "la actividad de las células del agente de fermentación para hacer contacto con los azúcares residuales en el último estado de fermentación y para

mantener su actividad en este caso de substracto empobrecido, hasta que la última traza de azúcares originalmente presentes ha sido convertida en los productos deseados, ya sea que se trate de alcohol-acetona o algún producto de otras fermentaciones". En este estado final de fermentación, la habilidad para utilizar el último resto o traza de azúcares fermentables, depende de un gran número de factores de los cuales los más importantes son los siguientes:

La agitación o movimiento del medio, el cual asegura la exposición de las células vivientes del agente de fermentación a los azúcares fermentables.

Las características físicas de la periferia de las células del agente de fermentación.

La acumulación de productos tóxicos.

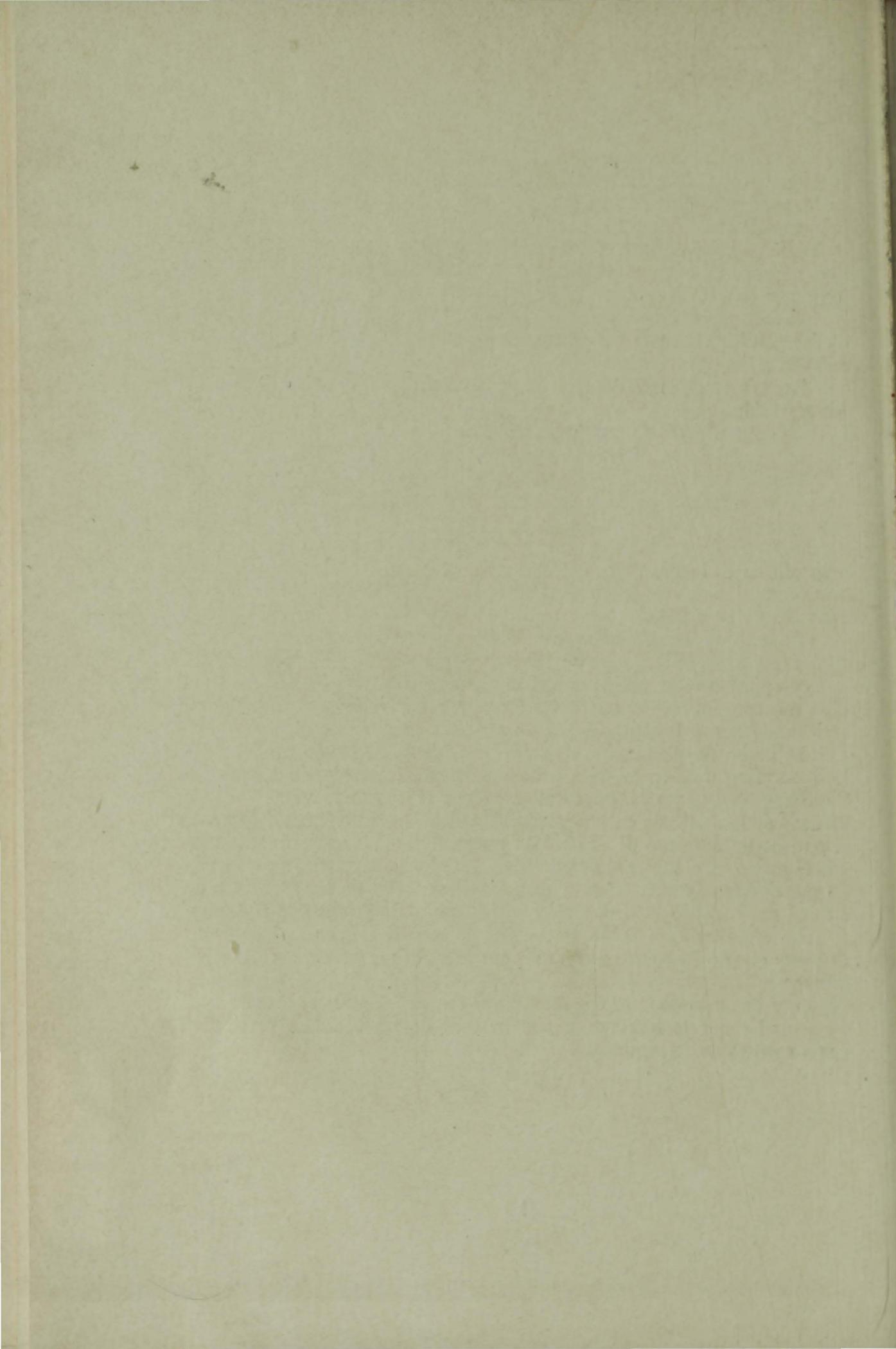
La consumación de las sustancias nutritivas del mosto.

Fermentaciones eficientes pueden ser incrementadas en muchos casos por la aclimatación de la levadura agente de fermentación a medios que contengan alta proporción de no azúcares. Esto puede ser llevado a cabo por el desarrollo de los organismos en una mezcla del mosto y los desperdicios derivados de la destilación de el mismo, en proporciones de este último incrementadas gradualmente hasta que llega a adicionarse una cantidad de 10 a 20%.

La adición de pequeñas cantidades de carbón activado, también conserva y protege al agente de fermentación a partir de productos tóxicos que puedan estar presentes, así como para ejercitar también la función de sostenimiento a concentraciones más favorables de azúcares fermentables, por la absorción de no azúcares en el substracto.

El hecho de que muchos de estos azúcares residuales en medios mieles son realmente fermentables y no meramente infermentables, está demostrado, porque en la práctica, al volver al mosto la vinaza o desperdicio de la destilería en una proporción al 10% del volúmen del mosto, se obtiene un aumento de alcohol en proporción a los azúcares adicionados al mosto en el material desperdicio. Este hecho también es atestigüado por el éxito fermentativo al usar los desperdicios de las destilerías de alcohol en la producción de ácido butírico y otros ácidos por bacterias.

Lo anteriormente dicho indica que la presencia de muchos de los azúcares que no fermentaron en medios mieles, es un resultado de la concentración infavorable de no-azúcares en el estado final de la fermentación, y que cuando la propia dilución es efectuada, éstos son fácilmente fermentados por la levadura y por muchas de las bacterias empleadas como agentes de fermentación.



ANALISIS QUIMICOS

Se presenta un análisis llevado a cabo, utilizando miel final de la fábrica de alcohol "El Potrero", Veracruz.

Para el efecto, se consultaron "Métodos para determinar la uniformidad y calidad de los azúcares blancos, incluyendo métodos analíticos para los jugos y masas rocidas"; "Manual de fabricantes de azúcar de caña y químicos azucareros (Spencer-Meade-Bourbakis), y éste mismo manual de los autores Spencer y Cuadrado.

DETERMINACIONES HECHAS:

I.—HUMEDAD:

Peso constante de las cápsulas (fondo plano), conteniendo arena:

Cápsula # 1 — 58.9881 grms. más 5 grms. de miel — 63.9881.

Cápsula # 2 — 58.3711 grms. más 5 grms. de miel — 63.3711.

Se desecó en la estufa durante cinco horas a 110° C; enfriadas en desecador una hora y pesadas de nuevo:

Cápsula # 1 — 62.9841 grms.

pérdida de peso — 1.0040 grms. x 20 — 20.080 humedad %.

Cápsula # 2 — 62.3680 grms.

pérdida de peso — 1.0031 grms. x 20 — 20.062 humedad %.

Promedio — 20.071%

Humedad anotada — 20%

II.—CENIZAS. "Normal".

Cápsulas de fondo plano a peso constante:

Número 1 — 59.9981 más 5 grms. de mieles.

Número 2 — 58.7634 más 5 grms. de mieles.

Las mieles se desecaron poco a poco con el mechero de Bunsen, hasta llegar a quedar reducidas a carbón; a continuación se calentaron al rojo obscuro en el horno (500° C), hasta obtener ceniza blanca; se humedeció con una pequeña cantidad de carbonato de amonio, y se calentó de nuevo al horno, dejándose enfriar en desecador, y se tomó el peso:

Peso del crisol # 1 con ceniza — 59.5860 grms.

Diferencia en le peso — 0.4121 grms.

0.4121 x 100

————— 8.242% de ceniza

Peso del crisol # 2 con ceniza — 58.3711 grms.

Diferencia en el peso — 0.3923 grms.

0.3923×100

————— 7.846% de ceniza

5

Ceniza promedio 8.044.

Ceniza anotada — 8%.

Coloraciones a la flama dieron por resultado: Ca, Sr, Ba, Na, y K.

Por el porcentaje obtenido en cenizas se deduce que las substancias minerales encontradas en éstas, estarán más o menos en la proporción señalada por Browne en análisis efectuados en Luisiana.

Debido al factor tiempo y a la cantidad tan grande de cenizas que había que reunir para obtener cuando menos 20 gramos (no se valoran sus componentes).

III.—AZUCARES:

Brix a 20°	93.11
Densidad	1.5045
Sacarosa aparente	32.00 %
Sacarosa verdadera	35.64 „
Reductores directos	20.54 „
Reductores totales	58.51 „

IV.—NITROGENO:

Cuerpos nitrogenados — 2.08%.

Nitrógeno total — 0.59%.

Estos valores fueron determinados como sigue:

(1) Nitrógeno.—Se disuelven 10 grms. de miel en 400 c. c. de agua destilada; se adicionan 20 c.c. de solución de sosa al 50% y se destila el amoniaco bajo presión reducida a una temperatura no mayor de 60°C. en 100 c.c. de HCL 0.01 N. Se titula el exceso de ácido con NaOH 0.01 N. Se hace una prueba en blanco con los reactivos y el agua. Se calcula el N presente como NH₃

(2) Nitratos.—A un duplicado igual a la solución preparada para el amoniaco, se agrega 1 grm. del polvo Devarda, y se deja que la reducción se efectúe cuando menos una hora. Se destila el amoniaco y se titula como en la determinación anterior. Del amoniaco encontrado se resta el de la determinación en blanco y, además, el valor del nitrógeno (que se dió en (1) como amoniaco). El resultado del N presente se dá en N₂O

(3) Nitrógeno total.—Modificación al método de Kjeldahl. En un frasco Erlenmeyer, adaptado a un frasco lavador que contenga ácido sulfúrico para evitar que se escape el amoniaco, se disuelven 10 gramos de miel en una pequeña cantidad de agua destilada; se adiciona 1 gramo del polvo Devarda y 2 c.c. de solución de sosa al 50%; se deja que la reducción se efectúe durante toda la noche. Se unen las soluciones, la del frasco lavador y la del matraz; se acidifica con 10 c.c. de ácido sulfúrico di-

luido 1:1, se evapora el exceso de agua y se analiza el N por el método Kjeldhal usando 45 c.c. de ácido sulfúrico concentrado y de 6 a 8 gramos de sulfato de potasio cristalizado.

(En el polvo Devarda hay el suficiente cobre para la catalización de oxidación, sin necesidad de agregar cristales de sulfato de cobre). Se hace la misma determinación en una prueba en blanco con el agua y los reactivos. El resultado se dá como % de nitrógeno.

(4) Nitrógeno protéico.—Se disuelven 10 gramos de miel en 20 c.c. de agua destilada, se adiciona igual volumen de ácido tricloroacético al 5%, se mezcla y deja reposar toda la noche.

Se filtra, se lava bien y se hierve el líquido filtrado y sus aguas de lavado, durante unos quince minutos. Después se neutraliza el ácido con solución de sosa al 50% agregando un exceso de 2 c.c. y un gramo de reactivo Devarda, en seguida se procede como para el N. total.

Se hace prueba en blanco para determinar nitrógeno en el agua y reactivos.

La diferencia del valor que se encuentra para nitrógeno total, y el valor obtenido de la filtración después del tratamiento con ácido tricloroacético, es el nitrógeno proteico. Se calcula como N%.

V.—DETERMINACION DE GOMAS.—Valor encontrado 1.004%

La determinación fué hecha por el método de Ruff y Withrow, "para azúcares y meladuras".

VI.—ACIDOS LIBRES Y ACIDOS COMBINADOS.—Se llevó a cabo su determinación como se procede para la determinación de éstos en los vinos.

RESULTADOS:

Acidos libres — 1.904%.

Acidos combinados — 4.020%.

Como datos útiles que proporcionan un índice respecto a composición de las mieles finales mexicanas, se hace acopio de los siguientes análisis:

SAN CRISTOBAL, VER.

	I	II	III
Brix a 20°C.	86.90	87.42	85.45
Densidad correspondiente	1.4610	1.4644	1.4506
Sacarosa. (polarización directa).	28.00	31.00	24.00
Sacarosa. (polarización Clerget).	34.00	37.55	30.91
Reductores directos	22.60 %	26.60 %	25.10 %
Reductores totales por inversión	59.10 %	66.20 %	58.00 %
Coefficiente de pureza aparente	32.2	35.5	28.10

EL POTRERO, ATOYAC, VER.

	I	II	III
Brix a 20°C.	83.80	90.0	87.85
Densidad correspondiente.	1.4397	1.4826	1.4672
Sacarosa. (polarización directa).	26.50	28.00	29.00
Sacarosa. (polarización Clerget).	34.50	35.43	36.80
Reductores directos.	18.85 %	23.02 %	18.10 %
Reductores totales por inversión.	55.72 %	60.07 %	57.40 %
Coefficiente de pureza aparente.	31.6	31.11	33.0

ATENCINGO, PUE.

	I	II	III
Brix a 20°C.	88.00	86.50	88.00
Densidad correspondiente.	1.4686	1.4582	1.4686
Sacarosa. (polarización directa).	23.00	23.00	32.00
Sacarosa. (polarización Clerget).	31.18	31.30	31.30
Reductores directos.	17.31 %	18.94 %	18.13 %
Reductores totales por inversión.	50.59 %	51.95 %	51.61 %
Coefficiente de pureza aparente.	26.13	26.58	26.13

ZACATEPEC, MOR.

	I	II	III
Brix a 20°C.	91.00	82.50	85.00
Densidad correspondiente.	1.4896	1.4309	1.4479
Sacarosa. (polarización directa).	34.50	29.00	32.00
Sacarosa. (polarización Clerget).	39.72	33.92	37.41
Reductores directos.	17.32 %	17.72 %	14.84 %
Reductores totales por inversión.	59.15 %	53.03 %	54.15 %
Coefficiente de pureza aparente.	37.91	35.15	37.65 %

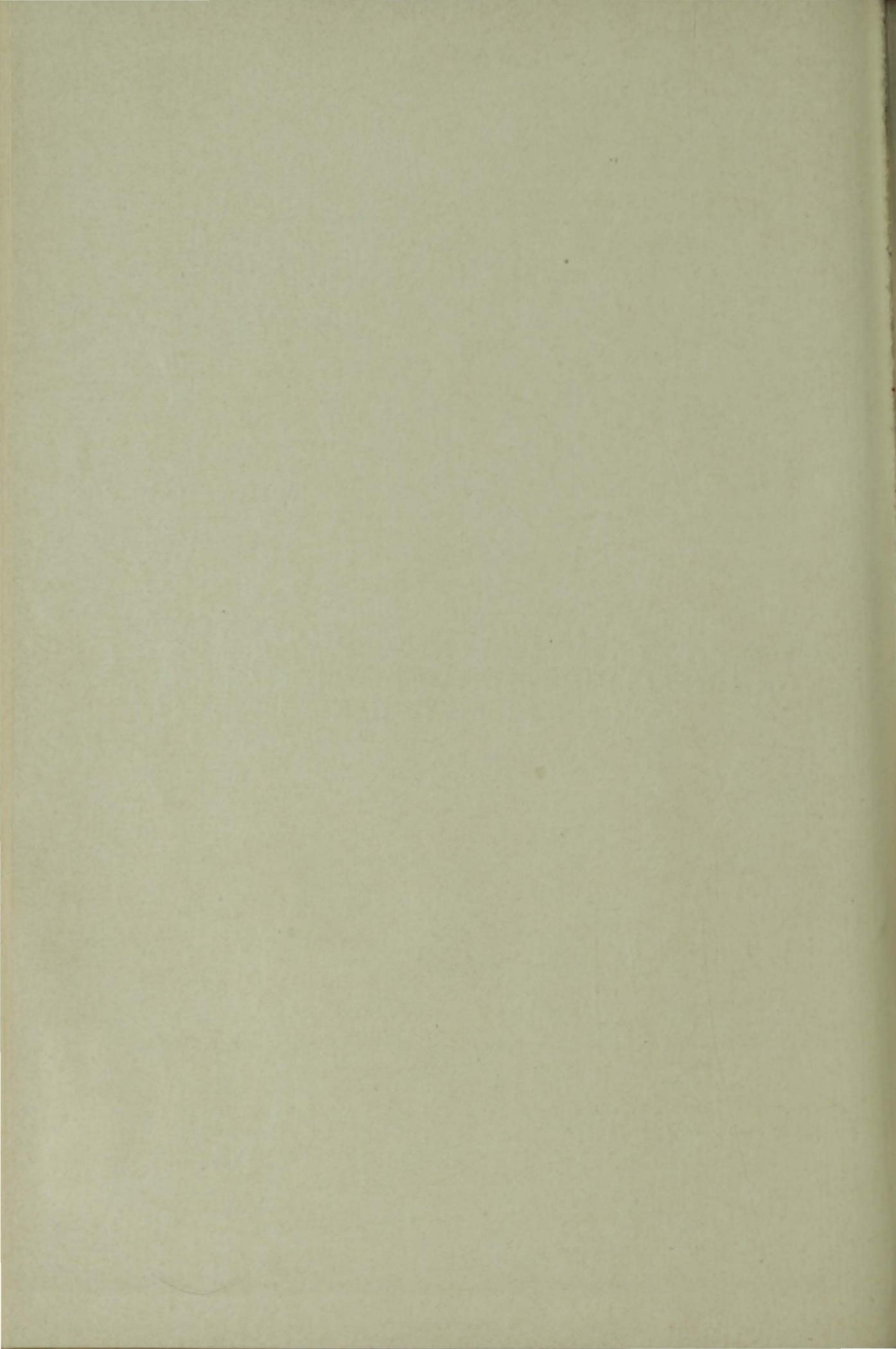
EL MANTE, TAMPS.

	I	II	III
Brix a 20°C.	89.30	94.70	84.00
Densidad correspondiente.	1.4777	1.5159	1.4411
Sacarosa. (polarización directa).	31.00	32.5	29.00
Sacarosa. (polarización Clerget).	36.50	38.15	32.80
Reductores directos.	14.50 %	11.88 %	20.80 %
Reductores totales por inversión.	53.40 %	52.4 %	54.80 %
Coefficiente de pureza aparente.	33.6	34.3	34.50

LOS MOCHIS, SIN.

	I	II	III
Brix a 20°C.	92.5	95.00	93.00
Densidad correspondiente.	1.5002	1.5181	1.5038
Sacarosa. (polarización directa).	31.50	31.00	32.00
Sacarosa. (polarización Clerget).	36.50	36.20	36.20
Reductores directos.	17.30 %	14.80 %	16.60 %
Reductores totales por inversión.	56.60 %	52.00 %	54.90 %
Coefficiente de pureza aparente.	34.1	32.6	34.4

AISLAMIENTO Y ADAPTACION DE MICRORGANISMOS
QUE EN LAS MIELES FINALES DESARROLLAN
CON FINES INDUSTRIALES.



AISLAMIENTOS VERIFICADOS.

Se trató de obtener la mayoría de los microorganismos que tienen posibilidad de desarrollar en las mieles finales, logrando varios objetivos y aún otras bacterias que en el desarrollo de tales trabajos también se encontraron.

Por haberse agotado, con motivo de la guerra el (Film Pack Panatomic X o XX), no me fué posible presentar mayor número de fotomicrografías; pero como una prueba evidente, se tienen varios cultivos entre hongos, levaduras y bacterias.

En aislamiento se obtuvieron:

1.—Bacilo *Delbrückii* (a partir de los granos de cebada y por el procedimiento señalado en el Jøergensen, publicación, de 1939).

2.—*Acetobacter Xylinum*, (aislado de la madre del vinagre).

3.—Bacilo butírico, (aislado de las semillas del achiote "Bixa orellana").

4.—Regeneración de levaduras, tratadas por el método de Lidner, y acondicionadas a un Brix de 20 a 32 para mieles finales.

5.—Hongos aislados de la malta verde, frutos y productos amiláceos;

Aspergillus niger, negro (productor de ácido cítrico); *Penicillium glaucum*, denominado por algunos autores (*penicillium citrinum*).

Estos dos últimos hongos fragmentaron el medio de cultivo de Doelger y Prescott, utilizado para hongos productores de ácido cítrico.

Mis investigaciones referentes a hongos, fueron encaminadas a buscar el *Citromiceto Pfeiffer*, el cual es probablemente identificado como *Citromyces glaber* de Wehmer, pero la premura del tiempo, suspendió estos trabajos.

Otros microorganismos encontrados o aislados en el transcurso de estas investigaciones:

Lactobacilo Delbrückii, (a partir de la leche).

Azotobacter, (aislado de los tubérculos de las leguminosas).

Rodotorula var. *coralloides* (les denomina así el señor Profesor Manuel Ruiz O. en "Anales del Instituto de Biología, Tomo XIV, Núm. 1, (1943)", debido a que en sus cultivos predominan el color coral ya sea en rosa coral o rojo coral).

Sarcinas (encontradas y aisladas de los mostos de Cerveza con estiércol de caballo).

Aspergillus niger amarillo, y otros hongos de menor importancia para el caso.

UTILIDAD DEL LACTOBACILO DELBRUCKII Y ACETOBACTER XYLINUM.

La guerra actual ha ocasionado dificultades en la adquisición y transporte de muchos productos químicos, entre los cuales pueden incluirse los ácidos minerales que frecuentemente se usan en la desincrustación de los aparatos evaporadores y en la limpieza de las calderas de vapor.

La carencia de un artículo crea la necesidad de buscarle sustituto, así, el ácido clorhídrico, por ejemplo, puede ser reemplazado por otros ácidos orgánicos, para ciertas aplicaciones industriales como la que antes se indicó, por ser algunos de ellos fáciles de obtener.

Desde hace mucho tiempo, en algunas fábricas de azúcar y destilerías extranjeras, ni cluyendo las de Cuba, se han usado los ácidos orgánicos generados en la fermentación espontánea del azúcar o las mieles, y no precisamente por la dificultad de adquirir ácido clorhídrico, sino por resultar este procedimiento más barato y menos molesto de practicar.

En los ingenios de Hawaii, se utilizan rutinariamente las mieles, bien en el proceso de fermentación, o ya fermentadas, para limpiar las incrustaciones de los evaporadores.

Así es que estos ácidos pueden obtenerse en el ingenio a precios económicos, sin necesidad de instalaciones onerosas aunque sólo en forma diluída.

z

INCRUSTACIONES.—Las incrustaciones de las calderas de vapor, están constituídas generalmente por sulfatos y carbonatos de calcio y magnesio, y a veces por sílice y fierro. Las incrustaciones de los evaporadores están compuestas, más o menos, por los mismos elementos, según lo demuestra el siguiente análisis:

Fosfato de cal.	de 7 a 57%
Carbonato de cal.	de 3 a 9%
Silicato de cal.	de 7 a 8%
Sulfato de cal.	de 1.5 a 2%
Oxalato de fierro.	de 2 a 2.5%
Oxalato de cal.	de 0 a 11%
Sílice.	de 7 a 54%
Materia orgánica.	de 5 a 20%

En las incrustaciones de las calderas predominan las sales insolubles de calcio y magnesio, y en las de los evaporadores las de calcio y fierro.

Muchos de los ácidos orgánicos tales como láctico y acético, forman sales solubles con las citadas bases, lactatos de cal, de magnesio y de fierro, así como acetatos de los mismos metales, todos ellos solubles; por consiguiente, es lógico que esta acción disolvente de los ácidos mencionados, destruya las incrustaciones, aunque no con la rapidez que lo haría el clorhídrico, por ser un ácido más enérgico. Ello hará que se necesite

más tiempo de contacto, pero en cambio las superficies metálicas corren menor riesgo de ser atacadas.

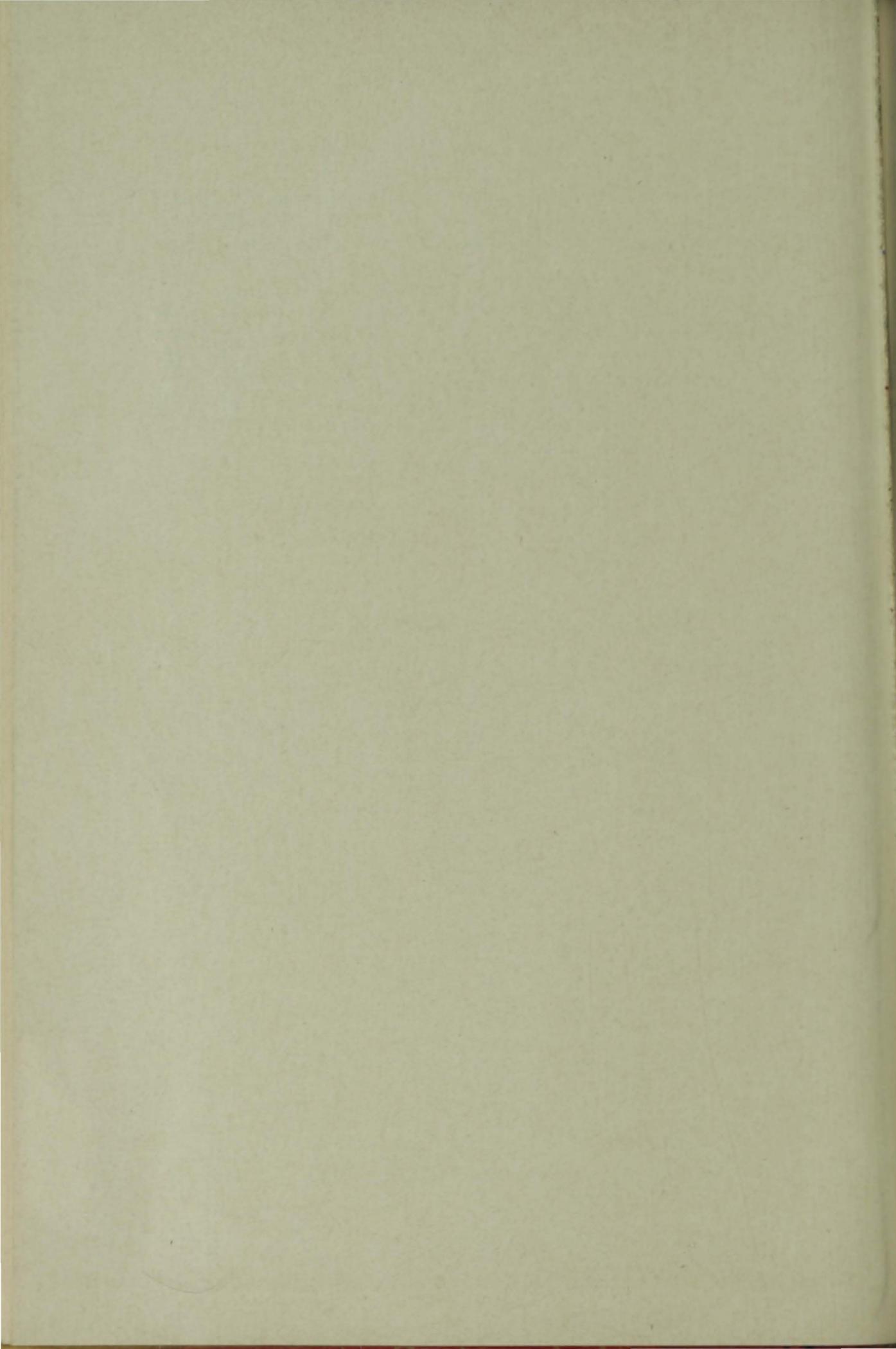
En síntesis, de todo lo que pudiera decirse, solamente señalaremos que: se pueden preparar ácidos orgánicos por fermentación del azúcar para reemplazar el ácido clorhídrico en la desincrustación de los aparatos del ingenio.

Los procedimientos más sencillos y económicos consisten:

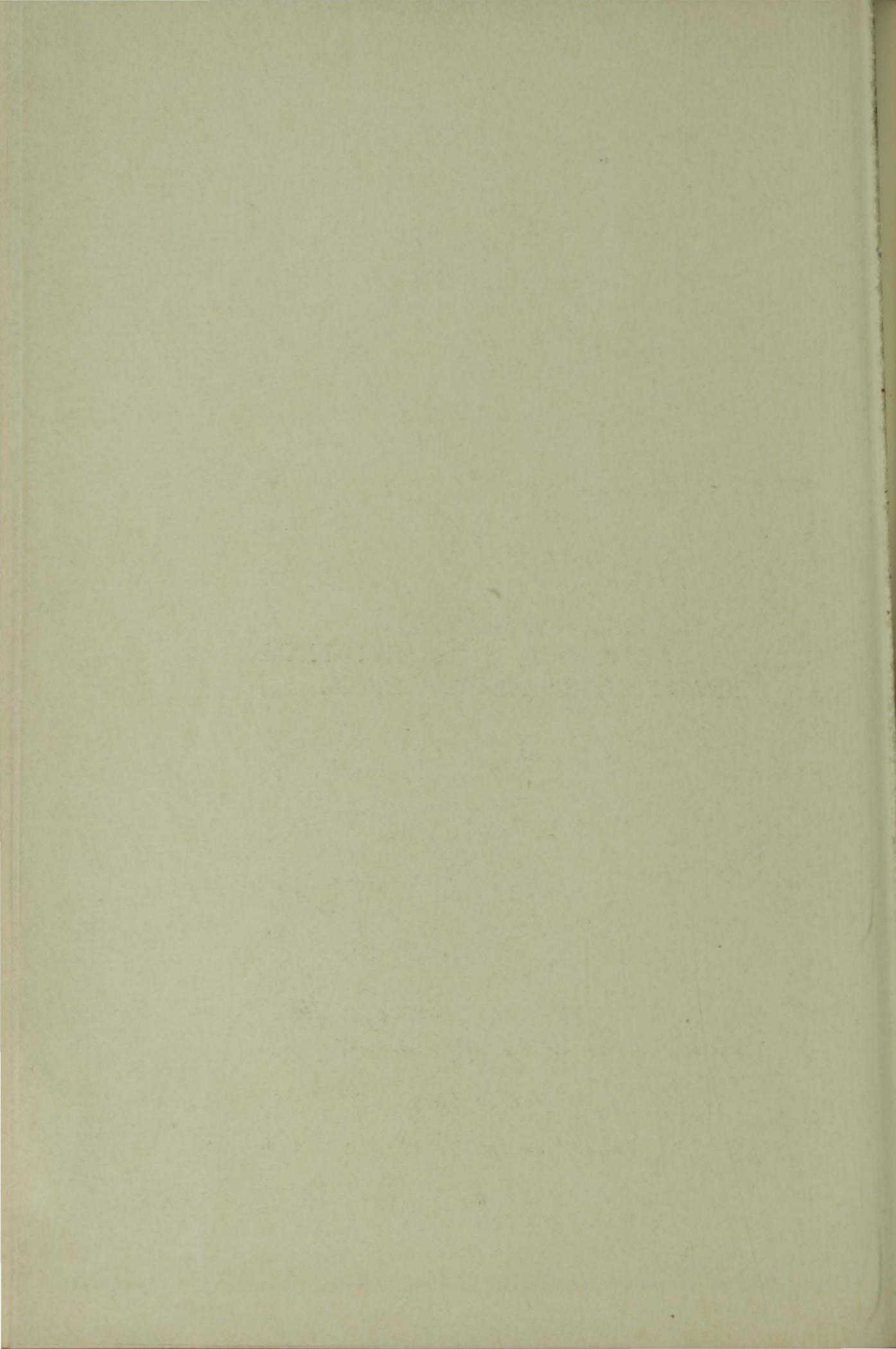
a).—En fermentar mieles o azúcar en forma adecuada, por medio de levadura, dentro del aparato incrustado, cuando hay tiempo para ello.

b).—En producir fermentación láctica de azúcar o miel, en recipientes apropiados, y utilizar el mosto ácido, cuando sea necesario.

c).—Fermentar adecuadamente miel o azúcar, y sobre el mosto alcohólico, hacer actuar bacterias productoras de ácido acético para utilizar el vinagre como desincrustante.



SOBRE LA FERMENTACION
BUTANOL - ACETONICA, UTILIZANDO MIELES
EINALES COMO MATERIA PRIMA.



De todas las fermentaciones industriales en las cuales pueden utilizarse melazas como producto crudo, la fermentación butanol acetónica es una de la más interesantes; la más compleja; la más intensamente estudiada y al mismo tiempo la que posee mejores posibilidades industriales.

Como indicación de las investigaciones a este respecto y de la abundancia de literatura de patentes que ya existen, Smith y Obold (*Industrial Microbiology*, Smith, H. F. and Obold, W. L., 1930), señalan veintuna de los E. U., y dieciséis inglesas, de las cuales sólo una de ellas incluye el uso de las melazas como producto crudo.

Es casi completamente conocida la historia del desarrollo de esta industria, pues ella se ha tratado extensamente tanto en periódicos técnicos como en la prensa popular. Empezó, como industria de guerra, a abastecer de acetona, y después, en tiempo de paz, se desarrolló un proyecto enorme cuya finalidad era abastecer de butanol para los barnices de la industria automovilística, verificándose la producción hasta alcanzar cincuenta millones de libras por año. En estas patentes originales se usaba casi exclusivamente el maíz como materia prima; pero debido a los altos precios que llegó a alcanzar este cereal, se dió gran impulso a la investigación de otras fuentes de solventes más baratas.

La investigación de un microorganismo productor de butanol,, capaz de producir una conversión ventajosa de los azúcares de las mieles finales en solventes comerciales, ha ocupado la atención de los bacteriólogos durante varios años. La literatura a ese respecto, muestra que sólo recientemente sus esfuerzos han sido coronados por el éxito; pero la limitación del organismo aislado para la producción de butanol en las melazas, puede clasificarse como sigue:

I.—Insuficiente rendimiento de solventes;

II.—Falta de estabilidad del cultivo; los rendimientos descienden rápidamente como resultado de la deteriorización celular;

III.—Relaciones desventajosas de solventes producidos;

IV.—Inadaptabilidad a las mieles como medio de cultivo para su desarrollo, habiendo necesidad de proporciones más altas de mezclas amiláceas para las melazas.

Ahora bien; las bacterias capaces de aplicación industrial en la producción de solventes, pueden clasificarse de acuerdo a su facultad de utilizar el almidón y la sucrosa sin invertir, como sigue:

- 1).—Organismos capaces de fermentar almidones sin hidrolizar.
- 2).—Organismos incapaces de fermentar el almidón no hidrolizado o la sucrosa no invertida.
- 3).—Organismos capaces de fermentar las melazas invertidas.

De estos grupos, solamente en el segundo se han encontrado organismos que den proporciones ventajosas de solventes y rendimientos costeados de las mieles. Entre éstos, se pueden citar el *Clostridium propyl butylicum* de Legg y Müller (British Patent 415-312, Commercial Solvente, 1934), *Clostridium vicifaciens*, de Sherman y Erb (U. S. Patent 2,017,572, U. S. Industrial Alcohol Co., 1935), y el bacilo tetryl de Rafael Arroyo, (U. S. Appl'n. 715-374, allowed Dec. 1935).

De tales patentes, el procedimiento Arroyo parece ser el que más asegura el éxito comercial, debido a lo siguiente:

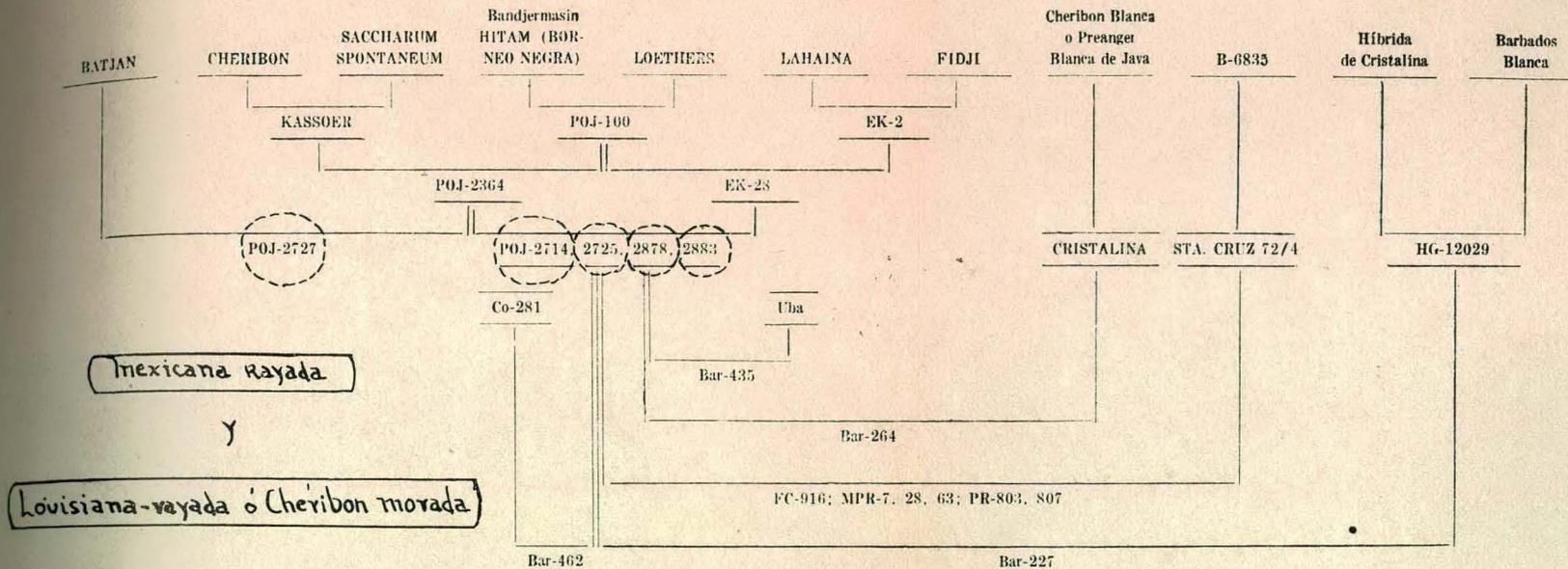
- 1.—El vigor del organismo.
- 2.—Su adaptabilidad característica a las mieles.
- 3.—Alta proporción de butanol sobre solventes, y
- 4.—Su facultad de fermentar mieles diluidas (sin esterilizar), eficientemente.

Teniendo en cuenta estos antecedentes así como la circunstancia de que la flora de los trópicos es rica en estos microorganismos, traté de buscar y comprobar la benevolencia de este nuevo agente de fermentación; más, por razones que huelgan, no fué posible que el autor de la patente pudiera esclarecer algunas de mis dudas y me vendiese un cultivo.

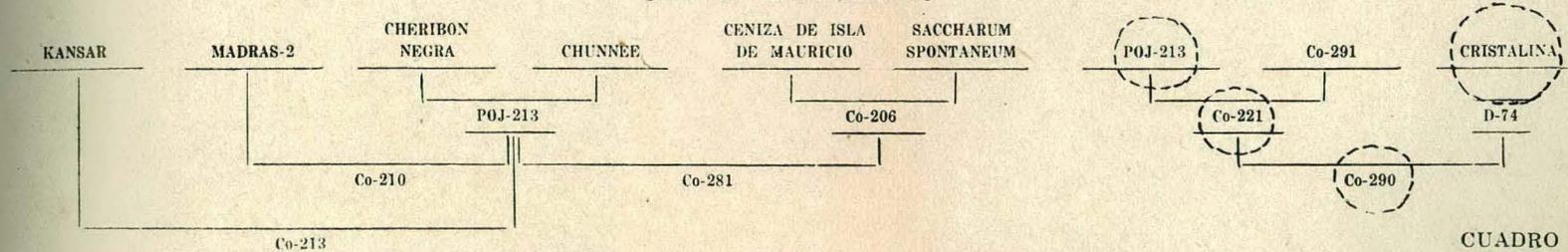
Buscando datos por otras partes, obtuve de la Estación Experimental de Agricultura de Río Piedras, P. R., el "The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico"; también obtuve, mediante permiso del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la patente Arroyo (2,113,417), y además, fueron traídos a México pedazos de caña de algunas variedades, entre ellas la Kassoer. Estas variedades han sido sembradas y se espera que desarrollen completamente para buscar en la Kassoer si está presente el microorganismo antes citado, y observar sus cualidades específicas pues es probable que, así como esta variedad de caña heredó de sus progenitores la riqueza en azúcar de la "Cheribon negra" y la resistencia de la "Saccharum spontaneum", también es probable que los microorganismos que en ella se encuentren, tengan mayor vigor y mejor adaptación a los azúcares, que todas las otras bacterias aisladas a partir de raíces de caña que crecen en mi país, y que fueron investigadas.

En el cuadro que se inserta a continuación, se encuentran señaladas todas las variedades que fueron estudiadas:

**GENEALOGIA DE ALGUNAS DE LAS VARIETADES DE MAYOR IMPORTANCIA
CAÑAS GRUESAS**



CAÑAS DELGADAS



CUADRO I

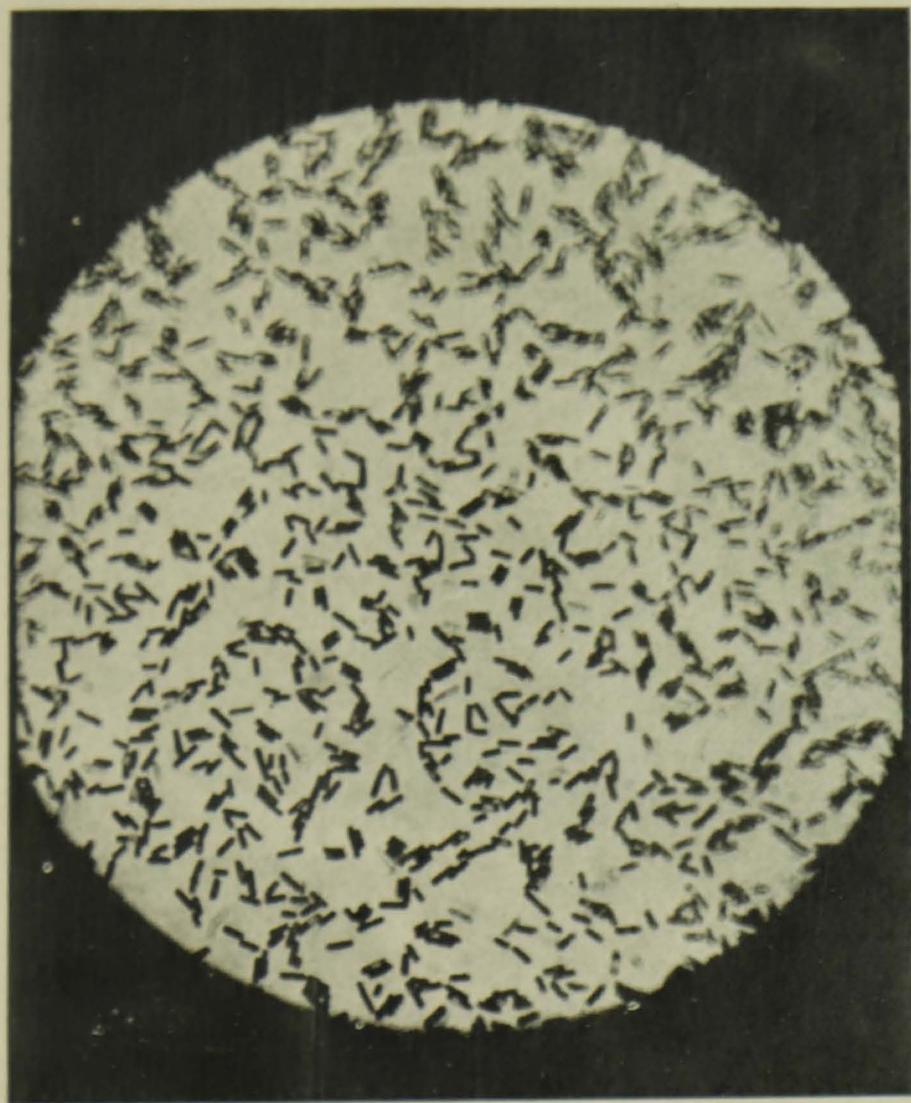
RESULTADOS :

Para la búsqueda en las raíces de caña del bacilo tetryl, se tuvo como norma de trabajo el mismo camino de la patente Arroyo, anteriormente señalada.

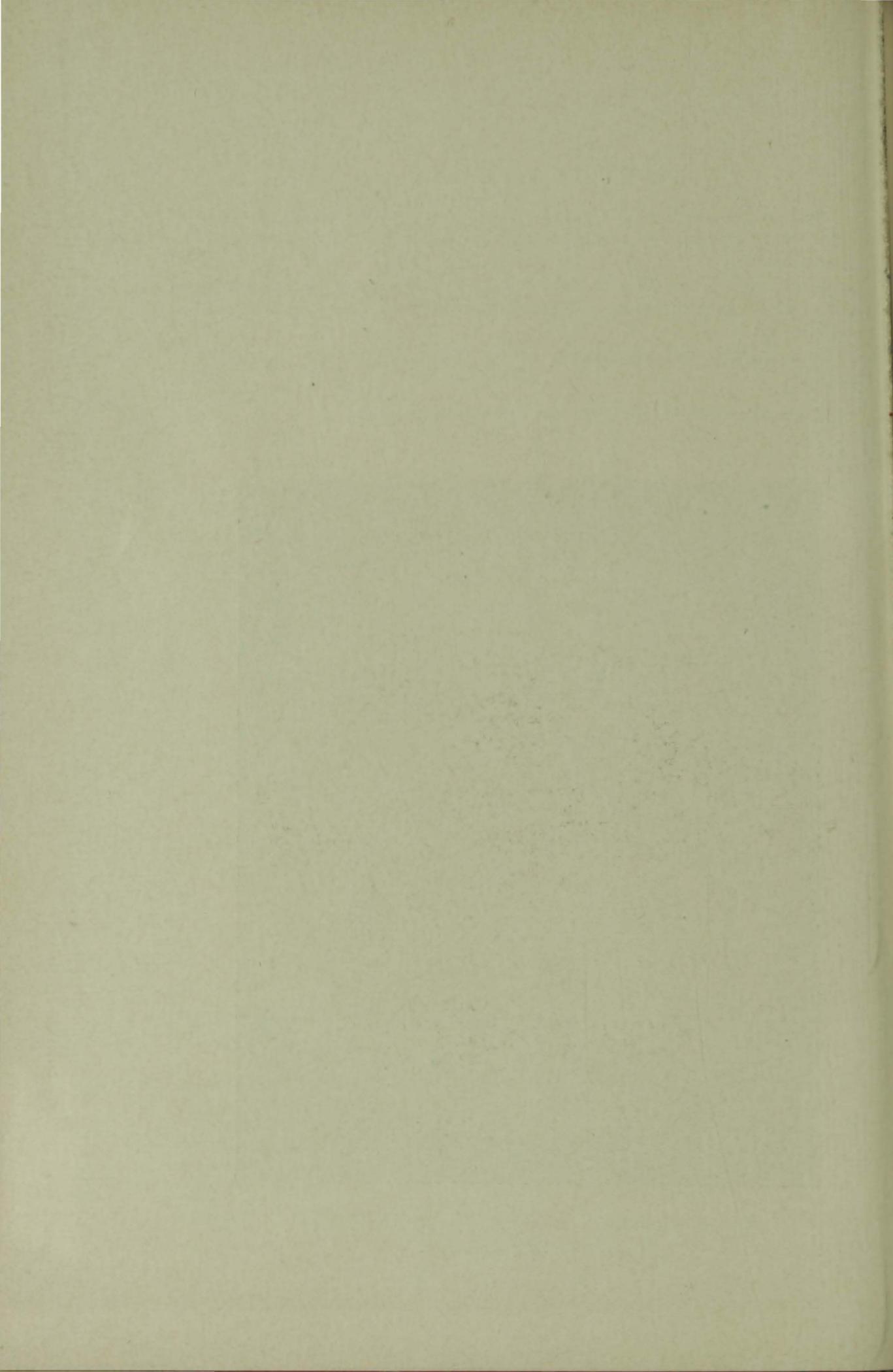
Siguiendo sus métodos, se llevó a cabo el aislamiento de una bacteria, la que aparentemente se vió fermentar un poco más que todas las otras pruebas.

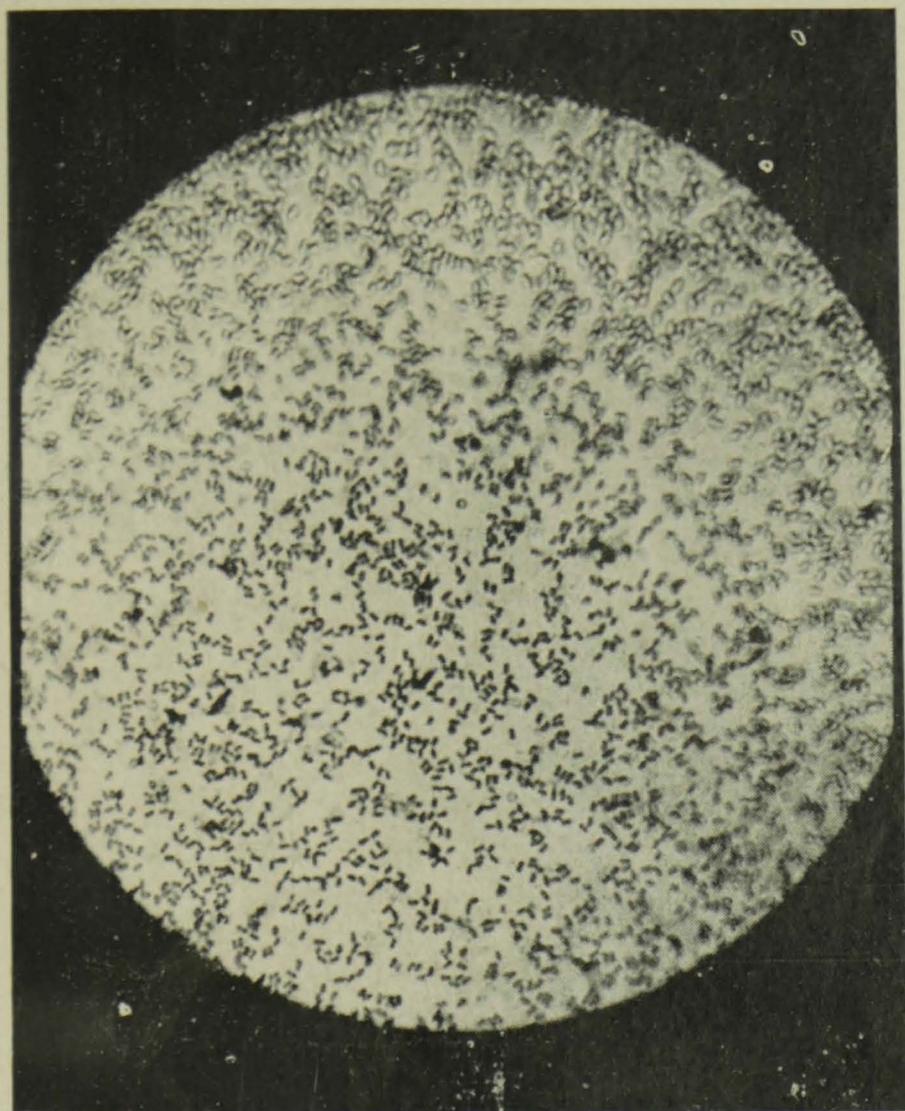
Esta bacteria fué encontrada en las raíces de la caña "mexicana rayada".

A continuación se incluyen sus micro-fotografías:

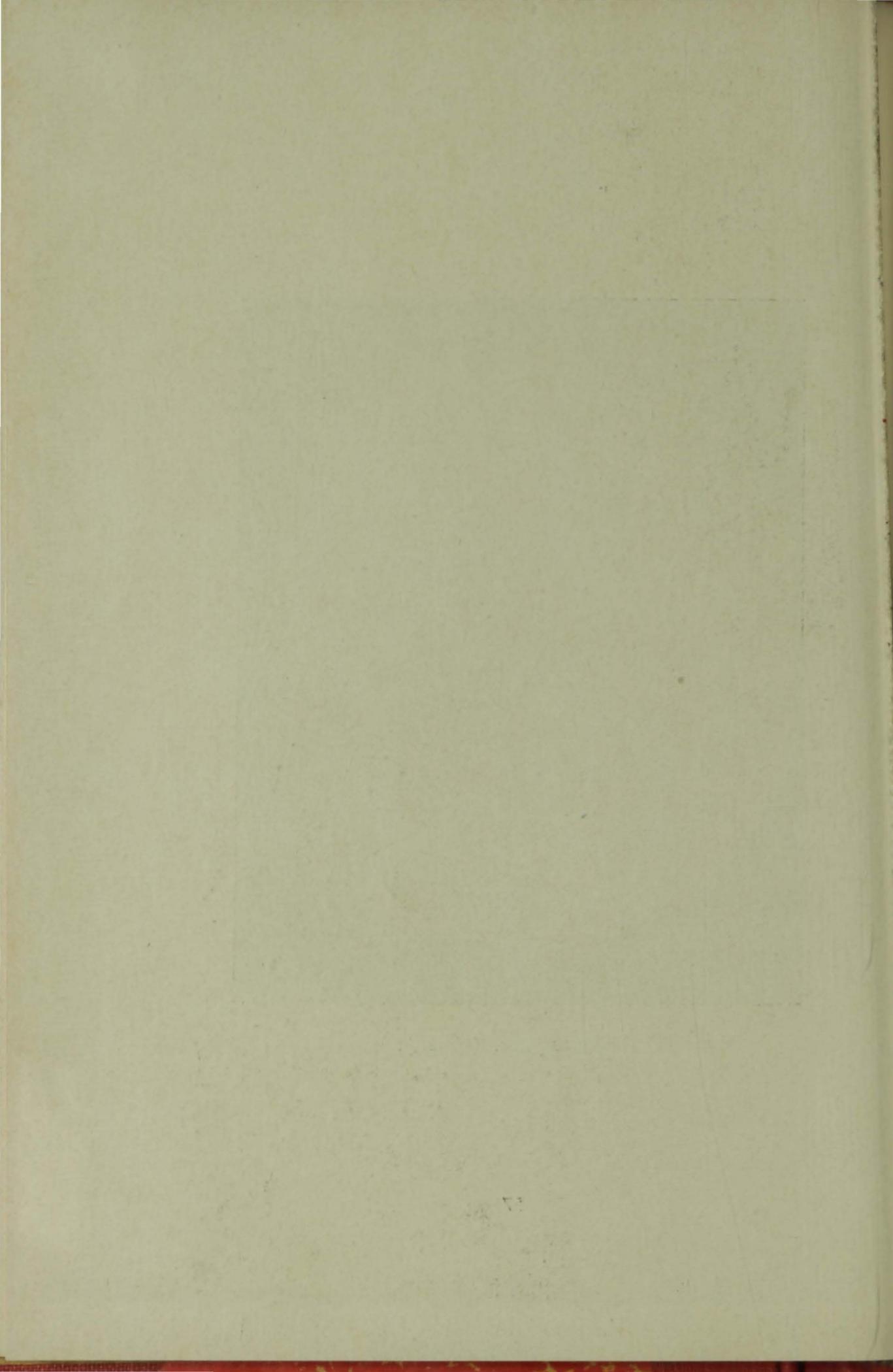


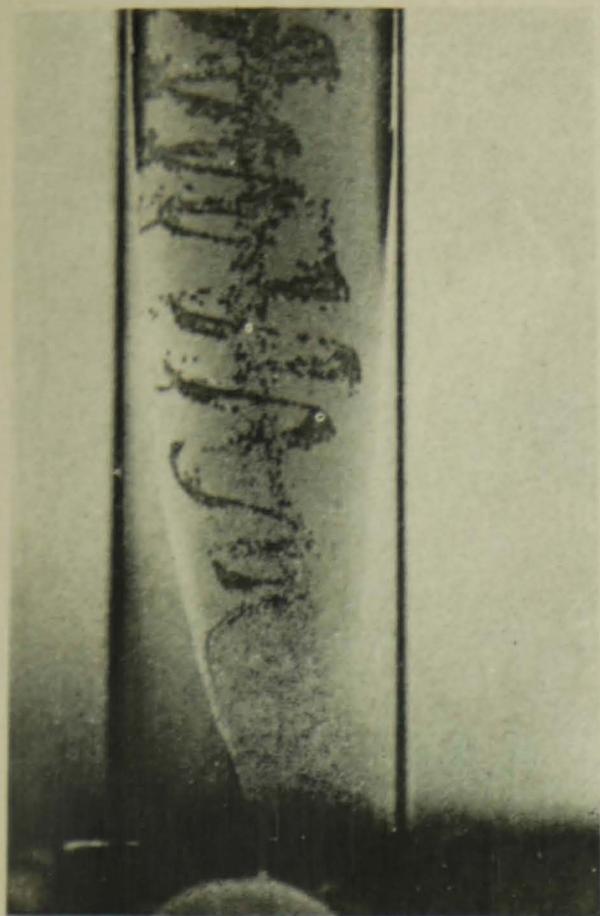
Formas vegetativas. (Gram.) pueden observarse las esporas en formación.



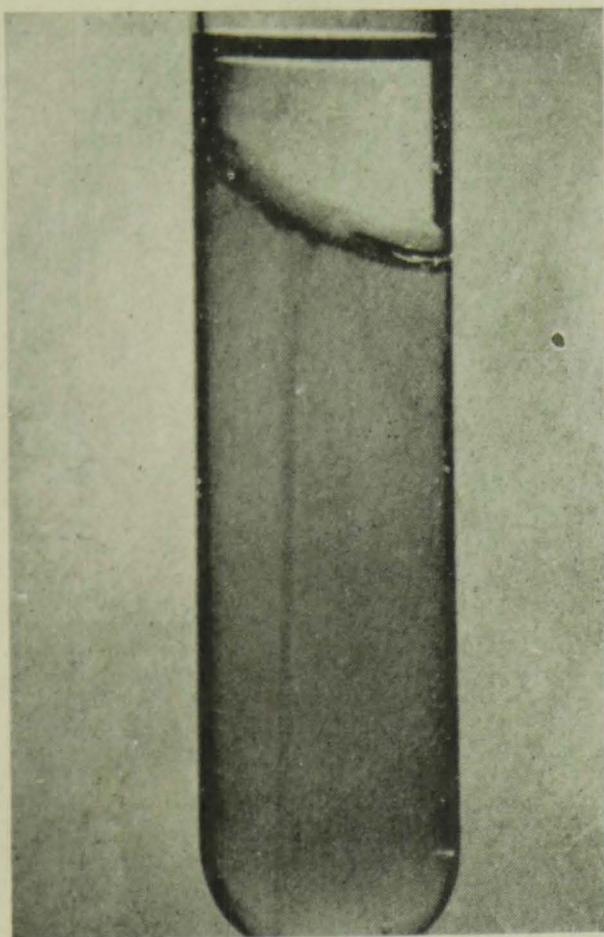


Formas esporas. (Gram.).

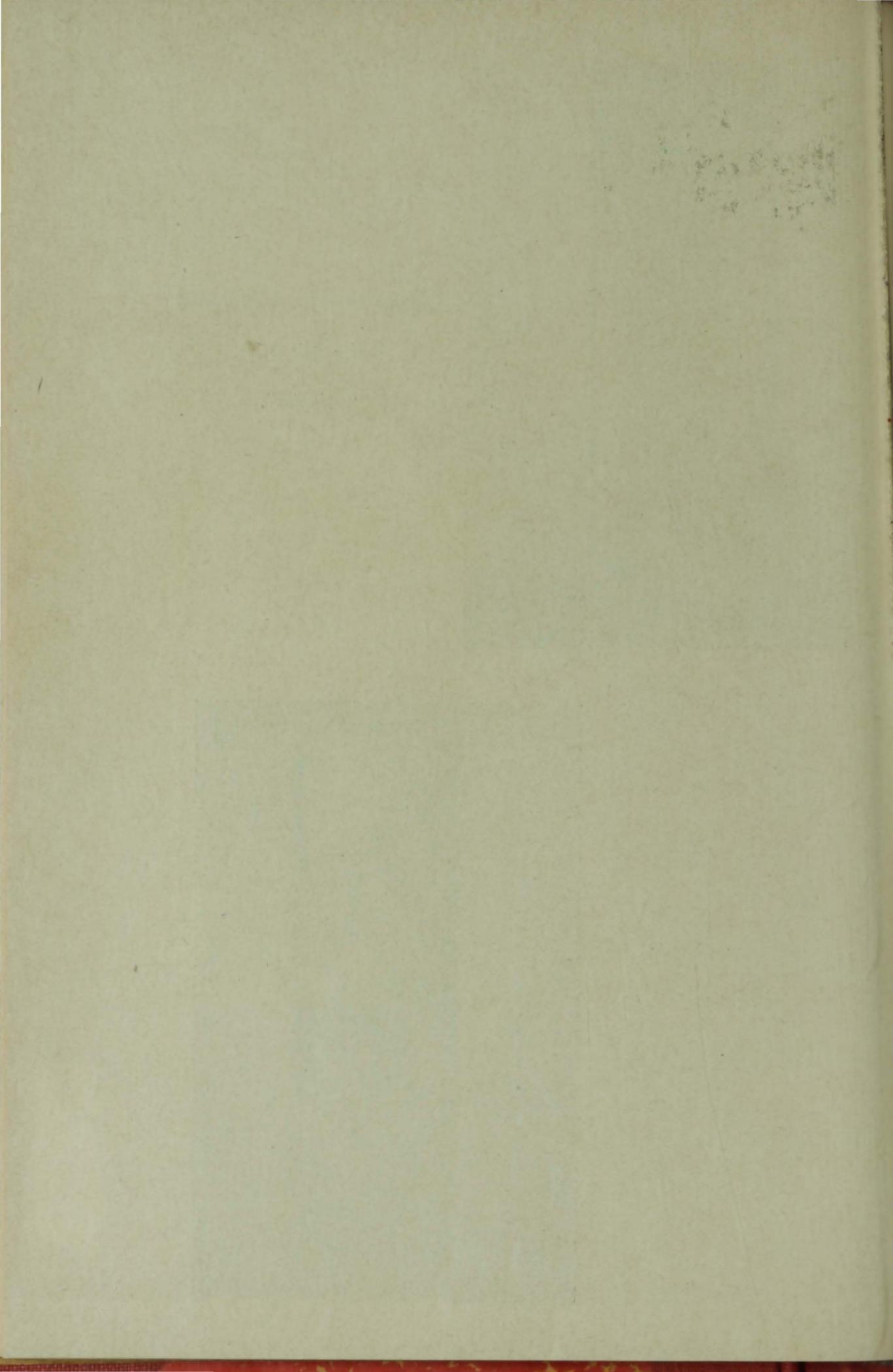




*Cultivo superficial en medio
malta piloncillo.
"colonias".*

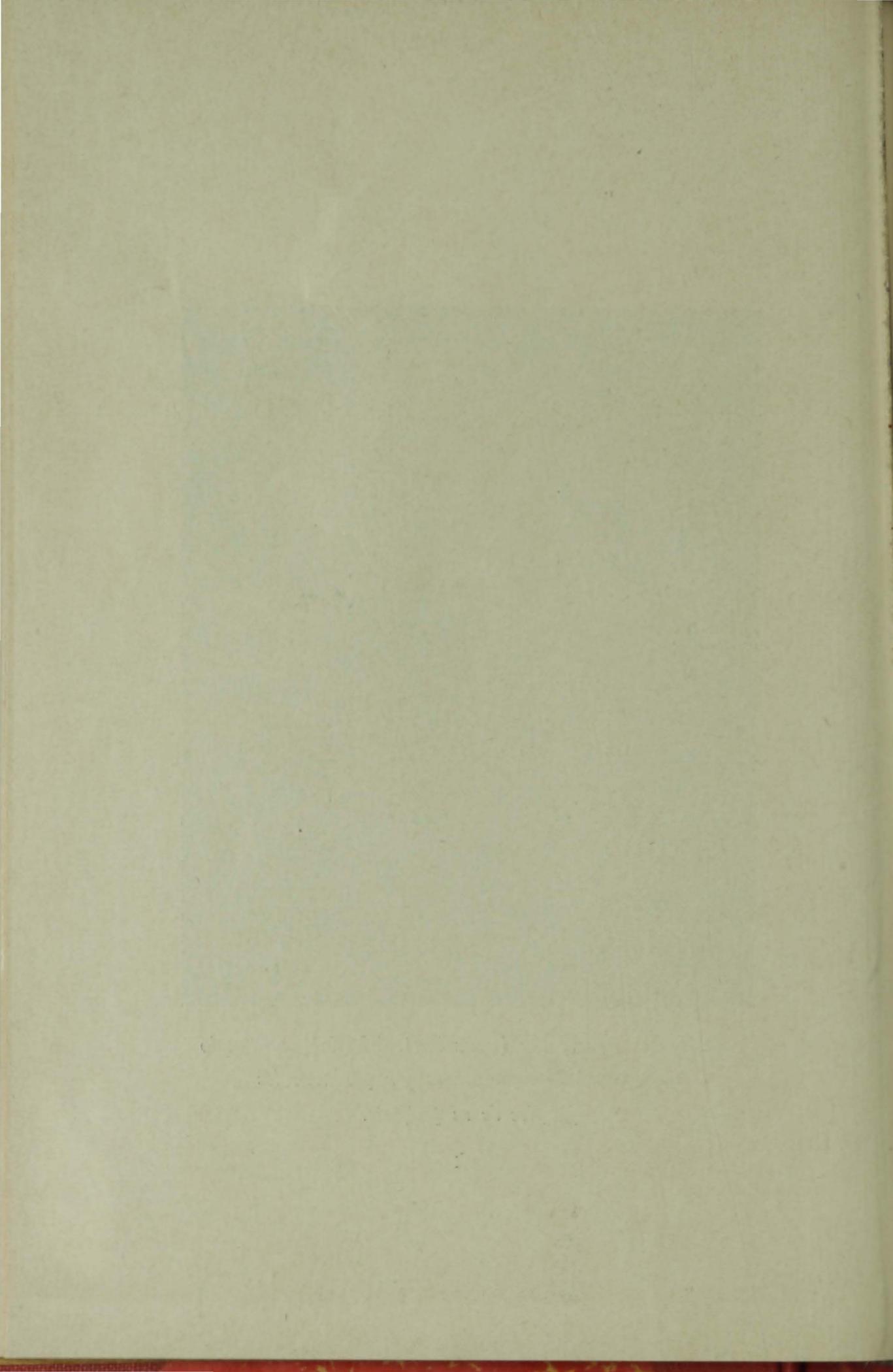


*Siembra en piquete
cultivo en
"malta gelatina".*





Frotis con tinta china (para bacteriología), mostrando la luminosidad diferenciada que producen los flagelos de su periferia.



Este microorganismo posee casi todas las características señaladas para el bacilo tetryl, pero tiene escasa habilidad fermentativa y no se acondiciona a densidades sucesivamente crecientes, debido a ésto no se pudo llegar en la práctica hasta la obtención de los productos deseados.

CARACTERISTICAS DEL BACILO ENCONTRADO

1.—MORFOLOGIA:

Células vegetativas, móviles en temprano estado; al pasar de un estado a otro, la movilidad es marcadamente inferior, perdiéndose finalmente tal movilidad, en los cultivos viejos.

Es anaerobio facultativo.

TEMPERATURA de incubación, 35°C.

EDAD.—Veinticuatro horas.—Las colonias se establecen en la superficie de la malta gelatina agar en placas invertidas.

FORMA.—Son bacilos que aparecen solos o en cadenas cortas.

DIMENSIONES.—De 1.5 a 5.6 micras, extremos redondeados.

TINCION.—Se tiñen fácilmente con violeta de gensiana o azul de metileno. Son gram positivo.

Esporas polares, forman endosporas casi todas medias mientras los microorganismos aquietan su movilidad.

CARACTERES DE LOS CULTIVOS:

I.—El crecimiento es ligeramente en realce en malta gelatina agar, después de veinticuatro horas a 35°C.

Es anaerobio facultativo; no licúa la gelatina. Pruebas de fermentación con diferentes azúcares: todas éllas dieron muy pobres resultados.

Se hicieron pruebas de resistencia al calor, del bacilo aislado.

Es termoestable. Tubos conteniendo medio tipo, inoculados con las raíces y pedacitos de corteza pegada a las mismas, fueron sumergidos en agua hirviendo a diferentes temperaturas desde 55 segundos, 1', 2', 3', 4', 5', 10', 15', 20', 30', y 55', respectivamente. De estos tubos se sembró en cajas de Petri, las cuales se incubaron a 35°C., volviendo a nacer las colonias en todos ellos.

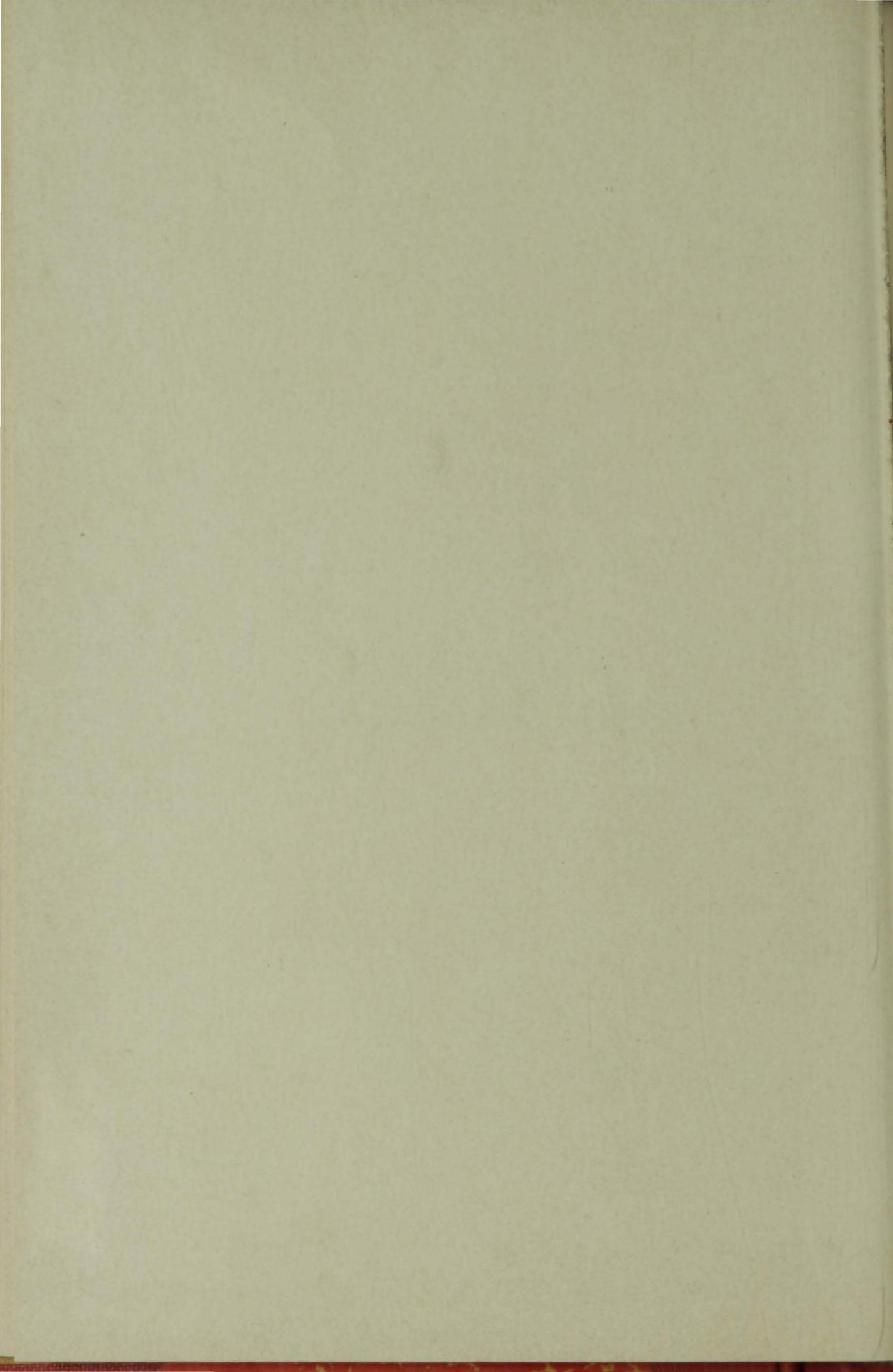
Este bacilo no presentó manifiesta actividad fermentativa como se esperaba. Tampoco pudo acostumbrarse a densidades sucesivamente crecientes. De modo es que siguiendo el procedimiento Arroyo, solamente pudo llegarse al aislamiento y determinaciones en particular del microorganismo.

Por el resultado encontrado se cree que el germen aislado pertenece a los bacilos del suelo, termoestables. Estas bacterias son muy numerosas muchas de ellas con características propias, forman esporas y pueden ser aerobias y anaerobias facultativas. En este grupo se encuentra también el bacilo subtilis, del cual se diferencian los otros por algunas características; ejemplo: la localización de sus esporas en el cuerpo bacteriano, por la manera de germinar de éstas, por ser aerobio, etc.

En el aislamiento llevado a cabo, en las cajas de Petri se obtuvieron colonias del bacilo de las cañas, así como también de subtilis. Según Jørgensen estas clases de bacterias no juegan ningún considerable papel en las industrias de fermentación, debido a que desarrollan pobremente en medios ácidos y azucarados.

Puede sin embargo, en posteriores investigaciones, encontrarse utilidad al bacilo de nuestras cañas.

III
TERMO-BACILO



TERMO - BACILO.

(Nombre derivado de la palabra latina "terminus", correspondiente a límite).

A partir de las investigaciones anteriores respecto a la búsqueda del bacilo tetryl, se observó que muchas de las pruebas de fermentación llevadas a cabo con raíces de caña "mexicana rayada", inoculadas al medio del Dr. Arroyo, no presentaban olor alguno de alcohol butílico o ácido butírico; sin embargo, fermentaban ligeramente. La observación al microscopio del contenido de estos tubos presentaba, entre los otros microorganismos, unos muy pequeños y también móviles. Debido a esta circunstancia, consideré posible la existencia de alguna otra bacteria con habilidad fermentativa hacia los azúcares, y que no fuese la butúrica o butílica.

A la altura de tales investigaciones y por razones que también huelgan, solamente tenía en mi poder un tubo de cultivo del bacilo aislado de las cañas y ya casi desecado, pues tenía catorce meses de edad. Este había sido especialmente aislado por primera vez, calentando los tubos durante 55 minutos, cuando al estudiarse el bacilo de las cañas se hicieron pruebas de resistencia al calor, tal bacilo fué sembrado en un medio de cultivo confeccionado con raíces de malta y piloncillo (ideado por el señor Profesor Alfonso Valbuena, para cultivo de levaduras). A este medio se le ajustó el pH. a 6; habiendo sido esterilizado a 115.5°C., durante 15'.

Debo hacer notar las siguientes circunstancias:

I.—Falta investigar si este nuevo microorganismo es el responsable de la fermentación observada en los tubos que contenían las raíces de caña en el medio tipo y que no presentaron ningún olor correspondiente a alcohol butílico o al ácido butírico cuando se llevó a cabo la búsqueda del bacilo tetryl;

II.—Si este microorganismo es originario del jugo de las raíces de malta con el que se encontraba hecho el medio; y

III.—Si el jugo de las raíces de malta debido al contenido de algunas substancias orgánicas, resulta ser apropiado para el desarrollo del termobacilo, el que siendo anaerobio facultativo, al desarrollarse se sitúa pegado inmediatamente a la superficie del medio de cultivo y sobre de él se encuentran las colonias de los aerobios o anaerobios mayores que el mismo.

Al mencionado tubo, casi completamente desecado y por lo mismo conteniendo formas esporas del bacilo de las cañas, se le adicionó suero fi-

siológico estéril y fué hervido durante 20'. De esta solución se inocularon mediante el asa de platino, tubos que contenían medio sólido (raíz de malta, piloncillo, pH. 6), y a la vez tubos conteniendo el medio líquido denominado del Doctor Arroyo, a un Brix de 6 y un pH. de 6; llevándose a incubar a 35 grados centígrados.

RESULTADOS: En los tubos con medio sólido, colonias abultadas rugosas debido al entrelazamiento de los bacilos; en los tubos sembrados con el medio líquido a un Brix de 6, se encontró también un desarrollo en la superficie de éstos, con todas las características del bacilo subtilis; en el interior del líquido se observaron los bacilos de la caña.

Hayan provenido las formas del subtilis de algunas esporas que acompañaron al bacilo de la caña, o de alguna contaminación del propio medio de cultivo, esto para el caso a que me refiero no fué tomado en cuenta; dejé reposar uno de los tubos de estos cultivos en medio sólido fuera de la incubadora durante un mes, al cabo del cual, se lavó la superficie con suero fisiológico estéril. En estas condiciones, el medio de cultivo resultante y completamente limpio de colonias a la simple vista, fué llevado a incubar a 35 grados centígrados, encontrándose a las veinticuatro horas, pequeñas colonias de color blanco, ligeramente opalescente. La observación al microscopio de éstas, reveló unos pequeños bacilos solos o unidos a los otros en cadenas muy cortas y muy movibles; un frote con tinta china reveló la luminosidad marcada en su periferia de flagelos, éstos son peritriquetos. Este bacilo mide aproximadamente una micra y menos. Es un gran negativo.

De las colonias obtenidas por tal procedimiento, se inocularon tubos conteniendo como medio malta gelatina agar pH.6. Después de incubados a 35 y 40° durante veinticuatro horas y aun antes de este tiempo, se obtuvo un desarrollo abarcando casi toda la superficie incluida, del tubo de cultivo, de color blanco ligeramente opalescente, de consistencia mucosa.

El medio de cultivo fué fragmentado por la producción de gases, en tal forma que hubo unos tubos en donde éste fué arrojado fuera de ellos. (Debo advertir que tales tubos tenían una dimensión de 22 x 175 mm.). La observación al microscopio reveló el mismo microorganismo antes citado.

El bacilo fué sembrado en gelatina pH. 6; no hubo licuefacción de ella a las veinticuatro horas. Los cultivos en gelatina sembrados en piquete, presentan burbujas de gas en el medio mismo. Es anaerobio facultativo.

Presentó su mayor habilidad fermentativa cuando fué sembrado en mosto de malta; con un Brix de 6 a 7, trabajó eficientemente. Además se encontró que cuando el medio tiene un pH. inicial de 4.5, la acción de este bacilo provoca un recorrido hasta llegar a un pH. de 6 cuando la fermentación ha terminado, el mosto de malta queda completamente opaco.

Se supone que al encontrarse este microorganismo en mieles invertidas o no invertidas, toma de ésta los que corresponde a sustancias nutritivas y a azúcares invertidos; no se observó habilidad francamente fermentativa de este microorganismo hacia la sacarosa.

PRUEBAS DE RESISTENCIA AL CALOR

A un tubo de cultivos se le adicionó un poco de suero fisiológico, y después de emulsionarse, el producto se pasó a otro tubo estéril; a partir de esta emulsión se tomó 0.1 de c.c. y fué llevada a cada tubo perteneciente a una serie que contenían también suero fisiológico estéril.

Estos tubos fueron sumergidos en agua hirviendo. Uno de los tubos, durante 1 minuto; otro, durante 2 y así sucesivamente, durante 3, 4, 5, 10 y 15 minutos. Habiendo sido enfriados a la temperatura ambiente, se tomó de cada uno de ellos 0.1 de c.c. el cual se pasó a medios previamente licuados, de malta gelatina agar pH. 6; de aquí se pasó el contenido de éstos a cajas de Petri, llevándose a incubar a 40°C.

RESULTADO: A las veinticuatro horas, solamente las cajas de Petri, sembradas con el cultivo hervido durante uno y dos minutos, presentaron desarrollo; en las otras, no hubo ninguno.

UTILIDAD

Teniendo en cuenta: 1.—La temperatura a la cual trabaja eficientemente el bacilo, teniendo éste un óptimo de 40°C. (Hecho de utilidad, pues en las factorías donde no existe equipo de refrigeración hay sobrecalentamientos de las mieles); 2.—Su facultad fermentativa vigorosa, previos acondicionamientos a densidades sucesivas; y 3.—El hecho curioso de que el límite de su pH es el utilizado para los mostos de fermentación alcohólica, no descendiendo de ese punto al verificar su trabajo, sino que efectúa un recorrido hasta llegar a 6. (Particularidad que puede ser útil a la levadura, en el caso de que durante el proceso fermentativo aumente demasiado la acidez).

Así es que fueron efectuadas pruebas con le fin de obtener mayores rendimientos de alcohol, aunque sobre este particular hay mucho todavía que aclarar; pues el microorganismo, después de dos meses de haber sido aislado, disminuyó su habilidad fermentativa. Fué sembrado nuevamente en el mosto de malta observándose ligerísima fermentación y enturbiamiento del medio.

Posteriormente se experimentará sobre las causas que originaron esta pérdida, conservándose como uno de los antecedentes la probabilidad de que este pequeño bacilo pertenezca a la clase de bacterias del ácido butírico, señaladas en la penúltima obra del libro "Microorganismos y Fermentaciones", de Alfred Jorgensen; refiriéndome en este caso particular, exclusivamente a que la bacteria pierde su habilidad fermentativa, dicho libro asienta que los microorganismos correspondientes a tal grupo, poseen el poder de combinación con el nitrógeno atmosférico, y señala tam-

bién que Winogradsky ha demostrado que éstos son aptos a perder su poder por cultivación artificial.

Lamento que este hecho haya ocurrido a la mitad del camino para llegar a acondicionar el termo-bacilo a la densidad requerida, y generalmente usada en mostos mieles; sin embargo, las últimas pruebas llevadas a cabo cuando este microorganismos ya no demostraba tan fuerte habilidad fermentativa, no produjeron ningún incremento en la producción de alcohol, mas tampoco se observó pérdida de éste en la producción, por la misma cantidad de levadura.

En cambio por lo que respecta a levaduras para destilerías de alcohol, se llegó a hacerlas trabajar a un Brix de 30 a 32, acostubrándolas a densidades sucesivamente crecientes.

RESULTADOS OBTENIDOS EN PRUEBAS DE LABORATORIO.

Se hicieron trabajar las bacterias unidas a la levadura. Primeramente se preparó el mosto para la levadura; se partió de miel final disuelta en agua; se dejó a un Brix de 12; se adicionaron sales nutritivas y fué ajustado al pH. a 4.5. Este mosto se llevó a esterilizar al autoclave a 115.5°C., durante 15'.

De él se colocaron en seis tubos de ensaye (de 25 por 250 mm.), estériles, 20 c.c. en cada uno. Después fueron inoculados con levadura y levadura y bacteria.

Tubo # 1 — 20 c.c. de mosto más 2 c.c. de levadura (10%).

Tubo # 2 — 20 c.c. de mosto más 2 c.c. de levadura. (10%).

Tubo # 3 — 20 c.c. de mosto más 2 c.c. de levadura más 0.2 c.c. de bacteria (10% de levadura y 1% de bacteria).

Tubo # 4 — 20 c.c. de mosto más 2 c.c. de levadura más 0.2 c.c. de bacteria (10% de levadura y 1% de bacteria).

Tubo # 5 — 20 c.c. de mosto más 2 c.c. de levadura más 2 c.c. de bacteria (10% de levadura y 10% de bacteria).

Tubo # 6 — 20 c.c. de mosto más 2 c.c. de levadura más 2 c.c. de bacteria (10% de levadura y 10% de bacteria).

A las 3 horas p. m. fueron llevados a incubar a 33°C., a las 8 horas del día siguiente, la temperatura fué subida de 35 a 40°C.

Todos los tubos fermentaron en un recorrido de tiempo de 19 a 20 horas. Al terminar la fermentación se observó en los tubos números 3 y 4, doble cantidad de levadura sedimentada, en comparación con la que había en los cuatro tubos restantes, los que estaban más o menos iguales. Resultando así un índice para medir la cantidad de bacteria que obra como activante sobre la levadura.

Ahora bien, por pruebas anteriores de fermentación, verificadas en tubos inoculados con el bacilo (a una proporción de 10%), se encontró habilidad fermentativa de éste hacia los azúcares invertidos. Estas pruebas se verificaron:

1.—En el medio Líquido del Dr. Arroyo a un Brix de 6 y un pH. de 4.5, incubadas a 35°C.

2.—En mosto de cerveza Brix 6 pH 4.5 incubadas a 35°C.

3.—En mosto de mieles sin invertir, del utilizado para levaduras, Brix 6, pH. 4.5, incubados a 35°C.

RESULTADOS:

Pruebas (1).—Hay fermentación aunque no completamente vigorosa;

Pruebas (2).—Existe la fermentación más vigorosa;

Pruebas (3).—Hay fermentación más bien escasa.

De estas pruebas y las verificadas con levadura y bacteria números 3 y 4, se deduce la posibilidad de que el bacilo toma de los mostos para levaduras, la parte correspondiente a azúcares invertidos. Se deja a decisión que el resultado obtenido por las pruebas de fermentación de levadura y bacteria números 3 y 4 anteriormente mencionadas, queden incluidas como una prueba más en "los fenómenos de irradiación mitogenética" descubiertos por Alejandro Gurwitsh en 1923.

Considerando estos estudios de gran importancia teórica y práctica, me permito insertar una explicación concisa de ellos.

El autor desarrolla sus teorías sobre "la influencia" y explica el parentesco entre el mecanismo intra celular y el conjunto de organismos multicelulares, ofreciendo las siguientes alternativas:

I.—Las células se influyen unas a otras recíprocamente.

II.—Las células son influenciadas por factores relacionados en alguna manera con el todo.

Según la segunda alternativa, las células en el desarrollo de su propia potencialidad son influenciadas por las propiedades peculiares del medio en el cual se encuentran.

Aplicando estas ideas al problema de división celular, sugiere el autor que la división recaé sobre varios factores intra y extra celular.

El mismo autor ha encontrado la existencia de un factor externo en la cebolla y en el tulipán (*Helianthus*), en las puntas de las raíces en las cuales cesa el fenómeno de mitosis si la base de una radícula es sujeta a anestesia local. Respecto a la influencia recíproca de los núcleos, la referencia es hecha en muchos casos tanto en plantas como en núcleos animales que se encuentran en mitosis en el mismo sitio o en la misma parte. Cuando los territorios mononucleares llegan a ser separados por la formación de membranas celulares, la sincronización o efectividad del fenómeno ya no existe. El autor sostiene que la membrana celular no es únicamente responsable para delimitar la mitosis, y por asumir el cargo de reactivo natural de división celular está al servicio de los estímulos perceptibles en los órganos para impulsar la división.

En el tercer capítulo de su obra, habla de la realización de estos factores. Trata largamente la teoría de Haberlandt, de herir el centro de elaboración que es aparentemente un estimulante a la división celular

de naturaleza química. Sin embargo, los experimentos sobre el desarrollo de actividad mitogenética derivadas de heridas en la cornea de la rana, así como también la distancia a la que se desarrolla el factor estímulo en raicesillas dobladas artificialmente; el autor sugiere que se deben a un fenómeno de naturaleza física que él llama "rayos mitogenéticos". Esta teoría encuentra apoyo en sus experimentos, por los cuales él ha demostrado que la mitosis puede ser inducida a distancia.

Gurwitsh, presenta figuras para demostrar que la actividad mitogenética en una raíz de cebolla (raíz inducida), puede ser estimulada por el lado hacia el cual está dirigida o acercada a la punta de otra raíz de cebolla y a la distancia de dos o tres milímetros.

La existencia de un estímulo localizado es medida por la mayor cantidad de observaciones mitogenéticas en el lado de la raíz inducida, que está expuesta a la acción de la otra raíz, comparándola con el desarrollo celular que se encuentre al otro lado de la misma raíz.

Los llamados rayos mitogenéticos producidos por este estímulo, son interrumpidos por un vidrio. La diferencia que existe entre la interrupción por cuarzo y gelatina, dá la idea de que son ondas cortas de rayos ultravioleta los cuales están entre los límites de 1,900 y 2,000 ängstroms.

Señala el autor que los rayos originan en la base de cada pequeña raíz donde se encuentra un arreglo peculiar histológico, de los tejidos celulares, encontrados por Lidia Gurwitsch. Además, han sido encontradas fuentes de rayos mitogenéticos en bulbos de tulipán (*Helianthus*), cortes frescos transversales de leptomonas, de tubérculo de papa y también en los ranacuajos. Todos estos factores estimulan la mitosis en las raicesillas de la cebolla.

El autor extiende sus ideas sobre los caracteres físicos de una sustancia que estimula la división de las células, para explicar mitosis en estado embrionario y desarrollo de órganos.

En la tercera parte de su obra, Gurwitsh trata de la polaridad eléctrica de las células durante el estado de reposo y durante la mitosis. Los cromosomas y sus genes son discutidos y el autor pone énfasis respecto a su forma específica, su arreglo mutuo y la orientación para servir a un sistema unificado hereditario.

Viene a acreditar esta teoría, las investigaciones llevadas a cabo recientemente en la Estación Experimental Agrícola de Río Piedras, P. R., llevadas al efecto por el señor Doctor Rafael Arroyo y el señor F. Marrero, quienes durante su trabajo de fermentación de ron con cultivos mixtos de bacteria y levadura, se dieron cuenta de fenómenos de difícil explicación, hasta que la continuación de su trabajo les llevó a comprobar que la energía mitogenética era causa específica de los fenómenos previamente observados.

La levadura en cuestión, al ser irradiada por la bacteria acelera notablemente su poder de multiplicación así como su habilidad fermentativa. Hubo casos en que la fermentación se inició con un millón de cé-

lulas por milímetro cúbico del medio y mientras la multiplicación normal de estas células había sido solamente de 15 a 20 veces en 30 horas al no ser irradiadas, tan pronto como se ponía la levadura bajo el influjo de los rayos mitogénéticos, la multiplicación llegaba a la proporción de uno a cien.

En cuanto a la producción de alcohol, los resultados indicaron que en el mismo tiempo que un cultivo no irradiado fabricaba 5 cc. de alcohol, otro cultivo de la misma levadura, pero irradiado por las emanaciones mitogénéticas de las bacterias, fabricaba hasta 20 c.c.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la sustentante trató de hacer pruebas similares para investigar fenómenos de irradiación mitogénética, utilizando para el efecto bacteria y levadura con el fin de obtener mayor cantidad de alcohol.

Se obtuvieron los siguientes resultados en el laboratorio:

Primeras determinaciones hechas.

"A" *Recuento de levaduras* a partir de los tubos # 1 y #3, sembrados, como antes se dijo, para pruebas de fermentación, uno con levadura y otro con levadura y bacteria.

La cuenta de levaduras se llevó a cabo utilizando el método tipo del cultivo en placas (para el recuento total de bacterias en las leches).

RESULTADOS:

A partir del tubo # 1 se hicieron diluciones (1:1,000).

Siembra (a).—Número de colonias 104 — 104,000 levaduras por c.c.

Siembra (b).—Número de colonias 100 — 100,000 levaduras por c.c.

Promedio — 102 levaduras por c.c.

A partir del tubo # 3 se hicieron diluciones (1:1,000).

Siembra (c).—Número de colonias 250 — 250,000 levaduras por cc.

Siembra (d).—Número de colonias 270 — 270,000 levaduras por c.c.

Promedio — 260,000 levaduras por c.c.

Conclusión:—Como se mira, el número de levaduras por c.c. correspondientes al tubo sembrado con levadura y bacteria, fué superior al número encontrado en el cultivo número 1, el que solamente había sido sembrado con levadura.

"B".—Experimentos llevados a cabo para valorar la cantidad de alcohol producida, cuando las levaduras trabajan con la bacteria y cuando están solas.

Utilizándose mosto con un Brix de 12 (debido a que la bacteria se va acondicionando a densidades sucesivamente crecientes). La temperatura inicial fué de 30°C., subiéndola después de 35 a 40°C. Esta última temperatura la considero óptima, debido a experimentos hechos para buscar la mejor fermentación.

Matraz # 1.—500 c.c. de mosto más 25 c.c. de levadura.
Matraz # 2.—500 c.c. de mosto más 25 c.c. de levadura más 5 c.c. de bacteria.

Después de terminada la fermentación, se determinaron el Brix final y la riqueza alcohólica:

Matraz # 1 (con levadura) — Brix final — 8.3 a 36°C.

De este mosto se destilaron 100 c.c., como se acostumbra para determinar riqueza alcohólica, encontrándose como *grado alcohólico*, un valor de 6. a 21.5°C.

Riqueza alcohólica — 5.15%.

Matraz # 2.—(Con levadura y bacteria)

Brix final — 3 a 40°C.

Grado alcohólico — 8.7 a 22°C.

Riqueza alcohólica — 7.63%.

Como puede observarse, el valor encontrado demuestra un aumento en la cantidad de alcohol.

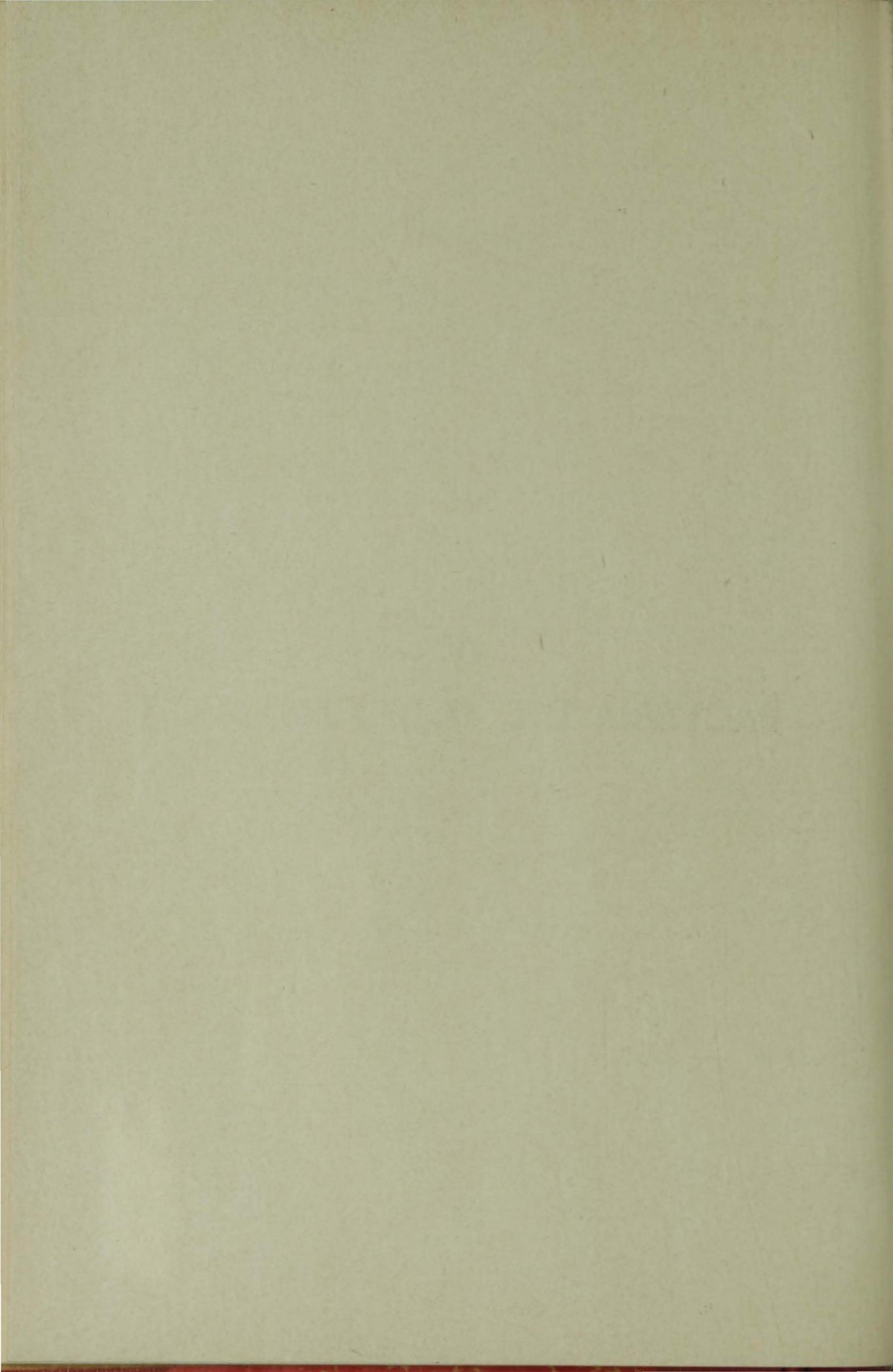
Estas mismas pruebas se llevaron a cabo, con la diferencia de conservar la temperatura constante a 30°C., durante todo el recorrido de la fermentación, encontrándose resultados bajos más o menos iguales, tanto en las fermentaciones llevadas a cabo solamente con levaduras, como en las que se inoculó levadura y bacteria. Esto demuestra que faltó su temperatura a la bacteria.

Estas determinaciones no pudieron comprobarse en medios con un Brix de 20, pues al llegar a esta altura de acondicionamiento, ya la bacteria había perdido su habilidad fermentativa (sólo ligeramente la conservaba); no obstante, aun en estas condiciones fueron sembrados mostos con bacteria y levadura y con levadura únicamente, (a un Brix de 20) y a una temperatura de 30°C., hasta llegar a 40°C. No se observó que las pruebas de levadura y bacteria, frente a las pruebas sembradas con levadura únicamente, aumentaran el rendimiento de alcohol o que éste, a su vez, hubiera disminuído en forma apreciable.

Así pues, por todo lo anteriormente expuesto, bien valdría la pena vigilar, valorar y aclarar todos los pasos de este proceso fermentativo, despejando las incógnitas que puedan ocurrir.

IV

BACTERIA DEL ACIDO BUTIRICO



La fermentación butírica es la menos comprendida en cuanto al mecanismo concerniente a su reacción. Mientras que la producción del ácido butírico por bacterias ha sido reconocida desde el tiempo de Pasteur (Pasteur L. *Compte. Ren. Acad. Sci.*, 52 344, 347 (1860), ésta ha sido llevada a cabo únicamente dentro del proceso de fermentación para producir este ácido como el mayor producto; aunque Baier (Baier E. *Cent. Für Bakt.*, 17-22-84-87, 118-120 (1895), logró en aislamiento seis diferentes grupos de bacterias capaces de inducir una fermentación de azúcares a ácido butírico.

Debido a lo anteriormente dicho, las dificultades de obtención de rendimientos altamente eficientes, son causadas por las reacciones que acompañan al proceso, en las cuales se forman otros productos además del ácido butírico. Ejemplo: una fermentación típica de glucosa por *Bacillus Butyricus* de Fitz, es dada por Buchner y Meisenheimer en (Buchner S. and Meisenheimer, *J. Ber. Dent. Chem. Gesell.*, 41-1410-1419 (1908), como se indica:

100 gramos de glucosa con carbonato de calcio y sales nutritivas, dan lo siguiente:

Acido butírico	26	grms.
„ acético	7.5	„
„ láctico	10	„
„ fórmico	3.4	„
Hidrógeno	1.6	„
Etanol	7.8	„
Butanol	0.7	„

Muchos intentos han sido llevados a cabo para utilizar la habilidad conocida de muchas especies de bacterias y producir cantidades apreciables de ácido butírico; como base para producción industrial de este ácido.

Las primeras patentes datan del año de 1910 en que una fué concedida a J. Effront en un proceso de fermentación de sustancias orgánicas nitrogenadas para obtener amoniaco y ácidos grasos volátiles.

En 1914, una patente inglesa fué concedida a Le Franc, para la manufactura de los ácidos de las series grasas, especialmente ácido butírico utilizando una mezcla de sustancias amiláceas y cultivos de *bacillus amylozime* de Perdrix.

Una interesante patente fué concedida en 1918 a Hibbert (Hibbert H. Solvent and Process for Producing Same. U. S. Patent. 1,283 - 183 (1918)). En estos procesos, los carbohidratos son fermentados para la producción de butiratos y otras sales.

Después, los ácidos van siendo liberados a partir de sus sales; son convertidos a quetonas sometiéndose entonces a una alta temperatura en presencia de un catalizador apropiado.

Las quetonas pueden ser vendidas como tales o reducidas a los correspondientes carbinoles, los cuales pueden ser acetilados o nó, como se desee. Se dice que estos productos son excelentes solventes para derivados de celulosa.

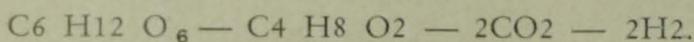
Tan lejos como pueda saberse en lo que se refiere a estos procesos patentados, ninguno de ellos tiene éxito ampliamente aprobado. Porque la identidad del agente de fermentación empleado fué obscura en todos los casos, y la naturaleza de la fermentación fué inadecuadamente sobreentendida.

No debe olvidarse que para el éxito de este o cualquier otro proceso bioquímico, es esencial que las facultades del agente empleado sean ampliamente comprendidas; sus características físicas establecidas y las condiciones óptimas para sus operaciones plenamente sobreentendidas.

Por lo tanto, es bueno considerar el mecanismo de la fermentación ácido butírica en orden para apreciar el carácter de las reacciones que son abarcadas, y la naturaleza de la fermentación ejercida por el organismo o agente de fermentación.

Según el Doctor Owen, la fermentación ácido butírica puede ser descrita, tan sencilla como la que corresponde al ácido láctico; la última como bien se sabe, consiste en la división de la molécula de azúcar en dos partes de idéntica constitución. Pero esta ecuación para el ácido butírico no debe mirarse como un concepto definitivo de lo que realmente pase.

Se escribe la reacción simplemente para formarla como sigue:



Inmediatamente se presentan las dificultades de explicar:

Cómo una molécula con una cadena de seis carbonos puede originar una de 4 carbonos, tal como ácido butírico;

Cuál es el origen del H separado.

Asombra también en esta reacción equitativa la conservación de dos moléculas de CO₂, siendo enteramente demolidas para dar el compuesto C₄. Evidentemente el Doctor Owen se interesa en una síntesis y condensación, las cuales operan simultáneamente.

El producto que sigue, inmediato a el ácido butírico, es el aldehído (aldol), y el ácido B- hidroxibutírico originándose a partir del acetaldehído por la condensación de dos moléculas de esta substancia.

El Doctor cita que puede explicarse la presencia de ambos hidrógenos y CO₂ en la formación de acetaldehído, a través del estado intermedio de ácido pirúvico o metilglioxal.

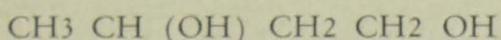
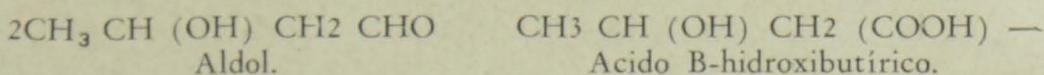
Sea que el aldehído sea espontáneamente transformado a ácido butírico por simple transposición intramolecular, o que la reducción del grupo alcohol secundario y la oxidación del grupo aldehído tomen lugar separadamente originando reacciones especiales, se esperan a este respecto evidencias definitivas.

También existe duda referente a si la producción de ácido butírico por microorganismos presenta una fermentación distinta e independiente, o si esta fermentación es una reacción incompleta, la cual fué evitada por ciertas condiciones a partir del substrato.

Ejemplo: Es bien conocido que la formación de butanol y acetona en la fermentación butílica, está siempre asociada con la formación de ácido butírico en las primeras fases de la fermentación y el rendimiento normal de los productos formados, siempre depende de la reducción del ácido, pasándolo al estado de alcohol después del estado intermediario de la fermentación.

En realidad, de hecho se ha encontrado que los rendimientos de butanol pueden ser apreciablemente incrementados por la adición de ácido butírico al medio fermentado. Además, ha sido demostrado por varios trabajos, que esta reducción puede únicamente ocurrir en un medio ácido y, cuando el substrato es mantenido neutro, los productos formados consisten principalmente en cantidades de ácido más bien, que de alcohol.

Schoen "(Schoen M. and Huid, H. L. The Problem of Fermentation 75 (1928))" sugiere que el aldol puede ser únicamente la fuente de ambos: "butanol y ácido butírico". Esta hipótesis es como sigue:



Alcohol B-hidroxibutílico.

Como resultado de perder una molécula de H, el ácido B-hidroxibutílico, será oxidado en su grupo alcohol secundario y transformado en ácido acético, el cual espontáneamente se descompondrá en acetona y CO₂. Por lo tanto, el hidrógeno liberado actuará en el alcohol B-hidroxibutílico y lo reducirá al grupo alcohol secundario, resultando ésto en la producción de alcohol butílico.

De otra manera el aldol en un medio neutro podría ser transformado directamente a ácido butírico por transposición intra molecular.

Por estas consideraciones de reacción difusa, en la fermentación butírica y hasta donde hoy conocemos, es fácil sobreentender y apreciar las dificultades que surgen para aplicar la fermentación de este ácido al proceso industrial.

Los fracasos han sido originados por las siguientes causas:

1a.—El uso de especies de bacterias las cuales fueron más del tipo butílico que del butírico, las cuales, a lo largo de la reacción en el subs-

trato, fueron mantenidas cuidadosamente en el punto neutro, dando así rendimientos claros pero no uniformes.

2a.—El uso de bacterias agentes de la fermentación que posean regular eficiencia, por lo cual la reacción con mucha facilidad volvería hacia atrás al tipo butílico, al estar en propagación continua.

3a.—Inadecuado conocimiento de la nutrición necesaria a los organismos usados, y de las condiciones para su eficiencia óptima.

NUEVO ORGANISMO

En el transcurso de los años de 1933 y 1934, fué aislado un microorganismo por el señor Dr. Rafael Arroyo, En Puerto Rico. Dicho microorganismo aparece como productor de ácido butírico y con habilidad principalmente para convertir los azúcares contenidos en las mieles finales, en dicho ácido.

Los consecuentes rendimientos de esta bacteria suministran por primera vez la posibilidad económica de producir ácido butírico a partir de mieles finales.

Esta especie fué aislada a partir de las semillas de achiote (*Bixa orellana*) y habiendo sido estudiada en relación con su habilidad fermentativa hacia los medios mieles, los trabajos realizados revelaron las siguientes condiciones esenciales para sus rendimientos máximos:

Una concentración de azúcar 6.5%.

Un Brix 10.6

Un pH. de 6.8 a 7.0

El mosto es preparado a partir de mieles, adicionando 0.135 gramos de carbonato de calcio por gramo de la miel utilizada; y diluyendo con agua hasta el Brix señalado, no se adicionan sustancias nutritivas. El medio es esterilizado a 115.5°C., durante media hora, enfriándose a la temperatura ambiente e inoculando con el cultivo.

El pH del medio podrá ser de 6.8 a 7.2.

La densidad entre 10.5 y 10.8.

La concentración de azúcares totales de 6.4 a 6.8.

La fermentación es completa de 94 a 96 horas, durante las cuales el 96 a 97.7% de los azúcares en el medio son consumidos, obteniéndose un rendimiento de ácido butírico de 47 a 48.5% en los azúcares usados.

El ácido es recobrado a partir del mosto fermentado como sigue:

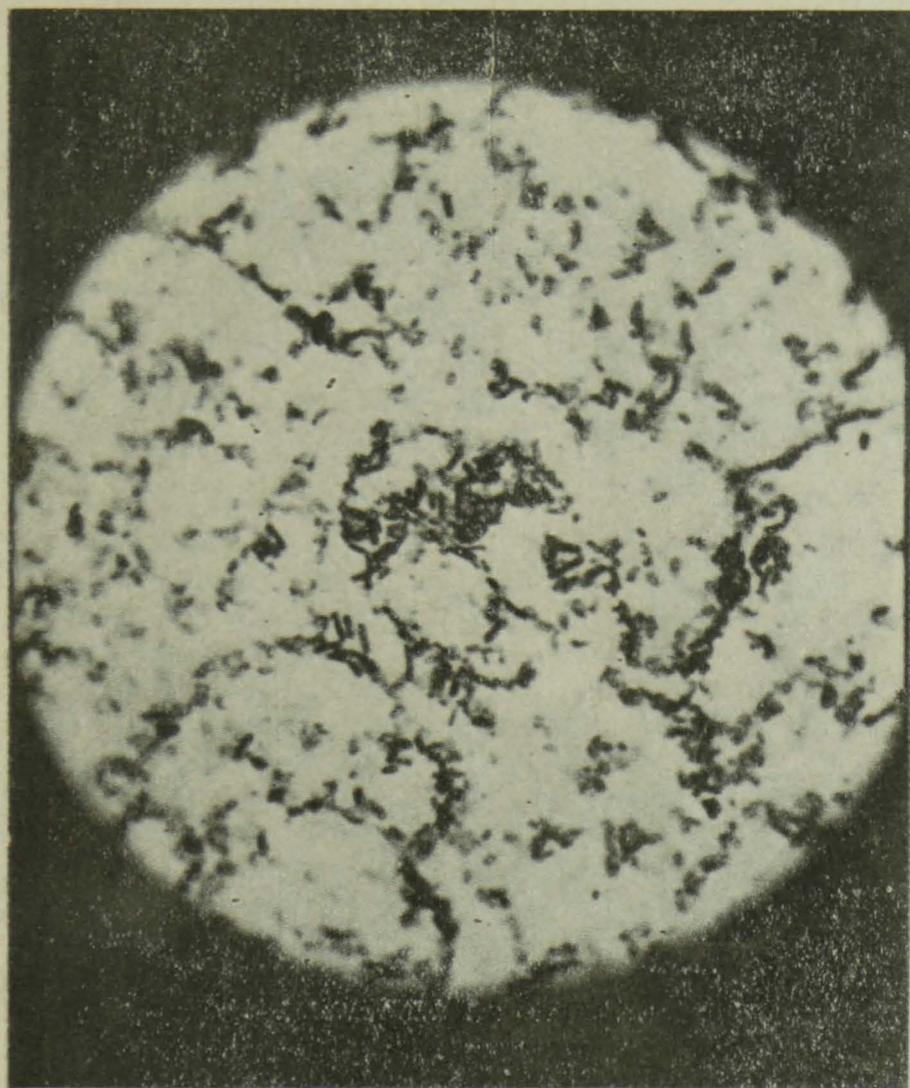
Se prueba la reacción al papel torsasol; si es ácida, se neutraliza con carbonato de calcio o hidróxido de sodio. Se evapora el mosto a una cuarta parte de su volumen original, de preferencia al vacío. Después se adiciona ácido sulfúrico concentrado en suficiente cantidad para liberar el ácido butírico a partir de su sal, este mosto así acidificado se destila hasta que todo el contenido de los ácidos volátiles hayan pasado.

Se obtiene el ácido butírico a partir del destilado acuoso, precipitándolo en forma de sal de bario.

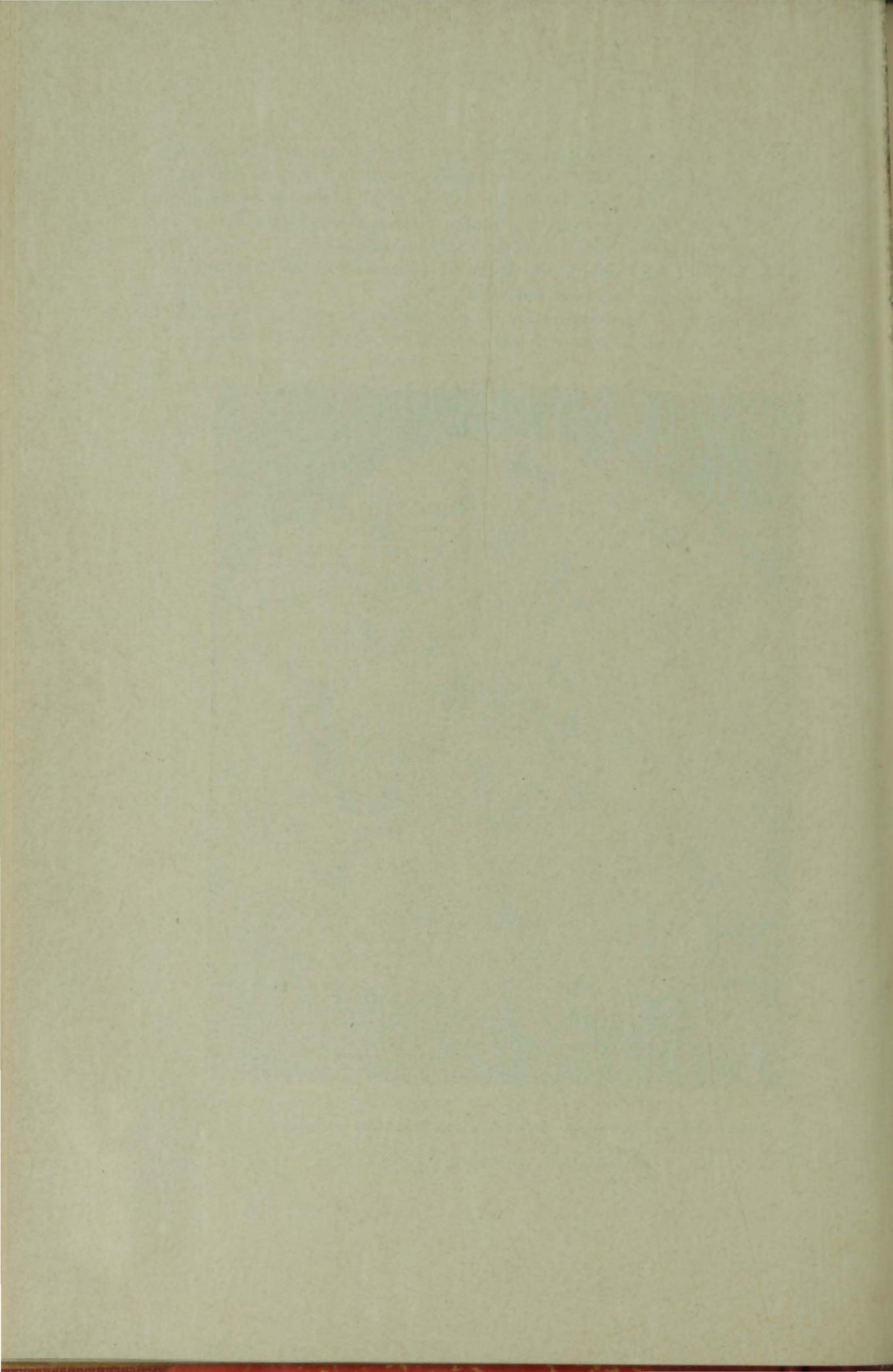
Se hace notar que cuando en estas investigaciones se trabajó en Puerto Rico, fué enviada una muestra de este producto para su análisis, a la Sección de Química del Departamento de Agricultura de Washington, D. C., y ésta fué reportada por dicho Departamento como Butirato de Ba. puro, teniendo un alto grado de pureza el ácido libre.

„En esta forma queda establecida dicha fermentación como una de las más puras en cualquier proceso industrial.

Se acompaña la fotomicrografía de éste bacilo, el cual logré aislar de la misma fuente donde lo encontró por primera vez el Doctor Arroyo.



Bacilo Butírico, pueden observarse las formas vegetativas y espora. "Gram."



"Este microorganismo mide aproximadamente de 2 a 3 micras", "es gram positivo"; "su esporulación es central"; "Es amaerobio facultativo"; "muy móvil, tiene flagelos peritriques", "se presenta solo o en cadenas cortas de dos". "Sembrado en gelatina, la va licuando a partir de la superficie; olor desagradable, gases en el interior".

"Es excepcionalmente vigoroso; se muestra capaz de competir con otros organismos que puedan llevar el mosto a fermentación".

Esto indica que no se necesita un cultivo absolutamente puro para el crecimiento, desarrollo y producción de ácido por el organismo.

Desde el punto de vista comercial, su vigor frente a otros organismos es un factor importante en favor del mismo, pues las dificultades presentadas en la práctica industrial para prevenir contaminaciones, son ya bien conocidas.

Otro punto de gran importancia técnica es que el microorganismo sea anaerobio facultativo, pues es bien sabido que los anaerobios estrictos traen muchas dificultades de naturaleza técnica, además de adaptaciones en el equipo de la factoría, cuando se presenta su explotación comercial.

Uno de los más grandes campos para llevar a cabo la fermentación butírica, es, en la conversión de los azúcares residuales contenidos en los desperdicios de las destilerías de alcohol etílico en dicho ácido. El Doctor Arroyo encontró que este microorganismo es capaz de convertir prácticamente todos los azúcares de los desechos de la destilería en el citado ácido.

UTILIDADES DEL ACIDO BUTIRICO

Estas utilidades son múltiples:

- 1.—En el cutrido de pieles, como un excelente suavizador de éstas.
- 2.—En la manufactura de plásticos y en la industria de lacas.
- 3.—En la manufactura de barnices secos.
- 4.—En la manufactura de ésteres de celulosa.
- 5.—En la manufactura de productos farmacéuticos y drogas.

Muchos experimentos llevados a cabo en Puerto Rico, indican que el ácido butírico puede ser utilizado en lugar del ácido nítrico, en la preparación de alfa-celulosa, a partir de las hojas y bagazo de caña.

El ácido butírico utilizado, fué obtenido por fermentación teniendo la fuerza y pureza necesarias para este fin. Como resultado en este proceso industrial, se encontró una pulpa de excelente contextura física, de buen color blanco y rendimiento muy similar al del laboratorio.

Después de tres corridas, debido a las dificultades inherentes al desarrollo de todo nuevo proceso industrial, se obtuvo con gran satisfacción, 95.33% de alfa-celulosa, cifra que también igualó a las mejores obtenidas en el laboratorio.



TIEMPO EMPLEADO

No obstante mis deseos de haber querido entregar con toda oportunidad los resultados y noticias sobre mis investigaciones, éllo me fué imposible, debido a que hubo necesidad de emplear cuatro años en tales trabajos.

Dos de ellos, para coleccionar datos y estudiar sobre asuntos de fermentaciones debido a la escasez bibliográfica encontrada en un principio respecto a industrias de fermentación; los dos restantes, en investigaciones y trabajos sobre estos mismos problemas, en los laboratorios de Salubridad Pública y de la Junta Técnica Calificadora de Alcoholes, dependiente de la Secretaría de Hacienda y Crédito Público.

Debo hacer hincapié en el hecho de que únicamente los días hábiles, y en las mañanas, pude dedicar mi tiempo a estas investigaciones.

BIBLIOGRAFIA

Industrial Microbiology by Prescott and Dunn. (1940).

Practical Management of Pure Yeast.—A. Jörgensen.

Micro-Organisms and Fermentation.—Alfred Jörgensen.

Memorias de las Conferencias Anuales. (Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba).

Artículos del Doctor William L. Owen. (De las publicaciones "Facts About Sugar").

The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico, Vol. XVIII No. 4, October 1934.

"Art of Producing Butanol and Acetone by Fermentation of Molasses", Rafael Arroyo, Rio Piedras, P. R., Assignor, by mesne assignments, to The Lummus Company, New York, N. L., a corporation of Delaware.

Methods for Determining the Uniformity of Quality of white sugars. Including Analytical Methods for Masecutes and Juices. Compiled by J. A. Ambler, Chemist. Carbohydrate Research Division. (May 1940).

Manual de Fabricantes de Azúcar de Caña y Químicos Azucareros, por Spencer-Meade-Bourbakis.

Manual de Fabricantes de Azúcar de Caña y Químicos Azucareros de "Spencer y Cuadrado".

Wallerstain Laboratories Communicatio