

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

# ENZIMAS O FERMENTOS

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR

**Abelardo Amaya Osorio**

---

SAN SALVADOR, REPUBLICA DE EL SALVADOR, C. A.

ENERO 1955



4906  
758  
-00-00  
1.2.

068573

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO; 10123460

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

INGENIERO ANTONIO PERLA

SECRETARIO

DR. JOSE SALINAS ARIS

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

DR. FELIX LEON SUNCIN

SECRETARIO

DR. JOSE MATEO TEJADA

# UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

## JURDOS QUE PRACTICARON LOS EXAMENES

### PRIMER EXAMEN GENERAL PRIVADO

DR. RAUL MONTOYA PARADA

DR. LUIS ARISTIDES AMAYA

DR. PEDRO ALFREDO REYES

### SEGUNDO EXAMEN GENERAL PRIVADO

DR. CARLOS MATA GAVIDIA

DR. FRANCISCO HERNANDEZ ROQUE

DR. JULIO CESAR MORAN RAMIRES

### EXAMEN PUBLICO

DR. MARIO LEVY VAN SEVEREN

DRA. MERCEDES AMANDA MARTINEZ

DR. PEDRO ALFREDO REYES

# DEDICATORIA

---

DEDICO EL ACTO PUBLICO Y LA PRESENTE TESIS:

CON REVERENCIA A MI PADRE,

PEDRO JUAN AMAYA.

CON MI MAYOR GRATITUD A MI MADRE,

MARIA DOLORES OSORIO.

CON ESPECIAL CARIÑO A MI TIA,

LUISA OSORIO.

A MIS APRECIABLES HERMANOS:

GILBERTO Y ELSA GLORIA AMAYA OSORIO.

CON TODO CARIÑO A LOS DOCTORES:

RAUL MONTOYA PARADA Y

MIGUEL VALLE Y PEÑA.

AL DISTINGUIDO TENIENTE,

RAFAEL ARANA RIVAS.

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

El estudio y aplicación de las Enzimas o Fermentos tiene tanta importancia en las funciones vitales como en las actividades industriales del individuo, en la actualidad, que ello mueve a dedicarse a su conocimiento científico y a su observación concienzuda.

Al preparar este trabajo, para cerrar mis estudios facultativos é iniciarme en el afán profesional químico farmacéutico, escogí aquel importante tema, buscando el laboratorio y la experiencia, la fábrica y el taller, lo he desarrollado, no como hubiera sido mi deseo, por la deficiencia de los medios científicos y las rudimentarias aplicaciones de nuestro medio, y lo presento como una contribución de mis modestas capacidades, al haber progresista de mi pueblo, que cada día conquista mayores triunfos en la ciencia y la cultura.

El Salvador, cuya industrialización avanza sin cesar, que siempre será un país eminentemente agrícola, que supera los métodos de aquella, necesita conocer la riqueza que para su industria y agricultura significan las ENZIMAS O FERMENTOS, a que se refiere este estudio.

Las industrias del café, del pan, de la cerveza, de curtiduría, ensilajes, etc., rubros valiosos de nuestra economía, se benefician directamente imprescindiblemente de las Enzimas o Fermentos, como ingredientes básicos. Y siendo aquellas industrias los medios de vida y de trabajo de todo un pueblo, justo es que sus productos de elaboración sean lo más completos, perfectos y capaces de responder a los menesteres a que se dedican.

He buscado con paciencia cuanto dato importante se refiera a mi estudio. He tropezado con laboratorios y técnicas inadecuadas, pero perseverando, informándome con los entendidos y atreviéndome con juvenil empuje, ofrezco a mis Profesores, compañeros, industriales y ciudadanía en general, este ensayo incompleto pero revestido de interesantes datos, informaciones y resultados prácticos, de provechosa aplicación de las Enzimas o Fermentos.

Ojalá que sirva mi trabajo de información apreciable para todos aquellos Profesionistas, técnicos e industriales, investigadores y elementos progresistas en general, para que apliquen sus conocimientos y acuciosidad a descubrir todo lo que se refiere científicamente y en función industrial a aquellos organismos tan interesantes.

Se verá que la ordenación que he seguido se rige por un método sencillo pero claro. Desde el historial de las Enzimas o Fermentos y su importancia general, trato de resaltar la que tienen en las distintas industrias enumeradas, con el fin de que sea útil y estimulante para la superación y mejor aprovechamiento de nuestras riquezas y materias primas y las actividades Agrícolas é Industriales en El Salvador.

Abelardo Amaya Osorio.

## BOSQUEJO HISTORICO DE LOS FERMENTOS

Cuando los seres vivos pierden su funcionalismo, sufren una alteración profunda su materia orgánica; este fenómeno es conocido desde tiempos remotos, con el nombre específico de putrefacción, se le distingue en el caso de animales y aún vegetales que originan en el curso de dicha alteración por la producción de substancias repugnantes por su olor ó por su aspecto. Es en definitiva el proceso previo a la mineralización de todo lo orgánico, restituyendo al medio lo que de él tomó en el ciclo bio-químico eterno de la materia; que las substancias minerales de la tierra se incorporan al vegetal y se convierten en la propia substancia de éste tomando aquí su origen la vida; y que las plantas sirven luego directa ó indirectamente, para la alimentación animal, son hechos de observación y de experiencia; el animal y el vegetal cuando mueren reintegran a la tierra (desorganizándose y por tanto mineralizándose), lo que de ella tomaron primitivamente.

En estas transformaciones materiales fundamentales, no se percibió agente alguno que las provocase ni que las determinase; se creyeron espontáneas y hubieron de pasar muchos siglos de conocidas para que se averiguasen las causas que lo originaban. Causas y orígenes diversos y en discusión, que fueron siguiendo a las teorías é hipótesis predominante en el campo de la química, en épocas sucesivas.

La primera transformación de esta clase, fué conocida, observada y aplicada, en el zumo de la uva madura, (mosto) que se convirtió en vino; durante su transcurso, tiene lugar el desprendimiento de gases (anhídrido carbónico) en el seno del líquido y el fenómeno tiene apariencia externa de ebullición; de la palabra latina FERVERE (hervir) vino la de "fermentación".

Esta producción de vino conocida desde los tiempos bíblicos, no fué estudiada con criterio científico hasta 1648; año en que Helmont lo hizo.

Un siglo después, el gran químico francés Lavoisier, quiso explicar el fenómeno y sus similares, por la aplicación de la teoría llamada del flogisto. Pero hasta la mitad del siglo pasado no adquirió importancia ni utilidad el estudio de las llamadas fermentaciones; era entonces la época en la cual Pasteur, hizo sus sensacionales descubrimientos de los microorganismos y fundó la "bacteriología", ciencia tan fecunda en provechosas enseñanzas. Este eximio investigador probó de manera irrefutable que todas las sustancias orgánicas, aun las más fácilmente alterables y putrecibles, se mantenían intactas e invariables si se colocaban en un ambiente desprovisto de microbios, en tanto que la simple presencia de éstos determinaba la transformación rápida de aquellas substancias que aparentemente era considerada como espontánea.

La fermentación tipo, que antes hemos mencionado, era un ciclo vital de un microorganismo (el *Saccharomyces Serviciae*, un hongo microscópico) que se alimentaba del azúcar del mosto y que excretaba alcohol y ácido carbónico.

Bien pronto fué controvertida esta explicación por el gran químico alemán Liebig, el cual defendía que la fermentación no era más que un desdoblamiento molecular de la sustancia fermentecible con el concurso del oxígeno del aire. La polémica entre Pasteur y Liebig, respectivos defensores de las teorías vitalista y mecánica de las fermentaciones, constituyen una de las páginas más brillantes e instructivas de la historia de la ciencia. La fermentación propiamente dicha es la obra química de la vida sin aire, afirmaba Pasteur; el movimiento vital de los fermentos es un fenómeno mecánico, aseveraba Liebig; y es un caso de atavismo científico pretender explicar fenómenos químicos por acciones vitales cuando la ciencia aspira a explicar la vida misma por transformaciones químicas, afirmaba también Liebig.

Aunque los microbios son seres unicelulares, poseen una gran -- complejidad física y química; los investigadores pensaron que la acción fermentativa debiera vincularse a alguna parte solamente de su organismo y descubrieron unas sustancias, segregadas por ellos, que eran los determinantes de las fermentaciones; se llama entonces "fermentos solubles" para diferenciarlos de los "fermentos figurados" o microbios.

En los últimos años de Pasteur, todavía defendió éste, con tesón, que las fermentaciones producidas por los primeros debieran denominarse "falsas" quedando como "verdaderas" las producidas por microorganismos. Berthelot, el maestro de la Química Moderna, logró aislar a fines del siglo pasado, el primer fermento soluble, la invertina capaz de desdoblar la sacarosa por hidrolisis, en una mezcla equimolecular de glucosa y fructuosa; comenzaron entonces a denominarse éstos fermentos solubles con el nombre genérico de "diastásas" y a la invertina se le llamó invertase, nombre que después cambió por el de sacarasa, en atención a las sustancias sobre las cuales actúan.

## GENERALIDADES DE LAS ENZIMAS O FERMENTOS

Hay ciertas reacciones químicas que se desarrollan de una manera sumamente rápida, que tienen lugar en un lapso brevísimo. Ejemplo de ello tenemos en la combinación del hidrógeno con el oxígeno, cuyo resultado es una explosión violenta al formar el agua. En segundo lugar, se conoce un gran número de reacciones cuyo desarrollo en el tiempo es demasiado lento, pudiéndose medir con facilidad la velocidad de la reacción y por último, tenemos que existen reacciones químicas tan lentas que sólo después de haber transcurrido un lapso extraordinariamente grande pueden percibirse los productos de la reacción.

Como medida tienen estos procesos, por lo tanto, la velocidad de la reacción.

Se define esta rapidez de la reacción por la cantidad de moléculas-gramo de la sustancia reaccionante transformada en la unidad de tiempo. El peróxido de hidrógeno por ejemplo se descompone de manera extraordinariamente despacio. Pero si a esta solución se le agrega una pequeña cantidad de peróxido de manganeso o de plata coloidal, se produce un desprendimiento tumultuoso de oxígeno. Por la presencia del compuesto metálico se aumenta la velocidad de la reacción de descomposición del peróxido.

A todas estas sustancias, que aceleran la rapidez de las reacciones se les denomina de una manera general catalizadores.

Lo característico de una de estas reacciones aceleradas catalíticamente es que, teóricamente, con una cantidad muy pequeña del catalizador pueden ser transformadas cantidades ilimitadas: este es un postulado que en la práctica apenas se realizaría. Se desconoce el porqué ciertas sustancias pueden actuar catalíticamente. Sobre esto se han desarrollado ideas completamente teóricas sobre las cuales podrá informarse en los Manuales de Química Física.

Por la actividad esencial de las células, se forman sustancias que actúan catalíticamente de modo igual en ciertas reacciones; o sea, que pueden acelerar la velocidad de las mismas de acuerdo con esto; llamamos fermentos a aquellos catalizadores de naturaleza orgánica, con capacidad específica de reacción, que están formados por células vivas, pero que para obrar no necesitan la presencia de estas células.

El concepto de "fermentación" es antiquísimo. Se aplicó primitivamente para aquellas fermentaciones en que había desprendimiento de gas.

En contraposición a Liebig, Pasteur, estableció que ciertos procesos fermentativos (fermentaciones), sólo se desarrollaban en el interior de las células y entonces se estableció la diferencia entre "fermentos formes" ó enzimas y "fermentos figurados".

El mérito le correspondió a E. Buchner, en 1897 de explicar esta diferencia. Si se tritura la levadura con tierra de diatomea y la sometemos a una presión de 300 atmósferas, produciríase un desgarramiento de la pared celular y obtendríase un jugo de expresión, privado de células capaz de producir la fermentación de una solución de azúcar, de el mismo modo que lo producen las células de la levadura. Con esto se suprimió la diferencia entre enzimas y fermentos. Se trataba entonces de conceptos iguales.

Las enzimas o fermentos son catalizadores orgánicos que pueden dar lugar a la aparición de las más variadas reacciones químicas. De aquí que, se conocen fermentos que dividen las grasas, oxidantes, albuminas y muchas otras. Los fermentos se designan con la terminación "asa", indicando con un prefijo sobre que reacciones o sustancias se verifica su acción. Así, los fermentos que dividen las proteínas se denominan en general, proteasas; las que dividen los hidratos de carbono, carbohidrasas; los oxidantes, oxidasas y así sucesivamente.

Algunas enzimas, además, de estas denominaciones, poseen nombres propios, como esteapsina, tripsina, etc. Esta nomenclatura viene de una época en que no se vislumbraba todavía una visión unitaria del problema. La mayoría de las reacciones que transcurren fermentativamente y que hoy día se conocen como tales, son reacciones de desdoblamiento. La sustancia que es alterada por la acción del fermento se designa generalmente, como sustrato.

Una especificidad más o menos marcada poseen los fermentos; así, por ejemplo, la proteasa que se designa también con el nombre de pepsina es relativamente inespecífica porque puede desdoblar la mayoría de los albuminoides, mientras que la aminoacidosa (fermento que desdobra los aminoácidos), que se conoce con el nombre de arginasa, actúa específicamente, puesto que sólo descompone a la argina y no puede atacar otros compuestos idénticos. De aquí que hay que distinguir, aquéllas enzimas que atacan los grupos enteros de sustancias iguales -fermentos específicos de grupos- y los que atacan específicamente de terminados sustratos. Puede ser tan marcada esta especificidad en muchos casos, que en compuestos ópticamente activos sólo se descompone uno de los isómeros ópticos; ejemplo: La arginasa sólo descompone la arginina existente en la Naturaleza.

Imaginemos la acción de una enzima, para comprender mejor estos hechos de la manera siguiente:

La enzima y el sustrato tienen una determinada estructura y pueden unirse recíprocamente. Al producirse esta unión, enzima y sustrato, la estructura se relaja más, se produce su descomposición, entonces la enzima se separa de los productos resultantes de aquélla y puede unirse a una nueva molécula de sustrato, del grado de afinidad entre la enzima y el sustrato y cuanto mayor sea la concentración de la enzima, tanto mayores son las posibilidades de unión del sustrato.

En el caso de la arginasa, por ejemplo, sobre ésta actúa una gran concentración de enzima sobre la arginina, creando las mejores

condiciones para que también se produzca una combinación con el anti pod óptico y para que por ello tenga lugar un desdoblamiento.

En otros casos también podrán ser decisivas estas condiciones - en lo referente a la actividad óptica de la enzima, por ejemplo, al tratar de la descomposición oxidativa de los aminoácidos hemos de señalar que algunos isómeros ópticos artificiales de los aminoácidos - pueden ser desintegrados de las enzimas (desaminados), mientras que no lo son los naturales.

Son muy sensibles a la temperatura todos los fermentos, la mayoría son inactivos a 60° y este fenómeno es irreversible, la temperatura a la que se presenta la inactivación, está en relación con la temperatura de coagulación de las proteínas.

Varios fermentos pueden ser sometidos, sin que por ello pierdan su actividad, a muy bajas temperaturas; existiendo sin embargo excepciones. Por ejemplo, hay enzimas que se destruyen por el enfriamiento del aire líquido. Las enzimas siguen la regla de la temperatura y velocidad de reacción, dentro de ciertos límites, es decir por cada 10° que aumente la temperatura, aproximadamente aumenta la velocidad de la reacción. En general puede decirse que cada fermento posee una temperatura óptima, que para muchos está situada aproximadamente a unos 40°, aunque existen otros cuya acción óptima se realiza a temperaturas marcadamente más altas.

Y para el estudio de las acciones de los fermentos han adquirido una gran importancia los conocimientos acerca de la concentración de hidrogeniones. No exageramos cuando decimos que sólo después del conocimiento de estos conceptos, ha sido posible un conocimiento exacto de la química de los fermentos. La concentración actual de hidrogeniones, el número de hidrógeno ó el  $pH$  influyen en la acción de los fermentos de modo decisivo. Por ejemplo, la pepsina del estómago sólo actúa en medio ácido, mientras que la tripsina sólo desdobra la albúmina en medio alcalino.

Se ha conseguido explicar por medio de los métodos de la química física, ese aspecto de la reacción de los fermentos y así se han podido interpretar hechos fisiológicos de mucha importancia.

Si logramos preparar de este modo muchas soluciones de  $pH$  creciente y vemos la acción que sobre el substrato desarrolla en ellas una misma cantidad de fermento, notaremos que ésta acción tiene un marcado máximo de una de las soluciones, si las demás condiciones permanecen constantes. Mejor lo podemos decir: la acción de un fermento, si las demás condiciones permanecen constantes es óptima en una determinada concentración en hidrogeniones. Este punto se denomina - óptimo de hidrogeniones del fermento.

El punto óptimo puede estar marcado con mayor o menor precisión.

En la tabla que a continuación se detalla encontramos algunas investigaciones de las zonas de acción de la mayoría de los fermentos, reproduciendo algunos de los valores obtenidos del  $pH$ .

FERMENTO	pH óptimo de acción
Pepsina.....	1,5-1,6
Tripsina.....	7,8-8,7
Erepsina.....	7,8
Ureasa.....	7,1
Arginasa.....	9,0-9,5
Sacarasa.....	4,3
Catalasa.....	7,1

El número de hidrógeno óptimo tiene un valor determinado, pero a veces sólo es constante bajo determinadas condiciones; se ha podido demostrar que los cuerpos que acompañan al fermento con los cuales está más o menos asociado, influyen sobre la concentración de hidrogeniones a que se verifica la acción óptima. Por ejemplo, en el estómago existe un fermento que desdobra las grasas, una alipasa que actúa óptimamente a un pH 4-5; y por otra parte se encuentra en el páncreas una alipasa cuyo pH óptimo está en 8.

Si se somete a la alipasa gástrica a determinados procedimientos de purificación, se altera su acción óptimo, obteniéndose al final una solución de fermento que en su acción es igual a la alipasa pancreática. Probando con esto que al acompañar al fermento cuerpos separados al purificarle, que se denominan coadsorbentes, influyen - por tanto en la zona de acción, en lo que se refiere a la concentración de hidrogeniones.

En las células vivientes se realiza la formación de los fermentos. En la antigüedad se suponía que los fermentos aparecían en forma inactiva, "proenzima" o "cimógeno" transformándose luego en la forma activa. Esta creencia perdió por algún tiempo su crédito, pero recientemente y por las investigaciones de Northrop y de su escuela, se ha comprobado la existencia efectiva de las proenzimas. Hoy en día se conocen el pepsinógeno, el tripsinógeno, el quimotripsinógeno, -- los cuales bajo determinadas condiciones se transforman en las enzimas correspondientes.

Si transcurre el proceso de tal manera que el sustrato y el catalizador estén disueltos, se habla de catálisis en sistema homogénea. Si por el contrario el catalizador no está disuelto, se le da el nombre de catálisis en sistema heterogéneo. Como los fermentos forman siempre sistemas coloidales y nunca sistemas dispersos moleculares, la ley de la catálisis heterogénea regirá en la acción de los fermentos.

Es una verdad clara que la activación de los fermentos hace un papel de suma importancia en el organismo. La enzima que desdobra el almidón, la amilasa, es activa por los iones de cloro; una solución de amilasa exenta de sales es inactiva, pero si no le añaden iones de cloro recupera su actividad.

Existen activaciones completamente específicas en el organismo,

por ejemplo, la tripsina del páncreas sólo desdobra los albúminos sencillos, como las protaminas pero si se le agrega el producto de la secreción de la mucosa intestinal, la solución de fermento activada de esta manera puede dividir casi todas las proteínas. A esta sustancia formada en la mucosa intestinal, que es el activador, se la denomina quinasa y en este caso especial, enteroquinasa. Puesto que la tripsina en sí, aunque de una manera débil es capaz de actuar, hablar de un tripinógeno es erróneo; puesto que se transformaría en tripsina por la acción de la quinasa. Lo que ocurre es que existe desde el principio una tripsina que se une a la quinasa para formar el sistema tripsinaquinasa. Se ha podido demostrar, a pesar de esto que una cantidad determinada de quinasa sólo puede activar otra equivalente de fermento.

Esta activación se realiza siempre debido a las leyes estequiométricas. Es erróneo hablar de ácido clorhidropéptico como a veces se hace, porque actúa lo mismo el ácido sulfúrico como el clorhídrico. Esto no quiere decir que se produzca una unión entre la pepsina y el ácido clorhídrico, lo que pasa es que los ácidos dan la misma concentración de hidrogeniones actuales apropiada.

Radica en las plantas una proteasa llamada pepsina, que se activa lo mismo que la tripsina cuando en su solución existe ácido cianhídrico.

Las activaciones é inhibiciones de las acciones enzimáticas -- pueden ser producidas con gran intensidad, por los llamados "formadores" de complejo. De manera idéntica actúan el ácido sulfhídrico la cisteína, la glutatión y otras. La cisteína puede actuar como activadora é inhibidora según el pH en el que la reacción se verifique. Según Bersin los activadores y los inhibidores de las acciones enzimáticas pueden ser designados como efectores. Es conveniente esta de nominación, puesto que una misma sustancia puede actuar según el caso, activando é inhibiendo: ejemplo, la cisteína. Si se le añade jugo de levadura hervido y exento de células por filtración, el complejo de fermentos de la fermentación alcohólica que existe en el jugo de expresión de la levadura obtenida por Buchner, puede ser activado. Existe por lo tanto en el producto de cocción de la levadura, una -- sustancia termo resistente capaz de activar la fermentación alcohólica; a esta sustancia se le llama enzimas y se habla de cofermentos.

Según Willstatter, una enzima, para ser efectiva, ha de constar de dos partes:

- A) - El llamado grupo de acción.
- B) - Un portador coloidal.

La unión entre el grupo de acción y el portador se denomina Simplejo.

El grupo de acción y el portador se han podido desunir por el procedimiento de la electrodiálisis y de la diálisis regenerando luego la acción enzimática por nueva unión de los mismos.

**DEFINICION:** Las enzimas o fermentos son catalizadores específicos de naturaleza coloidal, producidos por los seres vivos, pero cuya actividad es independiente de la vida misma.

**SUBSTRATO:** Las sustancias sobre las cuáles actúan las enzimas se llaman substratos.

### NOMENCLATURA Y CLASIFICACION

**NOMENCLATURA:** Para comprender mejor estos conocimientos se hace de - imprescindible necesidad una nomenclatura de los fermentos ó enzimas que nos permita expresar en lengua castiza el concepto que de ellos tenemos, excluyendo el empleo de términos extranjeros que nos inducen a confusión. Las actuales son las siguientes:

**FERMENTO:** Cuerpo orgánico que puesto en contacto con otro lo hace fermentar.

**FERMENTAR:** Transformarse ó descomponer un cuerpo orgánico por - la acción de otro que puesto en contacto con él, aparece al final del proceso químico sin haberse modificado.

**DIASTASA:** (De diastasio, separación). Fermento contenido en la fécula. Por extensión denomínase hoy diastasas a todos los fermentos naturales no organizados.

Sin embargo tienen los siguientes defectos:

1o) - Las definiciones actuales son erróneas. Afirmar que fermento es un cuerpo orgánico obliga a excluir a los fermentos metálicos (V.G. electrargol), que son inorgánicos, y a los microorganismos (levadura de cerveza) que son seres vivos ó en estado de vida latente.

Afirmar que fermentar es transformarse ó descomponerse, no es verdad porque algunas sustancias al fermentar se recomponen y sintetizan en vez de sufrir descomposición; el vocablo transformar, por - si solo, es suficiente y abarca todo el fenómeno.

Afirmar que diastasas son todos los fermentos naturales no organizados, hace pensar que son los inorgánicos porque natural y no organizado no puede ser otra cosa. Quiere decir natural y no ser vivo ó figurado. O sea soluble ó amorfo.

Por lo cual har sido propuesta la siguiente nomenclatura:

**FERMENTO:** Cuerpo que actúa en pequeña cantidad, como catalizador, sobre ciertas sustancias orgánicas acelerando su transformación química. Por lo general su acción es específica y reversible.

- FERMENTO AMORFO: 1a) Dícese en oposición al figurado, del fermento - que no es microorganismo; 2a. fermento soluble.
- FERMENTO FIGURADO: Microorganismo que actúa como fermento.
- FERMENTO METALICO: Metal en estado de disolución coloidal, que actúa como fermento.
- FERMENTO SOLUBLE: Cuerpo orgánico de procedencia vegetal ó animal, amorfo y soluble en agua, que actúa como fermento.
- FERMENTACION: Transformación química de un cuerpo orgánico -- que se acelera por la acción de pequeña canti--dad de otro, llamado fermento, el cual se pone en contacto con él y aparentemente no se modifica.
- ENZIMA: Fermento soluble.
- CIMASA: Dícese preferentemente de los que determinan -- fermentaciones alcohólicas.
- DIASTASAS: Dícese preferentemente del que está contenido - en la cebada germinada y cuya acción es sacari--ficar las féculas.
- CIMOGENO: Sustancia precursora ó generadora del fermento.
- COFERMENTO: Sustancia que coadyuva y contribuye a la acción del fermento.
- ANTIFERMENTO: Sustancia que dificulta ó impide la acción del fermento.

CLASIFICACION.

Está basada principalmente en la acción que desarrollan y la -- más admitida es la que sigue, donde se mencionan como ejemplos algunas de las enzimas de cada grupo.

HIDROLASAS: Esterasas, Carbohidrasas, Proteasas y Amidadas.

Esterasas

ENZIMAS	SUBSTRATOS
Lipasa	Esteres orgánicos
Colinesterasa	Acetilcolina
Clorofilasa	Clorofila
Fosfatasa	Esteres fosfóricos
Nucleotidasas	Esteres fosfóricos
Sulfatasas	Esteres sulfúricos

Carbohidrasas

Amilasa	Almidón, glucógeno
Fosforilasa	Glucógeno
Inulinasa	Inulina
Lactasa	Lactosa y $\beta$ Galactósidos
Sacarasa o	
Invertasa	Sacarosa
Maltasa	Maltosa
$\alpha$ Glucosidasa	$\alpha$ Glucósidos
$\beta$ Glucosidasa	$\beta$ Glucosidos.

Proteasas

ENZIMAS	SUBSTRATOS
Tripsina	Proteínas y peptidos
Pepsina	Proteínas
Catepsina	Proteínas
Papaína	Proteínas y peptidos
Lab ó cuajo	Fosfoprotáinas
Protaminasa	Protamina
Aminopolipeptidasa	Peptidos con grupo amino-libre
Carboxilopolipeptidasa	Péptidos con grupo carboxi lo libre
Dipeptidasa	Depéptidos
Prolimpéptidasa	Dipeptidos con prolina

Amidasa

ENZIMAS	SUBSTRATOS
Ureasa	Urea

Aspariginasa	Asparagina
Purinaamino	Purinas
Arginasa	Arginina

Enzimas que actúan en los procesos de óxido reducción.

Catalasa	Agua oxigenada
Peróxidasa	Agua oxigenada
Cito cromo oxidasa	Citocromo
Tiróxinasa	Tirosina
Dihidrogenasas o Dehidrasa	
Dehidrasa succínica	Acido succínico
Dehidrasa fórmica	Acido fórmico
Dehidrasa xántica	Xantina, hiposantina
Dehidrasa úrica o urica-sa	Acido úrico
Dehidrasa láctica	Acido láctico

Clastasas ó enzimas que rompen la unión -c-c-

Carboxilasa	* Aceto-ácidos
Zimohexasas	fructosa 1:6 difosfato

Tipos enzimáticos variables fijadores de agua sin electrólisis

Fumarasa	Acido fumárico
Glixolasa	Metilglioxal

Eliminan amoníaco

Aspartasa	Acido aspártico
-----------	-----------------

En la anterior clasificación se indica primero el gran grupo de enzimas que actúan hidrolizando, es decir, rompiendo uniones atómicas o valencias con fijación de agua. En ellas encontramos un sub-grupo que actúa sobre las diversas funciones ester de los ácidos orgánicos ó inorgánicos, son las estearasas. Otro sub-grupo hidroliza con facilidad las uniones semiacetálicas que forman los grupos aldehídicos o cetónicos de los hidratos de carbono: son las carbohidrasas. Y finalmente, un tercer subgrupo hidroliza los distintos tipos de uniones peptídicas, -CO-NH- : son las proteasas.

Luego viene después un grupo de enzimas más heterogéneo, que tienen de común la cualidad de actuar en los procesos de óxido-reducción. Entre ellos distinguimos: la catalasa y la peróxidasa que descomponen el agua oxigenada; la citocromo-oxidasa, capaz de activar el oxígeno (que algunos consideran compleja), y la tirosinasa, que

actúa sobre la tirosina oxidándola en presencia de oxígeno.

Después viene una serie de enzimas denominadas dehidrasas o deshidrogenasas, que activan el hidrógeno del sustrato en tal forma, que permiten su fácil oxidación cuando hay un agente oxidante presente. En las viejas nomenclaturas estas dehidrogenasas se denominaban oxidasas, pues se creía que las oxidaciones que se producían tenían origen en la activación del oxígeno.

Con el nombre de clastasas se han denominado aquellas enzimas - que rompen las uniones entre átomos de carbono, ruptura que por otra parte no es del tipo hidrolítico. Una enzima pura de éste tipo es la carboxilasa, que descompone los ácidos cetónicos en anhídrido carbónico y al correspondiente aldehído. La otra clastasa, la simohexasa, descompone la molécula de fructosa en dos de triosafofato con ruptura de una unión entre átomos de carbono.

Y por último nos encontramos con enzimas muy difíciles de clasificar y por eso se han colocado en un grupo aparte. Tal es la fumarasa que fija agua sobre el ácido fumárico y la gliolaxasa que la fija sobre el metil glioxal; igualmente se colocan en este grupo la asparatasa que elimina amoníaco del ácido aspártico.

## PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

### CONDICIONES FISICAS DE LA ACCION ENZIMATICA, REACCION DEL MEDIO.

Si se hace actuar una misma cantidad de enzima, sobre una misma cantidad de substancia, variando el  $pH$  del medio donde la reacción - se efectúa, se observará que existe una región o punto de actividad óptima, que le corresponde a determinado  $pH$ , el cual se denomina  $pH$  óptimo de actividad de la enzima.

Ciertas enzimas poseen un  $pH$  óptimo perfectamente determinado y limitado, mientras que otras tienen un  $pH$  óptimo que es un intervalo más o menos grande. El  $pH$  no es fijo y a veces varía con la pureza - de las enzimas y el tipo de substancia sobre la cual actúa.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA: La temperatura influye sobre la actividad enzimática en forma diversa. Muchas enzimas, especialmente las - enzimas hidrolizantes a  $0^{\circ}$  ó a una temperatura menor, no revelan actividad, sin estar por ello destruidas, pues basta elevar la temperatura, para que su acción comience. Otras como la catalasa actúan a una baja temperatura.

Sin embargo, la actividad de toda enzima es mayor a medida que aumenta la temperatura y en general entre 1.5 y 2 veces por cada  $10^{\circ}$  de temperatura de aumento.

Este aumento de actividad con la elevación de temperatura tiene un límite, pues llega un momento en que por la acción del calor la - enzima se destruye y su mayor actividad provoca su destrucción, a veces lentamente y otras casi instantáneamente.

INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE ENZIMA Y SUBSTRATO. Para cantidades fijas de sustrato si se aumenta la cantidad de enzima, la transformación se realiza en forma más rápida y por lo tanto en un tiempo menor.

En la siguiente tabla se muestra la influencia de la cantidad de enzima presente

Concentración relativa de sacarasa	0.25	0.50	1.00	2.00
Tiempo en minutos	120	60	30	15

Como se ve en el ejemplo anterior, están indicados los tiempos que tardó en minutos, la sacarasa en diversas contracciones, para hidrolizar el 75% de una solución de sacarosa de 4.55 gramos por ciento de concentración. Puede observarse que a medida que aumenta la sacarasa disminuye el tiempo empleado en forma proporcional.

Si la cantidad de sustrato aumenta y permanece fija la cantidad de enzima, la velocidad de descomposición del sustrato (velocidad de ~~reacción~~) aumenta por lo menos un cierto límite.

MEDIO DE ACCION ENZIMATICA. La mayor parte de las enzimas aumentan en un medio acuoso, aunque hay algunas excepciones.

INHIBICION Y DESTRUCCION DE LAS ENZIMAS. Si bien las soluciones acuosas de las enzimas suelen ser estables un tiempo relativamente largo cuando se conservan a temperatura baja (menor de 0°), casi todas las enzimas se destruyen con rapidez a temperaturas elevadas aún menor de 100°. Habiendo siempre excepciones. Una miltaria que es producida por un hongo (*aspergillus orizae*) parece resistir la temperatura de 100° y lo mismo ocurre con otras enzimas de origen vegetal. En algunos casos el calentamiento produce una inactivación, reversible al disminuir la temperatura.

CONDICIONES QUIMICAS DE LA ACCION ENZIMATICA. Las observaciones realizadas últimamente han aclarado la naturaleza química de algunos grupos de enzimas. En los casos en que éstas han podido obtenerse como especies químicas puras, se han encontrado:

1o) Enzimas que tienen una estructura exclusivamente proteica. Se trata, sobre todo, de hidrolasas pertenecientes al grupo de las proteasas, pepsina, tripsina y carboxipolipeptidasa y otras; y de la ureasa. Están formadas exclusivamente por la reunión de amino-ácidos y no se ha encontrado en ellas ningún grupo funcional de naturaleza especial que pueda especificar su acción. Esta debe atribuirse únicamente a la disposición estructural de los amino-ácidos dentro de la molécula proteica de la enzima.

2o) Enzimas formadas por una estructura proteica y un grupo no proteico de naturaleza variable. Se trata sobre todo de enzimas que intervienen en los procesos de óxido-reducción.

El grupo no proteico, al que algunos le denominan, por similitud con el caso de las proteínas conjugadas, grupo prostético, se encuentra en algunas enzimas unidos en forma muy estable con la proteína (ejemplo en la catalasa y en el citocromo) y en otras formas fácilmente dissociables (ejemplo, en las enzimas del tipo de las coenzimas). En este último caso existe en la solución de enzimas un estado de equilibrio entre los dos componentes: el grupo prostético puede separarse del resto proteico por diálisis, pues atraviesa fácilmente las membranas semipermeables, quedando retenida la fracción proteica. A su vez, la fracción proteica no tiene ninguna actividad enzimática propia, pero la adquiere cuando se une al grupo proteico adecuado.

Las proteínas, algunas de las cuales se han podido cristalizar, son las que determinan el sentido de la reacción, que varía para cada proteína aunque posean el mismo grupo prostético.

Los grupos prostéticos enzimáticos principales son:

- a) El dinucleótido isoalloxazina y adenina (adenil-flavina), -- formado por la unión de ácido adenílico con fosfo-ribo-flavina y que constituye el grupo prostético de varias enzimas -- que actúan en los procesos de óxido-reducción.
- b) El dinucleótido adenil-piridina, que constituye la base de las enzimas que intervienen en el proceso de óxido-reducción.
- c) Las sustancias de naturaleza porfirínica, del tipo del hem y de la hemina que forman grupos prostéticos, unidos en forma muy estable a las proteínas, en las enzimas como la catalasa y los citocromos.
- d) La tiamina (aneurina) o vitamina B<sub>1</sub> fosforilada, que constituye el grupo prostético de la enzima carboxilasa, que descompone el ácido pirúvico con liberación de anhídrido carbónico.
- e) Metales simples, como el cobre que forman el grupo prostético de una oxidasa vegetal, o el zinc que forma el grupo prostético de la anhidrasa carbónica.

DISTRIBUCION: Las enzimas se encuentran en todas las células, en los jugos animales y vegetales y en algunos casos en las excreciones (orines). Las enzimas que se encuentran en las células se han llamado endo-enzimas o enzimas endo-celulares.

Cuando se ensaya extraer las enzimas por uno de los métodos habituales, unas porciones pasan fácilmente en solución, estas se han llamado por eso lioenzimas. Otra parte, variable en su cantidad para las diversas células, es retenida por las proteínas y otros coloides

## ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS

Las sustancias necesarias para que una enzima pueda desarrollar su actividad se clasifican en:

- a) Activadores inorgánicos y b) Activadores inorgánicos representados por sustancias orgánicas.

ACTIVADORES INORGANICOS. Están representados por diversas sales inorgánicas, incluso el ácido elorhídrico. Ejemplo de enzimas que requieren activadores inorgánicos, la amilasa animal que desdobla el almidón. Si las soluciones de estas enzimas se dializan, la actividad desaparece, pero vuelve de inmediato por adición al líquido dializado de pequeñas cantidades de cloruro de sodio. El  $\text{ClNa}$  puede reemplazarse, aunque con menos eficacia por bromuro, nitrato, sulfocianuro o fosfato de sodio.

ACTIVADORES INORGANICOS REPRESENTADOS POR SUSTANCIAS ORGANICAS. Que actúan o aumentando la velocidad de acción de una enzima o determinando que esta puede revelar su actividad.

Los activadores orgánicos son muy variados y en primer lugar pueden mencionarse, como ejemplos, el ácido cianhídrico que activa la papaína y la glutatión y el ácido ascórbico que activa diversas enzimas.

Dentro de estos activadores se ha considerado durante mucho tiempo ciertas sustancias orgánicas, de constitución relativamente compleja, termoestables, que eran indispensables para la función enzimática.

Al profundizarse los conocimientos químicos de las enzimas, se ha visto que estos activadores eran realmente parte integrante de las mismas en la forma que se indica al considerar su constitución.

El caso más estudiado es el del tripsinógeno segregado por el páncreas al estado de zimógeno é incapaz como tal, de hidrolizar las proteínas verdaderas. Por acción de una quinasa, la enteroquinasa, producida en el intestino, este zimógeno se transforma en tripsina activa, que hidroliza fácilmente las proteínas.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA. Como medida de actividad de las enzimas se usa la unidad enzima, que representa la cantidad de la misma que realiza, en condiciones bien establecidas, una determinada transformación. Ejemplo: unidad sacarasa, es la cantidad de enzima que reduce en un minuto a  $0^\circ$  la rotación de 4 grm. de sacarosa en 25 c.c. de una solución de fosfato monosódico al 1% a  $15.5^\circ$ . Representa una hidrolisis del  $25.5^\circ$ . Unidad lipasa, es la cantidad de enzima que en una hora a  $30^\circ$  produce 24% de hidrólisis en 2.5 grm. de aceite de oliva de índice de saponificación 185.5, cuando ese aceite se encuen

tra mezclado a 2 c.c. de regulador normal de cloruro de amonio y amoníaco de pH 8.90, adicionados a 10 miligramos de cloruro de calcio y 15 miligramos de albúmina de huevo llevada al volumen total de 13 c. c.

La pureza de una enzima se expresa por el número de unidades que contiene un gramo (algunas veces en miligramos), de la misma y algunos le llaman valor enzimático.

Los conceptos unidad de enzima son necesarios para el estudio de su purificación y estructura.

OBTENCION DE LAS ENZIMAS. Cuando las enzimas no pueden obtenerse directamente en solución, por no estar presentes en las secreciones animales o vegetales, es necesario recurrir a la extracción de órganos o tejidos con disolventes adecuados. En esto se ha basado la denominación de exo-enzimas que se daba a las primeras, segregadas habitualmente por las células, y de endo-enzimas a las que se encontraban en su interior. Cuando se les extrae de los tejidos es necesario proceder primero a la destrucción de las células, lo que puede hacerse por métodos mecánicos (moliendo o presión), o simplemente dejando que el tejido se destruya por autólisis.

Estos extractos brutos iniciales, pueden purificarse por diálisis que elimina todas las sales y luego precipitar la enzima de la solución por adición fraccionada de disolventes orgánicos, principalmente alcohol y acetona. A veces se ha empleado la precipitación por sales.

También se ha aprovechado la facilidad con que las enzimas se absorben selectivamente sobre determinadas sustancias: hidrato de aluminio, caolín, hidrato de hierro, fosfato de calcio, etc.

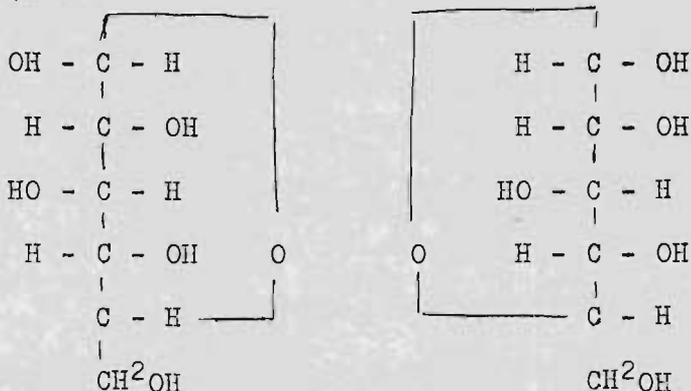
Parte de material que impurifica los extractos queda en solución y las enzimas se fijan a los absorbentes.

La liberación de las enzimas absorbidas se hace lavando los productos de absorción con soluciones salinas determinadas. El proceso de eliminar en esa forma una solución absorbida se llama elución. -- Por ejemplo, la tripsina pancreática, se absorbe fácilmente en medio ácido por el caolín y se le excluye de ese compuesto de absorción lavándolo con soluciones salinas diluídas.

Con estos métodos de absorción se han obtenido resultados variables. Una preparación de sacarasa, era 3.000 veces más pura que la presente en la célula de levadura, pero con una lipasa, el aumento de pureza obtenido fué tan sólo de 250 veces. Finalmente, ciertas enzimas se han podido cristalizar apelando a los métodos empleados para la purificación y cristalización de las proteínas, obteniéndose en forma que puedan considerarse especies químicas puras.

ESPECIFICIDAD Y REVERSIBILIDAD DE LAS ENZIMAS

ESPECIFICIDAD. El concepto más estricto es el que expresa que cada fermento actúa solamente sobre un compuesto fermentescible o sust--trato. Aún las más pequeñas variaciones en la estructura química de éste, determinan que el fermento ya no actúe; para cada fermento una substancia; la ureasa no actúa más que sobre la urea y la urea no se descompone por otro fermento que la ureasa. El caso más restringido se da en la acción de ciertas diastasas sobre cuerpos isómeros esterequímicos. La glucosa funciona según dos estructuras químicas distintas diferenciadas con letras  $\alpha$  y  $\beta$  (glucopiranososa  $\alpha$  y  $\beta$ ; glucofaranososa  $\alpha$  y  $\beta$ ):



Glucopiranososa  $\alpha$

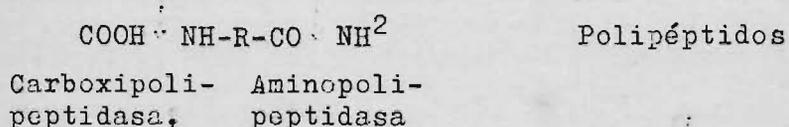
Glucopiranososa  $\beta$

La substitución de H de los grupos OH señalados con asteriscos en las figuras por radicales diversos, nos da la fórmula desarrollada de los cuerpos llamados, respectivamente: glucósidos  $\alpha$  y glucósidos  $\beta$ ; los primeros no se desdoblán en sus componentes más que por la diastasa denominada glucosidasa  $\alpha$  que existe en la levadura de cerveza; los segundos lo hacen solamente por la glucosidasa  $\beta$  que es uno de los fermentos integrantes de la emulsina de la almendra amarga; por la  $\alpha$  se hidroliza por ejemplo, la maltosa y por la  $\beta$ , la galactosa. La especificidad de estas diastasas es, por lo tanto, extraordinariamente restringida, y se la denomina, especificidad esterequímica. Y aún llega más allá; porque si en un glucósido  $\beta$  (desdoblable por la emulsina), sustituimos el grupo terminal  $\text{CH}_2\text{OH}$  por un metilo  $\text{CH}_3$ , continúa siendo desdoblable; pero si lo hacemos por  $\text{CH} - \text{CH}_2\text{Br}$ , ya no se hidroliza por la glucosidasa  $\beta$  como no se hidroliza tampoco si dicho terminal  $\text{CH}_2\text{OH}$  desaparece por completo y entonces la glucosa se cambia en xilosa (pentosa) y los glucósidos en xilósidos. Se ve que la acción del fermento depende de la existencia de dicho grupo terminal.

Caso análogo es el descubierto por E. Fischer en los dipéptidos formados por los amino-ácidos (dextro y levógiros), denominados alanina y glicina; la dipeptidasa del jugo pancreático no hidroliza a las glacil-alaninas, pero sí a las alanil-glacinas (especificidad de estructura): pero aún a estas últimas lo hace con diferente velocidad según se trate de las formas dextro o levo de los amino-ácidos -

integrantes (especificidad de estereoisomería). Las fosfatasas extraídas de mamíferos hidrolizan a los esteres monofosfóricos de la glucosa, pero lo hacen con gran dificultad, frente a los difosfóricos y la propia fosfatasa de los eritrocitos actúa mucho más enérgicamente sobre el ácido glucocrofosfórico  $\alpha$  que sobre el  $\beta$ . Pasteur fué el primero que observó la diferencia acción de los fermentos sobre substratos distintos en su estructura química estérica y, por lo tanto, también distintos por el sentido de su actividad óptica. El hongo *Penicillium glaucus* es capaz de desdoblar el ácido tartárico racémico y se nutre solamente del dextrógiro dejando el antípoda óptico levógiro; se habla de microorganismos y no de fermentos porque en aquella época se negaba todavía la existencia de estos últimos. Se ha pretendido explicar esta especificidad con el símil tan conocido y llamado "de la llave y la cerradura", no penetra un fermento más en un substrato de configuración adecuada, lo mismo que una llave no entra más que en su cerradura.

La especificidad de las Diastasas puede ser algo más amplia como ocurre con las polipeptidasas, que son los fermentos hidrolíticos de los polipéptidos; unas de ellas, las aminopolipeptidasas, rompen la cadena del substrato en la extremidad que soporta el grupo amino,  $\text{NH}_2$ , desprendiéndole; en tanto que las carboxipolipeptidasas, lo hacen por el extremo que tiene el carboxilo  $\text{COOH}$ :



Aquí la especificidad se concreta a lo dicho. El número de polipéptidos, reales y posibles, es casi infinito, sobre todo ellos actúan estas diastasas; pero siempre lo hacen en la forma dicha.

La especificidad se desfigura todavía más, cuando la diastasa actúa sobre todo un grupo de cuerpos análogos, las lipasas sobre las grasas, por ejemplo. Pero aún aquí es necesario consignar que una lipasa cualquiera no actúa sobre cualquier grasa; por lo menos, debemos distinguir las genuinas lipasas, de las estererasas que solamente actúan sobre los esteres formados por los ácidos grasos de pequeño número de átomos de carbono (tributirina, butirato de metilo).

Todavía es más amplio el concepto en otras diastasas como las llamadas desmolasas, que no tienen en realidad más que una especificidad de reacción; no desdoblan al substrato en sus componentes como hacen las hidrolasas, sino que lo transforman de los modos más diversos: Descarboxilación, deshidrogenación, oxidación, desprendimiento de oxígeno molecular, transporte de hidrógeno etc. En muchas ocasiones el fermento actúa sobre el substrato y sobre cuerpos análogos químicamente a él, ya sean naturales ó artificiales, La esterasa del hígado actúa sobre los esteres, pero también lo hace con las lactosas de los oxiácidos (oxibutírico, oxivalérico). La xantinoxidasa actúa no solamente sobre la xantina (2-6-dioxipurina), sino sobre otras muchas purinas (8-Oxi,6-amino,2-oxi,6-amino,8-cxi,2-8-dioxi); y también sobre muchos aldehídos.

La arginasa ejerce su acción sobre la arginina y también sobre su homólogo superior, en general actúa sobre cualquier substrato que posea guanidina libre y grupos carbóni

Recíprocamente se conocen casos de sustancias químicas que pueden suplir la acción de ciertos fermentos. Tal sucede por ejemplo, - con los substituyentes de las esterases: la glicilglicina y el ácido aspártico saponifican numerosos esteres.

Puede apreciarse por todo lo expuesto, que el concepto de especificidad de fermentos, ha ido evolucionando hasta el extremo de que actualmente casi no puede encerrarse más que en los límites bien amplios de los grandes grupos de aquéllos; una carbohidrasa no actúa - más que sobre carbohidratos y no lo hace sobre grasas ni sobre albúminas; una lipasa ejerce su acción sobre grasas únicamente en tanto que una proteasa lo hace sobre proteínas.

REVERSIBILIDAD. Una propiedad interesante de las diastasas es la reversibilidad de su acción. La acción de la amilasa se detiene sobre el almidón al acumularse en el líquido la glucosa producida. Sometiéndola a la acción de la maltasa de la levadura, se consigue la producción de la maltosa; el proceso químico es de síntesis - contrariamente al normal que es hidrolítico, de desdoblamiento de la maltosa en dos moléculas de glucosa. Se comprende fácilmente que esta reversibilidad tenga lugar en todas las acciones de las diastasas, porque ellas conducen a equilibrios químicos que se rompen en uno u otro sentido, según las condiciones del medio (especialmente según la concentración de iones hidrógeno). Taylor explica lo que él llama Catálisis encímica reversible, suponiendo que la enzima suple la energía necesaria a aquella fase de la reacción que es responsable de la inercia; conforme avanza la reacción, la fuerza motriz de ésta se devuelve a la enzima la energía anticipada. El llamado "efecto inductivo" forma parte del mecanismo según el cual la enzima activa al substrato. La aplicación de esta reversibilidad ha sido hecha, de modo muy interesante, por síntesis diastásica: la producción de muchos glucósidos y polisacáridos haciendo actuar las glucosidasas  $\alpha$  y  $\beta$  (levadura ó emulsina) sobre las glucosas en presencia de cuerpos diversos (azúcares, fenoles, alcoholes etc.) Bayliss ha logrado también combinar glicerina y glucosa mediante la acción de la emulsina. Pottvin ha conseguido producir trioleína uniendo ácido oleico y glicerina con el concurso de la lipasa pancreática.

Otro ejemplo típico de reversibilidad es el que ofrecen las lipasas, lográndose sintetizar grasas mediante su acción sobre una mezcla de glicerina y ácidos grasos. En algunos casos predomina la acción sintetizante de la Diastasa sobre la hidrolizante ó analítica; tal sucede con la fosfatasa que colabora en la formación del fosfato cálcico del hueso. Puede por lo tanto hablarse de "diastasas sintetizantes" en términos generales porque todas son activas, tanto en los desdoblamientos como en las síntesis. Claro es que hablamos de las Hidrolasas porque en las Desmolasas, el fenómeno sintetizante se negaba afirmando especialmente que la ruptura, por vía diastásica, de la cadena carbonada de un compuesto químico, no es recompuesta por

los mismos factores. El descubrimiento de la Carboligasa de Neuberg, vino a destruir ese aserto; existe en la levadura y actúa sobre el e tanal condensándolo consigo mismo, en una de las fases de la fermentación alcohólica; la condensación tiene lugar entre los grupos funcionales de las dos moléculas de aldehído y se produce una actoína - de fórmula.

$\text{CH}_3\text{-COH} \quad \text{HOC-CH}_3 \quad \text{CH}_3\text{-CO-CHOH-CH}_3$ , contrariamente a la aldolización, que es la condensación entre el grupo aldehído de u na molécula y el  $\text{CH}_3$  de la otra, para producir un aldol:  $\text{CH}_3\text{-COH} \quad \text{CH}_3\text{-COH-CH}_2\text{-COH}$ .

La carboligasa puede actuar sobre cualquier otro aldehído produciendo la aciloína respectivamente. Este descubrimiento de una genuina "sínteasa" era de extraordinario interés, pero ha sido muy discutido y hasta negado.

La síntesis determinada por una diastasa puede llegar hasta la producción de derivados ópticamente activos. Así, v.g. se ha logrado condensar el ácido cianhídrico con el aldehído benzoico, mediante la influencia de la emulsina; el nitrilo mandélico formado es dextrógiro, en tanto que los generadores eran inactivos a la luz polarizada. La actividad óptica ha sido determinada por la diastasa, quizá por inducción de la suya.

Propiedad muy particular de ciertas diastasas es la de su inter vención en la autólisis. Todo tejido ú órgano animal, es digerido ex pontáneamente cuando muere aquél o se le separa de él. Este proceso es llevado a cabo por diversos fermentos, entre los cuales pueden se ñalarse proteasas, lipasas, carbohidrasas, fosfatasas, nucleinasas; todas ellas, claro es, son hidrolasas. Pero defieren de las que existen en el tubo intestinal y en el estómago, de las genuinamente di-- gestivas. En condiciones apropiadas, el proceso de la autólisis, pue de seguir durante muchos meses y solamente se hace más lento cuando se acumulan los productos de la reacción, la cual es más viva en medio ácido. Así se explica la atrofia de la glándula mamaria después de la lactancia, del útero después del parto y de los órganos en general, cuando se alcanza edad avanzada; en todos los casos la acidez del medio no es neutralizada por la alcalinidad de la sangre y el -- proceso autolítico o pseudo autolítico se produce.

ENZIMAS QUE INTERFIEREN EN ALGUNAS INDUSTRIAS.  
INDUSTRIA DEL PAN, FABRICACION DE LA CERVEZA  
Y PREPARACION DE LOS ABONOS.

INDUSTRIA DEL PAN.

Es en la industria de la fermentación, donde las diastasas tienen su aplicación práctica; no existe ningún pueblo ni país en que no tengan usos ya en una u otra forma.

Desde hace mucho tiempo y en todas las épocas, aunque no de manera científica, han tenido gran utilidad las diastasas.

Con materias primas diversas por ejemplo, la utilización de las harinas cuando se mezclan con agua en presencia de las diastasas, permite a fermentar estas la fécula, desprendiendo anhídrido carbónico, aumentando el volumen de la masa y haciéndola porosa. Fermentan a su vez las proteínas que constituyen el gluten de las harinas, produciendo amino-ácidos y otros cuerpos. Los medios oxidantes favorecen las reacciones diastásicas, pero los reductores como el ácido ascórbico y vitamina C, impiden la actividad proteolítica dejando intacto el gluten en tanto que las féculas fermentan normalmente.

Para la elaboración del pan, el fermento puede incluirse, en principio, en la mezcla de harina y agua. En tal caso se utilizará una parte de masa fermentada.

Es también muy común usar el fermento que se origina de una levadura artificial que el comercio vende y que basta diluirla en una mezcla de agua y harina y mantenerla a una temperatura apropiada para obtener inmediatamente una masa en fermentación, un pan más desarrollado que el pan de levadura natural. A esta levadura artificial se le conoce con el nombre de "levadura cerealina" o "levadura comprimida" por ser elaborada con cereales en granos; puede utilizarse en cualquier momento y sin previa fermentación.

PANIFICACION CON LEVADURA NATURAL. Como el proceso y la fabricación del pan requiere una fermentación anticipada, es necesario guardar un poco de pasta fermentada durante un período de 24 horas, ya que dicho trabajo requiere una "levadura madre" ó masa agriada inicial, y que es conocida en la industria con el nombre de "pan francés".

El procedimiento empleado en la fabricación del pan, descansa en la renovación constante y ampliación progresiva del fermento inicial, adicionándole agua y harina sucesivamente, antes de llegar a obtener la pasta final, que luego será cortada y amolada con destino a la cocción.

PANIFICACION CON LEVADURA ARTIFICIAL. El uso de la levadura cerealina que el comercio expende, abrevia la panificación ya que el proceso de la fermentación se reduce a una sola pasta amasada ó a lo sumo dos.

**TEMPERATURA PARA LA FERMENTACION.** La temperatura más conveniente para la panificación con la levadura natural, fluctúa entre los 20° á 21°C. Si la fermentación se efectúa a temperaturas más elevadas deberá reducirse el tiempo de preparación de la masa; en caso contrario puede llegar a modificar la contextura, color y sabor del pan. La fermentación final, que es cuando la masa se halla recortada y amoldada, puede hacerse a la temperatura de 26° a 27°C. Pero para darle mayor ligereza al pan se hace fermentar a temperatura mayor que oscila entre los 40° á 45°C. Sometiéndolo a una especie de udación durante veinte a veinticinco minutos.

**CUIDADOS DURANTE LA FERMENTACION.** Una de las mayores dificultades -- que presenta la elaboración del pan, se produce durante el período fermentativo, puesto que de las condiciones y regulación del mismo, dependen el desarrollo y las cualidades reales.

Una temperatura demasiado elevada en la fermentación alcohólica puede parar la acción fermentativa, originando hasta el paro total de la fermentación ácida, que origina las bacterias lácticas y acéticas que existen antes en la masa. A esta acidez se debe la alteración del gluten y por ende la modificación que sufre la contextura del pan.

Lo mismo ocurre si se prolonga el período fermentativo. Por lo demás, la práctica no tarda en revelar los inconvenientes de semejantes condiciones; una mezcla muy fermentada conduce a un desarrollo muy acelerado de la pasta a la cual se incorporan, pero esta pasta no tardará en agotarse sin poder mantener la fermentación y desarrollo de las pastas sucesivas.

Esto se evitará rejuveneciendo el fermento, quitando la acidez por disolución sucesiva en agua, oxigenando la masa obtenida, incorporando harina mediante un manipuleo especial y haciendo prevalecer la fermentación alcohólica sobre la fermentación láctica y acética.

La industria panificadora con levadura artificial y la graduación del tiempo en la fermentación, se regula también de la siguiente manera: conservar la temperatura a 30°C., proporción de levadura cerealina incorporada a la masa y compacidad de ésta cuando por excepción sea necesario prepararla con mayor firmeza.

**PROCEDIMIENTO PARA REGULAR LA FERMENTACION.** La fermentación insuficiente, la demasiada escasez en la levadura y el frío retardarán la fermentación produciendo un pan muy reducido. Cuando se observa a -- tiempo la falta de actividad y desarrollo de las pastas, es posible acelerar la fermentación rezagada, agregando a la masa una pequeña cantidad de vinagre diluido en agua ó adicionando al agua disolventes líquidos en fermentación.

Las fermentaciones demasiado lentas se activarán adicionando agua caliente que se volcará por partes, de manera que se hará poco a poco hasta que se obtenga mayor temperatura. Una masa fermentada excesivamente ó una fermentación acelerada, se enmendarán con el uso de agua fría en verano y apenas templada en invierno, para que pueda

ser trabajada de una manera vigorosa, con tiempo prudencial y lograr la evaporación del ácido volátil que excede a su proporción, en una fermentación normal é inmediatamente se le agrega agua y harina hasta rehacer una nueva pasta que no tendrá la acidez anterior. Las harinas suelen presentarse con aptitudes a veces distintas para lograr un trabajo normal.

### FABRICACION DE LA CERVEZA.

En la industria tienen gran importancia las levaduras sacaromicetos, en vista de su parte esencial que le corresponde en las fermentaciones alcohólicas. Son muchas las especies conocidas, desempeñando cada una un papel especial en la fermentación. Así, el "saccharomyces cervisiae" es el fermento especial para la cerveza.

La cerveza es una bebida saturada de anhídrido carbónico, que se obtiene fermentando decocciones acuosas de malta, cebada y lúpulo. Los orígenes de la cerveza se remontan a épocas muy remotas; según ha podido establecerse, los egipcios fueron los que consiguieron preparar un producto de la más alta calidad alrededor del siglo veinte antes de Cristo. Muchos pueblos antiguos también conocían el arte de la cervecería. Se afirma que los babilonios competían ampliamente -- con los egipcios en sus fabricaciones, y que los hebreos aprendieron de estos últimos la forma de preparar la bebida. Las tribus que habitan en algunas regiones de Africa también preparan ciertas bebidas fermentadas que son verdaderas cervezas. Por último, en el siglo VII, en Europa, comenzó la industria experimentando algunos adelantos en el siglo siguiente; en la actualidad el progreso es indiscutible.

Entre la antigua práctica y los procesos modernos de la cervecería, podríamos decir en esencia que la industria y sus principios básicos no han cambiado. En realidad los progresos se han hecho en las maquinarias é instalaciones necesarias para la elaboración del producto, consiguiéndose mejores resultados en un período menor; obteniéndose al mismo tiempo una cerveza de un sabor superior y de excelentes propiedades de conservación.

Los ingredientes básicos son: agua, malta y lúpulo. La primera constituye del 80% al 90% del producto; los cereales son los que dan el hidrato de carbono. La malta que generalmente es cebada, ya que la cebada es la que da mayor rendimiento de diastasa, produce la cerveza de mayor riqueza y mejor aroma. El almidón se obtiene del maíz, arroz y otros granos sin germinar.

LEVADURA DE CERVEZA. En dos clases generales se agrupan las levaduras: levaduras altas y levaduras bajas. Las primeras requieren una temperatura más bien alta (15° á 30°), para producir la fermentación que es muy activa, dando lugar a un desprendimiento rápido de anhídrido carbónico; el líquido burbujes violentamente, dirigiéndose a la superficie la levadura. Esta clase de levadura es la que se usa para la fabricación de la cerveza, alcohol y vinos fuertes. En cambio la levadura baja actúa a temperatura inferior (4° á 10°c), y la fermentación es lenta; el desprendimiento de anhídrido carbónico es gradual

y la levadura queda en el fondo.

La fermentación de la cerveza supone la fermentación alcohólica, diferenciándose de la del vino, en que se inicia siempre mediante adición de levadura al líquido que se va a fermentar. No conviene la fermentación espontánea debiendo tomarse las precauciones necesarias para evitarla.

**TRANSFORMACION DE LA CEBADA EN MALTA.** Lo que se persigue con la malta es la formación de la diastasa que permita la transformación del almidón en azúcar fermentable (maltosa), originándose al mismo tiempo un cierto porcentaje de azúcar no fermentable (dextrina).

**RECEPCION Y LIMPIEZA DE LA CEBADA.** Cuando la cebada llega a la maltería, se le somete a una limpieza mecánica, valiéndose para ello de cilindros giratorios, aspiradores y clasificadores, con el objeto de eliminarle las piedras, barbas de los granos, espigas, etc. Conseguimos así al final de la operación, una separación de los granos según sus tamaños y según se encuentren rotos o no.

La cebada clasificada se almacena en silos, donde se mantiene hasta que se vaya a someter a la operación subsiguiente, denominado remojado.

Para que la semilla se encuentre en condiciones de germinar, deberá contener aproximadamente un 50% de humedad, por ello es que antes de seguir adelante, habrá que someterla antes a un remojado, que consiste en colocar los granos en agua, manteniéndolos allí hasta que hayan absorbido la cantidad necesaria de ella. El agua de remojo se cambiará cada doce horas más o menos. Siempre hay una pérdida de sustancias sólidas por parte de las semillas, puesto que contienen algunas sales solubles y azúcares que se disuelven en las primeras aguas; sin embargo dichas pérdidas no son considerables, pudiéndose estimar cuando mucho en uno y medio por ciento. La operación completa dura de dos a cuatro días.

**GERMINACION:** Una vez que el remojado haya tocado a su término, la cebada se pasa a las cámaras de germinación, que son grandes compartimientos bien aireados y en los cuáles se mantiene una temperatura de 15°C. aproximadamente. El aire reinante en estos recintos deberá estar saturado de humedad. A las 24 horas la cebada habrá comenzado a germinar, pudiéndose apreciar la aparición de pequeñas radículas en los granos. Durante la germinación se genera una cierta cantidad de calor, de suerte que es necesario hacer una remoción periódica de la cebada para evitar una repartición irregular de la temperatura. Al cabo de cinco ó seis días, el brote habrá adquirido un desarrollo considerable, habiéndose llegado a lo que se denomina malta verde. Al mismo tiempo se habrán desarrollado las enzimas, necesarias para la transformación del almidón en azúcar. De inmediato se procederá a su secado, que sin destruir las enzimas, detenga el crecimiento de la raíz.

Desde el punto de vista químico, la elaboración de la cerveza consiste en extraer del malta y los cereales molidos, las sustancias solubles en agua, al mismo tiempo que las enzimas que permitirán la transformación del almidón en azúcar fermentable.

### CONCLUSIONES.

En general el agua debe ser relativamente dura y las sales que mejor convienen son los sulfatos de calcio y magnesio y el cloruro de sodio. Si contiene mucho hierro, debe purificarse; una agua muy blanda se mejora mediante adición de yeso. No se usa agua que contenga mucha materia orgánica en solución ó un número relativamente grande de materias.

La obtención de la cerveza puede dividirse en distintas fases de germinación, trituración (incluyendo la ebullición y enfriamiento de la masa que ha de fermentar), fermentación y envase en botellas y barriles.

Las investigaciones de Pasteur, Reess, Hansen y otros han contribuido mucho al conocimiento de la naturaleza y propiedades de las levaduras. Hansen divide los sacaromicetos en seis especies típicas: Saccharomyces cervisiae. El fermento de la cerveza más corrientemente usado en fábricas y destilerías. Puede ser una levadura alta, o sea que flota en la superficie del líquido, o una levadura baja, según las condiciones que existen durante la fermentación. Saccharomyces Pastorianus I. Un fermento de cerveza que comunica a ésta un sabor amargo desagradable. Es una levadura baja ó sea que queda en el fondo de la bodega durante la fermentación. Saccharomyces Pastorianus II. Levadura alta hallada en la cerveza pero no parece tener acción sobre ella. Saccharomyces Pastorianus III. Un fermento de cerveza que produce en ella turbidez y enfermedad, es una levadura alta que se parece a las dos últimas. Saccharomyces Ellipsoideus I. Levadura baja y el verdadero fermento del vino. Se encuentra en la uva. Saccharomyces Ellipsoideus II. Una levadura que produce la opalinidad en la cerveza turbia. Es una levadura baja que se parece a la última mencionada.

En adición a las anteriores, Hansen aisló también de una levadura de cerveza, dos variedades, conocidas como Carlosberg #1 y #2 y que se parecen mucho al S. Cerevisiae. La número 1 da una cerveza con más anhídrido carbónico que la número 2 y se emplea principalmente para la cerveza embotellada, la número 2 se usa para cerveza de exportación.

### A B O N O S.

En la preparación de los abonos orgánicos llamados vulgarmente "compost" o "humus artificiales", se mezclan residuos orgánicos o materiales orgánicos fácilmente descomponibles, con estiércoles de varias procedencias en proporciones adecuadas. Estos materiales una --

vez juntos, en presencia de pequeñas cantidades de cal, cenizas y agua, sufren una descomposición conocida con el nombre de fermentación. La presencia de cantidades adecuadas de aire y agua, aceleran grandemente estas descomposiciones. La cal o ceniza actúan en dos formas: 1o) Neutralizan los ácidos producidos por las bacterias. 2o). Proporcionan el calcio y otros elementos vitales en el metabolismo bacteriano. En el primer caso la neutralización de los ácidos producidos por las bacterias mantiene un pH aproximado a 7, en el cual las bacterias trabajan más intensamente.

Cuando se usa la palabra fermentación, se entiende que en los cambios metabólicos que se llevan a cabo en dichos procesos, intervienen catalizadores biológicos llamados fermentos enzimas ó diastasas. Sin embargo hay que recalcar que en la producción de abonos orgánicos, la palabra fermentación está hasta cierto punto mal empleada, ya que en este proceso aunque se llevan a cabo fermentaciones en pequeña escala, la mayoría de las descomposiciones son debidas a la acción de bacterias específicas para cada uno de los componentes de materiales orgánicos que sirven como substratos. Tenemos compuestos orgánicos, por ejemplo, proteínas, hidratos de carbono, azúcares, ácidos orgánicos, gomas, resinas, grasas, etc., los cuales en su mayoría, como se ha expuesto anteriormente, son descompuestos por bacterias aeróbicas y anaeróbicas; en algunos casos sin embargo, en la descomposición de productos tales como las azúcares y otros hidratos de carbono si intervienen los fermentos, la celulosa que descompone la celulosa y la transforma en celuviosa, la citasa transforma la hemicelulosa, en dextrina y mono-sacáridos, la diastasa (amilasa), que transforma los almidones y dextrina más simple en maltosa, la pectinasa ó pectasa que descompone las sustancias péptidas en azúcares reductibles, la rafinasa que transforma la rafinosa, en meliviosa y fructuosa, la invertasa que transforma la sacarosa en glucosa y fructuosa, la maltasa que transforma la maltosa en glucosa.

Los otros productos mencionados que forman parte del tejido vegetal, son descompuestos en la preparación del "compost" por acción puramente bacteriana. Tomemos, por ejemplo, el caso de las proteínas que son el componente primordial del tejido, tanto animal como vegetal y que están constituidas por reuniones de amino-ácidos ligados por medio del llamado enlace péptico y que forman compuestos nitrogenados de alto peso molecular.

La descomposición de las proteínas se lleva a cabo en forma escalonada, de un compuesto orgánico sumamente complejo o compuesto, a unos más sencillos como los amino-ácidos, que a su vez se descomponen en sales amoniacales, nitratos y finalmente nitrógeno. Dicha descomposición escalonada se lleva a cabo en la forma siguiente: Proteínas - Proteosas - Peptonas - Polipeptidos - Dipéptidos - Amino-ácidos - sales de amonio - Nitratos - Nitrógeno, y así todos los productos orgánicos, se descomponen unos parcialmente y otros totalmente hasta formar el "humus".

EL PROCESO DEL "COMPOST" Ante todo hay que comprender que se trata de un proceso en que las bacterias, los hongos y otros microorganismos, desempeñan un papel importante. Si bien se producen alteracio--

nes químicas en la pila es un procedimiento esencialmente biológico

Hay que tener muy en cuenta, que los microbios que intervienen necesitan ser bien alimentados con elementos que suministran el estiércol y el material verde con que se constituye la pila. El estiércol suministra el nitrógeno con que son alimentadas las bacterias -- mientras desintegran la celulosa. También es necesario el fósforo y la potasa, aunque en menores cantidades, en un 10% posiblemente, obteniéndolo del estiércol y de la materia verde.

Por otra parte, necesitan condiciones adecuadas para este trabajo; en cuanto la pila está formada se inicia una fuerte fermentación elevándose la temperatura hasta 160° F., anteniéndose a ese nivel -- durante algún tiempo para luego decenderla gradualmente hasta llegar a los 90° F. A medida que la temperatura varía entran en acción distintos tipos de microbios. Hay varias especies denominadas termófilas que resisten temperaturas muy elevadas y muchos grupos de actinomicetas se desarrollan aún con temperaturas mayores a 150°. En ciertas etapas, sobre todo al principio, los hongos realizan gran parte del trabajo. Después de una nueva remoción las bacterias se activan debido a que la temperatura ha descendido aproximándose a la que caracteriza a cada especie. Por ser anaerobias en su mayoría, estas últimas, no hay necesidad de hacer agujeros en la pila, después de esta remoción. Es notoria la volubilidad de la naturaleza en el proceso de la pila del "compost". En las diversas fases se utilizan distintas formas de bacterias y hongos. Sabiéndose muy poco de las funciones exactas de cada uno, siendo necesario hacer estudios más avanzados.

Se ha meditado mucho sobre los métodos de estimular la vida biológica en la pila del compost. Un método consiste en regarle agua de cuando en cuando rica en organismos de suelo, obtenidos de tierra de jardines de calidad superior. Ejemplo, dos libras de esta tierra en 10 litros de agua, dejándola asentar durante una hora.

El comercio expende cultivos de bacterias, que aceleran la descomposición en la pila, con alguna efectividad, los procesos microbianos en la pila son tan complicados a causa de los muchos cambios de la temperatura, que agregar un cultivo parece una contribución innecesaria.

En principio el estiércol de establo contiene más de un 20% de bacterias que son derivados del aparato digestivo del animal, donde desintegran alimentos. Si agregamos al principio, estiércol fresco a la pila es suficiente como comienzo, si se cree necesario puede agregársele el agua inoculada; también se puede esparcir un poco de compost viejo terminado, en la pila nueva a medida que la va formando.

Una pila correctamente construída debe elevar su temperatura en pocos días, lo cual se comprueba introduciendo una varilla de metal que se calienta al contacto del contenido o bien observando el vapor que sale de los agujeros de ventilación. Pero si se quiere hacer las cosas con técnica, se coloca un termómetro en el extremo de la varilla tomándose diariamente la temperatura. A los pocos días de formada

la pila, la temperatura debe llegar a 160° F., y permanecerá esa temperatura por unas semanas. Dentro de las primeras ocho semanas la pila necesita aire para que siga la descomposición de la fermentación y no por putrefacción; debido a esto hay que colocar el material muy suelto, pero esto no debe ser en exceso, como se dijo anteriormente. Es de mucha importancia que la pila esté muy bien ventilada durante las primeras ocho semanas, para que el oxígeno pueda penetrar y escapar el anhídrido carbónico. Como agujeros de ventilación en algunos casos, se prefiere la paja de centeno, tallos de maíz, atados muy flojos y colocada en cada lugar donde se desea. Cuando la pila no se asienta en pocas semanas es síntoma de que hay escasa ventilación y de que la acción ha disminuído. Otro de los síntomas malos es el desprendimiento de amoníaco que a cada momento emana la pila y esto nos demuestra que está muy apretada; lo mismo ocurre cuando está demasiado húmeda y entónces lo mejor es hacer la pila de nuevo. Nunca hay que permitir que los pastos crezcan en la pila, porque las raíces suprimen la provisión del aire. El hecho de que la pila no se asiente, nos demuestra que está seca; cuando la temperatura excede de 150°, hay que humedecerla. Si la dejamos secar demasiado entonces se reducirá la fermentación y el compost terminará demasiado en madurar perdiéndose por ello muchos elementos nutritivos de gran valor. Cuando aparecen hormigas, es síntoma de sequedad.

El agua de compost es buena para regar plantas y tiene otros usos de jardinería. El compost puede servir varias veces si de vez en cuando le agregamos un poco de compost fresco.

#### ENZIMAS QUE ACTUAN EN LA FERMENTACION DEL CAFE, CONFUSION Y ENSTABILIS.

CEFE. La operación de la fermentación del café, no tiene otro objeto que el de eliminar la materia gomosa o baba.

Para muchos, la operación de la fermentación es de orden puramente físico, mientras que para otros dicha operación ejerce también un efecto de naturaleza química en la composición del grano. A resultas de ello, si la fermentación se hace en condiciones favorables o desfavorables, ejercerá una acción importante sobre la denominada "calidad licorante" del café. Ahora bien, como en esos cambios químicos del grano, intervienen microorganismos y reacciones químicas, la operación deja de ser de orden químico para confundirse con las de naturaleza bioquímica.

De estas consideraciones resulta que para unos, la fermentación es sólo una de tantas operaciones de la tecnología del café, mientras que para otros es lo más importante de las referidas operaciones.

Así pues, por medio del lavado y posteriormente a la fermentación, puede ser separado fácilmente del pergamino; porque dicha materia mucilaginosa, de insoluble que era al despulpar el café, se ha solubilizado.

Esta solubilización es consecuencia de la descomposición de las materias pépticas del mesocarpio, bajo el influjo de los fermentos solubles o diastatas, siendo estos fermentos solubles, la pectosinasa y la pectosa; existen generalmente en toda cereza madura.

La pectosa es transformada en pectina y azúcares por la pectosinasa. Estas azúcares son solubles, no así la pectina; interviene entonces la pectosa, transformando la pectina en ácido péptico que es soluble. Es muy importante tener en cuenta que esta última transformación de la pectina, sólo puede efectuarse en presencia de las sales de cal.

La temperatura es factor importante para la solubilización de las materias pépticas, siendo la más favorable a éste fenómeno la que oscila entre los 35° a 45° C. Son extremos de temperatura que generalmente se alcanzan en las pilas de fermentación.

La sustancia mucilaginosa es el mesocarpio del fruto, estando constituida por una serie de células vegetales que encierran una fuerte cantidad de materias pépticas diluidas en el jugo celular y su adherencia se debe a que las paredes de estas células están superpuestas unas con otras, adheridas por una capa de ácido péptico combinada con cal o sea por un pectato de cal.

En consecuencia, bastará encontrar un solvente de un pectato de cal para que desaparezca la adherencia de las células entre sí. Lo grado ésto, será un hecho separar el mucílago del pergamino por un simple lavado con agua.

Las diastatas, (pectosinasa y pectasa), que se encuentra en las cerezas maduras, desempeñan el papel de solvente del pectato de cal, en las pilas.

Las diastatas se encuentran en condiciones ordinarias en las cerezas maduras, en cantidad suficiente para provocar esta solubilización; y se comprende que así sea, si se toma en cuenta que tales diastatas pueden obrar sobre 100.000 a 500.000 veces su peso de pectato de cal. Lo que viene a confirmar lo dicho de que las diastatas solas, son suficientes para efectuar la solubilización de la materia péptica, sin el concurso de los fermentos microbianos.

En la práctica de los laboratorios, es factible operar la solubilización, prescindiendo de la acción microbiana; basta con esterilizar el café despulpado, teniendo especial cuidado de no destruir las diastatas. No así en los beneficios; nada se ha planeado sobre esto que pueda ser aplicable en la industria. Tal vez sea por el costo excesivo que implicaría esta operación, o bien por la dificultad de anestesiar los microorganismos sin alterar las diastatas.

Se pueden apreciar las fases sucesivas de la fermentación de una pila llena de café, por dos referencias que autorizan a seguir o apreciar la cuantía de los cambios, que en pocas horas experimenta y por tanto la intensidad de los fermentos en ella verificados. Tales indicios son: a) La curva de la temperatura. b) Las variaciones del  $p^H$ .

El objeto primordial de la fermentación a que se somete el café, es llegar a la disociación de las células que forman el mucílago, -- porque sin esta previa disociación no es posible sacar, ni lavar el café del pergamino. Por lo tanto cuando el café fermentado, es lavado, no tiene más objeto la operación, que eliminar los productos de la fermentación.

Ahora bien, en las pilas de café siempre se inicia una fermentación microbiana, por razones fundamentales: lo. Porque en las pilas juntamente con el agua de despulpe, se encuentran células enteras de la carnosidad de las cerezas y además los elementos de aquellas células que fueron rotas por traumatismo durante el despulpe. En consecuencia, además de los elementos esenciales de una célula (citoplasma y nucleoplasma), el líquido que envuelve los granos contiene celu-losa y azúcares, éstos últimos están formados de glucosa.

Por otra parte, no debe olvidarse que por las despulpadoras pasan muchas cerezas no del todo maduras, por cuyo motivo existen siempre en todas las pilas almidón, tanino y otros ácidos. También sucede, que por los pulperos pasan cerezas muy maduras o en parte ya secas, que aportan a las pilas celulosa ya endurecida y sobre todo azúcares. No obstante que desaparecen con la madurez de todos los frutos, el almidón, tanino y otros ácidos que contienen en cierta época de su desarrollo.

De todo ello se desprende que el líquido que baña el café de una pila, es por su composición, un medio esencialmente susceptible de originar una fermentación microbiana y como la combinación del líquido es variable según la calidad del café despulpado, la fermentación no será idéntica de una a otra pila.

El café nunca es esterilizado por ser esta operación de un costo muy elevado y además se originaría la alteración de la calidad de los granos; en las cerezas maduras se encuentra toda una floramicrobiana: levaduras, fermentos, bacilos, etc.

En síntesis, se concibe que dada la composición del contenido de una pila y la presencia de gérmenes microbianos, éstos entran inmediatamente en actividad, iniciándose una serie de fermentaciones que cambian progresivamente la composición del líquido de la pila en que se baña el café despulpado.

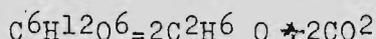
La flora microbiana de las pilas es extremadamente numerosa y variable, siendo fácil aislar y crear en cultivos puros, gérmenes que pertenecen a los siguientes grupos microbianos: odium, penicillium, sterigmatecitos, aspergillus, mucor, etc.

Todos estos gérmenes no son sino "mohos" transformados y adaptados al ambiente en que viven y por las funciones que desempeñan entre éstos, los hay capaces de iniciar las siguientes fermentaciones: alcohólica, láctica, acética y butírica, siempre que el ambiente sea adecuado por su naturaleza inicial o por las transformaciones sucesi-

vas que en él se opera para dar origen a estas fermentaciones.

FERMENTACION ALCOHOLICA. Es la única que se observa en el transcurso de las dos primeras horas de depositado el café despulpado en las pilas. Es muy activa y llega a su máximo entre las ocho o diez horas o mejor dicho, que éste máximo tiene lugar mucho antes del tiempo que generalmente necesita el café para dar "punto". Prosiguiendo después, mientras el café está en las pilas, pero cada vez con más intensidad.

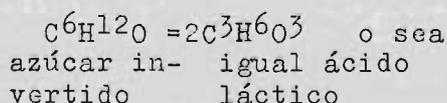
La reacción que da origen al alcohol, se efectúa a expensas de los azúcares invertidos que están en disolución en los líquidos de las pilas, según la fórmula clásica:



Glucosa igual al- gas car-  
cohol Etílico bónico.

Esta reacción demuestra que además de la formación del alcohol hay gran desprendimiento de  $CO_2$  que es el que forma burbujas cuando la fermentación se efectúa bajo de agua.

2) FERMENTACION LACTICA. Esta fermentación se inicia después de dos o tres horas de estar el café en las pilas y se prolonga durante un lapso de 20 a 24 horas. Se efectúa a expensas del azúcar de acuerdo con la reacción siguiente:



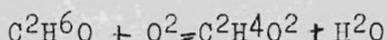
Como lo indica esta fórmula, no hay en este fenómeno ni absorción ni desprendimiento de gases.

(3) FERMENTACION ACETICA: En los cafés despulpados, sin que haya transcurrido muchas horas después del corte, esta fermentación no inicia sino alrededor de la 8a. hora de estar el café en las pilas. Es natural que así sea, si se recuerda que la fermentación acética no se hace a expensas de las sustancias que están al principio de la pila del café, sino a expensas del alcohol etílico que se origina a consecuencia de la fermentación alcohólica. En los cafés que permanecen amontonados mucho tiempo antes de ser despulpado, puede haber ya un principio de fermentación alcohólica, y en consecuencia la fermentación acética puede iniciarse en las pilas muy poco tiempo después de entrar el café en aquéllas.

En condiciones anormales, la fermentación acética es muy activa desde la 8a. a la 12a. hora, y prosigue después hasta el fin de la fermentación, pero cada vez con menos actividad.

Esta fermentación se efectúa a expensas del alcohol que se origina de la fermentación alcohólica, de acuerdo con la reacción siguiente:

guiente:



Alcohol Etilico más oxígeno igual ácido acético más agua.

Esta reacción demuestra que para que se verifique la transformación del alcohol en ácido acético, es necesaria la presencia del oxígeno lo cual se explica diciendo que la fermentación acética es un fenómeno aerobio.

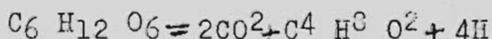
(4) FERMENTACION BUTIRICA. Es la última fermentación que se produce en las pilas de café.

Cuando se trata de cafés despulpados poco tiempo después de cortados, no hay peligro de ver aparecer los primeros síntomas de la fermentación butírica, antes de haber transcurrido 24 horas de estar el café en las pilas. Es esencial anotar que la fermentación butírica es una fermentación marcadamente anaerobia, es decir, que en el transcurso esta fermentación, no hay absorción de oxígeno. Más aún el contacto con el oxígeno retarda y entorpece esta fermentación; es por esta razón que se nota generalmente que esta fase de fermentación no se inicia sino cuando los granos de pergamino, que han perdido ya gran parte de la materia que los rodeaba, se van aglomerando en el fondo de las pilas, formando una masa compacta que impide el acceso del aire y por tanto favorece el trabajo de los fenómenos anaerobios.

La fermentación butírica se verifica a expensas, ya sea de los últimos rastros de azúcares que todavía permanecen en las pilas, ya sea a expensas de las materias del grupo del almidón, como son almidón, dextrina, celulosa y goma.

Las reacciones que se verifican son las siguientes:

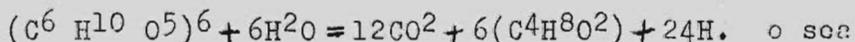
A) con las sustancias del grupo de los azúcares:



Acido Butírico

Azúcares invertidos igual gas carbónico más ácido butírico más hidrógeno

B) con las sustancias del grupo del almidón:



Almidón más agua igual gas carbónico más ácido butírico más hidrógeno.

Estas reacciones indican claramente que en el desarrollo del proceso de la fermentación butírica no hay absorción de oxígeno, notándose en cambio un fuerte desprendimiento de gas carbónico y de hidrógeno.

La fermentación butírica es la fase pútrida del fenómeno de la fermentación y prosigue su curso en las aguas de lavado dando origen a las emanaciones nauseabundas de los beneficios. Estos malos olores se deben a las combinaciones del hidrógeno desprendido, con las varias materias orgánicas que se encuentran en todas las pilas de café.

### C U R T I D U R I A .

SUBSTANCIAS AMILACEAS QUE POR FERMENTACION PRODUCEN ACIDOS. Empleando este procedimiento, se producen sobre las pieles, no solamente el descalcado, sino algunas modificaciones de naturaleza bio-química, que hacen que los cueros obtenidos sean suaves y presenten un grano más firme.

Las substancias más usadas son la cebada, el afrecho y el salvado de trigo, que al fermentar originan ácidos fórmico, acético, butírico y láctico. Se colocan las pieles en una infusión preparada diluyendo de 5 a 10 Kg. de salvado por cada 100 Lts. de agua, que se mantendrá a 35°C. durante el curso de la operación, que durará entre doce y veinticuatro horas. La fermentación que se verifica dará lugar a un violento desprendimiento de gases entre los cuales reconoceremos el anhídrido carbónico, nitrógeno ó hidrógeno, al mismo tiempo que el baño se volverá ácido. Antes de secar las pieles, el ácido se neutraliza con una cuidadosa adición de amoníaco, soda etc.

Se aconseja lavar el salvado, antes de usarlo, con agua hirviendo aunque algunos curtidores lo emplean directamente. En este caso - si tuviese mucha harina, se irá hacia la superficie llevada por el gas desprendida durante la fermentación, formando una masa pastosa - que se adheriría a la piel entorpeciendo el descalcado.

Se ha dividido este tratamiento en tres tipos: dulce, alcohólico y ácido. El primero se hace con un baño tibio de agua de salvado, obtenida de una infusión de aquella, la cual se deja en reposo para que las partes sólidas se vayan al fondo, decantando el líquido sobre nadante. Las pieles se sumergen tan sólo dos o tres horas; este proceso es apropiado para las pieles muy delgadas o bandas.

El tratamiento alcohólico, es impropriamente llamado así, pues - en él no se produce alcohol sino los gases que ya hemos citado anteriormente. Para el tratamiento ácido, el salvado se pone por varias horas en contacto con agua fría hasta que se empape, agregándosele en seguida agua hirviendo para elevar la temperatura a 75°C. Se prosigue la infusión algunas horas más y después de dejar que se enfríe a 45°C., se le adiciona más líquido que haya sido usado anteriormente el cual actuaría como fermento. Las pieles se sumergen durante unas tres horas a 35°C. ó 40°C. El tiempo que dure el tratamiento puede hacerse más largo bajando las temperaturas.

Como el desarrollo de bacterias por estos procesos de fermentación se hace muy intenso, recomendamos tener especial cuidado en todas las operaciones para evitar que se arruinen las pieles.

CURTIDO VEGETAL. Los agentes principales de este curtido son las materias tánicas. Llamamos así a un grupo de materias astringentes - naturales que se encuentran abundantemente en el Reino Vegetal, en las hojas, corteza, madera y raíces de ciertas plantas. Las propiedades de las materias tánicas son las siguientes:

Tienen función ácida.

Son solubles en agua, acetona, acetato de etilo, alcohol y éter comercial. En éter puro, cloroformo y bencina son insolubles.

Precipitan las materias albuminóides en forma insoluble, haciendo de la piel insoluble en agua hirviendo a la vez que imputrecible.

Con las sales férricas dan coloración que varían del azul verdoso al negro.

La presencia de ácidos ó alcalis puede hacer la coloración producida por una materia tánina.

Todas las materias tánicas no tienen la misma composición química, aunque estén constituidas por los elementos carbono, oxígeno e hidrógeno. Son compuestos orgánicos que por métodos apropiados de descomposición química producidos por los fermentos dan diversos productos. La clasificación técnica de las materias tánicas se basa justamente en las substancias que originan por la acción del calor. Generalmente pueden producir dos substancias: Pirogalol y Pirocatequina; aunque en algunos casos también se produce Floroglucina. El Pirogalol es isómero de la Floroglucina, variando su fórmula desarrollada tan solo en la posición de los tres grupos Oxhidrilo (OH).

Podemos hacer una división bien definida de las materias tánicas según su composición.

A) Materias tánicas a base de Pirocatequina-Quebracho, corteza de abedul, corteza de roble, mangle, madera de mimosa, cicuta, lentisco, madera de pino y otras.

B) Materias tánicas a base de Pirogalol . Mirobálamos, valonia, algarroBILLA, zumaque, madera de roble, etc.

### E N S I L A J E

DEFINICION Y FUNDAMENTOS DEL PROCESO DE "ENSILAJE". El ensilaje es un medio de conservar y de almacenar algunos subproductos industriales y los forrajes verdes, amontonándolos y haciéndolos sufrir una fermentación especial que evita su descomposición.

Cuando se amontonan determinados subproductos industriales o forrajes verdes, se produce en la masa una elevación de temperatura -- por efecto de una serie de fermentaciones que transforman su composición. Estas transformaciones que sufre la masa, son en su orden las siguientes:

LA FERMENTACION ALCOHOLICA O DULCE: que transforma el azúcar, el almidón, la dextrina etc., del vegetal, en alcohol, con desprendimiento de ácido carbónico.

LA FERMENTACION ACETICA O ACIDA: que transforma el alcohol antes mencionado con producción de ácidos acético y láctico.

LA FERMENTACION BUTIRICA O PUTRIDA: en virtud de la cual sufre la masa una especie de combustión, con desprendimiento de gas sulfhídrico y gases amoniacales.

Para que estos procesos distintos y bien definidos de fermentación puedan ser observados, es necesario que los forrajes se dejen g montonados al aire libre.

Las fermentaciones anotadas, se inician y son causadas por microorganismos que se hallan esparcidos en el ambiente y que se fijan en las masas de materias orgánicas, utilizando como vehículo el aire. Cada clase de microorganismos predominantes, entra en actividad tan pronto como las condiciones anteriores y la condición de la masa le son favorables. Así los fermentos alcohólicos predominan mientras -- subsiste en la masa el azúcar o las materias hidrocarbonadas y tienden a desaparecer tan pronto como estas sustancias se agotan. Iní-- ciense entonces las fermentaciones acéticas y lácticas, cuyo microor-- ganismo necesitan de la presencia del alcohol formado de la anterior fase del proceso, todo lo cual explica porque razón los fenómenos de fermentación no son simultáneos, sino sucesivos.

Por otra parte, todos estos grupos de microorganismos llamados fermentos, necesitan para cumplir sus funciones, encontrarse en un medio favorable. esto es, que presente cierta y determinada dosis de humedad, de calor, de aire y hasta de luz. Cuando alguno de estos elementos falta, la vida y la actividad del fermento es imposible ó lleva una existencia precaria, sin poder ampliar sus funciones, quedando así paralizada su acción hasta el momento en que las circunstan-- cias le sean de nuevo favorables para reaccionar intensamente.

En estas observaciones y en estos hechos, es que se basan todas las operaciones o procesos de ensilajes. En efecto, basta tener presente estas particularidades para comprender, que según se desee obtener un "ensilaje" dulce" ó un "ensilaje ácido", bastará colocar la masa en condiciones favorables para que en el primer caso, sólo se e-- fectúe la fermentación alcohólica; o en el segundo caso, para que -- después de terminada la fase alcohólica, tenga también lugar la fase acética. Conseguido uno ú otro de estos resultados, bastará entonces y en el momento preciso, sustraer la masa del contacto del aire, apel-- mazando ésta y sometiénola a una presión considerable y continua que expulse el aire de la masa, e impida que llegue lo necesario a la vi-- da de los fermentos. Si estas condiciones se llenan, el producto en-- silado podrá conservarse inalterable por mucho tiempo.

ENSILAJE DULCE Y ENSILAJE ACIDO: Las condiciones anteriores son básicas y permiten:

- 1c.) Proveer, conociendo la forma en que se llenó el silo y las anotaciones ó curva de las temperaturas de un termómetro -- colocado en el interior del silo, si el ensilaje será un -- ensilaje dulce ó un ensilaje ácido.
- 2c.) Conducir la llenada del silo en tal forma que con mucha -- probabilidad podrá obtenerse a voluntad un ENSILAJE DULCE ó ENSILAJE ACIDO.

Si decimos que es con "probabilidad" y no con absoluta certeza, que puede obtenerse a voluntad una ú otra clase de ensilaje, es por que en el proceso de fermentación pueden interferir algunos factores de difícil control.

A). CONDICIONES QUE DEBEN LLENARSE PARA QUE LA MASA DEL SILO SEA UN "ENSILAJE DULCE"

Cuando en el proceso de fermentación se llega a la fase alcohólica, se deben tomar las debidas precauciones para que en ese momento preciso se suspenda el proceso de fermentación; porque de lo contrario, se iniciaría la fase ácida de la fermentación que conduciría a la obtención de un ensilaje caracterizado por la presencia de ácido acético y ácido láctico.

Ahora bien, si en el silo introducimos el forraje en una capa -- de 1 a 2 metros, sin comprimirlo, esto es dejando caer el forraje -- por su propio peso a manera de que el aire penetre facilmente, la -- fermentación se inicia rápidamente y tanto los azúcares como las ma-- terias amiláceas, se transforman en alcohol. Un termómetro introduci-- do en la capa de forraje, nos indicará que la temperatura sube a 50° ó 55° C. al cabo de 18 a 24 horas.

Al alcanzarse esa temperatura se produce una parcial esteriliza-- ción de la masa, de tal manera que si llegado a ese estado, se apelmaza fuertemente el forraje a manera de expulsar el aire y seguidamen-- te se le aplica fuerte presión, lo cual introduciría nuevos fermentos del ambiente, podrá observarse que la temperatura empieza a des-- cender, lo que indica que se suspende el proceso de fermentación; la masa en ese estado tiene un color verde-amarillo claro y un olor agr-- dable, con escasa acidez.

CONDICIONES QUE DEBEN LLENARSE PARA QUE LA MASA DEL SILO SEA UN "ENSILAJE ACIDO".

Cuando la cantidad de aire en una masa de forraje se halla res-- tringida, lo cual puede lograrse mediante un apisonamiento moderado del forraje a medida que se va echando en el silo, la fase alcohóli-- ca es menos violenta, mucho más lenta, y como consecuencia, la tempe-- ratura no sube más allá de 20° a 30° C. sobre la temperatura del ambien-- to no habiendo por consiguiente destrucción de los fermentos lácticos y acéticos y éstos entran en acción simultáneamente con los fermentos alcohólicos, transformando el alcohol que estos producen a medi-- da de su

Por lo dicho se deduce claramente que para obtener un ensilaje ácido, es esencial que la temperatura de la masa en ningún caso debe pasar de 50° C. Consecuentemente el método a seguir es el siguiente:

No es necesario tomar ninguna clase de precauciones en cuanto se relaciona con la temperatura; bastará con llenar el silo con la mayor rapidez posible, presionando el forraje a medida que se vierte. Si el forraje estuviera muy húmedo a consecuencia de las lluvias durante el corte, es conveniente aunque no indispensable, extenderlo durante algunas horas antes de ensilarlo.

Es importante aclarar que no debe darse valor absoluto al método expuesto; con ello queremos significar que sería un error deducir de su exposición, que no haya otras modalidades de llenar un silo y obtener, sin embargo, resultados satisfactorios en cuanto al valor alimenticio del producto.

CONCLUSIONES: Las dos clases de ensilaje, dulce y ácido pueden obtenerse tanto con forraje entero como con forraje picado. Siempre que la temperatura dentro del forraje suba a más de 50°C., el resultado será un "ensilaje dulce". Cuando la temperatura no suba a más de 5° a 10°C., sobre la temperatura del medio ambiente, el resultado será de un ensilaje agri-dulce.

"ENSILAJE DULCE". "ENSILAJE ACIDO": Al respecto conviene tener presente los datos siguientes:

1o.) "Ensilaje dulce". Es aceptado por el ganado. No comunica olor ni gusto particular a la leche de las vacas que reciben en su ración, una fuerte proporción de forraje ensilado. En cambio, este ensilaje tiene el inconveniente de enmohecerse con mucha facilidad, una vez extraído del silo, en la superficie de sección del corte, ya sea que la extracción se haga por cortes verticales en los silos de trinchera, o por capas de arriba abajo en los silos circulares.

Este moho de micelios blanquecinos, no se adhiere mucho a la masa; pero puede originar en poco tiempo una gran alteración de la misma, aún cuando se tenga el mayor cuidado de dejar bajo presión el resto de la masa ensilada. El desarrollo de este moho sobre la superficie, se debe a la evaporación del alcohol formado como consecuencia de la fermentación alcohólica, que aseguraba la conservación del forraje e impedía el desarrollo de los hongos.

2o.) "Ensilaje ácido". El "ensilaje ácido",-entendiendo como tal es aquel que en el proceso ha llegado hasta las fases de fermentaciones láctica y acética;-es tanto o más aceptado por el ganado como lo es el "ensilaje dulce".

En verdad, el ensilaje ácido se aproxima más por su composición al forraje natural de que proviene; ello se debe a que en el silo --llenado en forma apropiada para obtener esta clase de ensilajes, la temperatura, se eleva menos, no llegando nunca a los 50° C., resul--

tando de ello que la fermentación es más moderada y como consecuencia, son también menores los cambios químicos o transformaciones de sustancias que experimenta el forraje.

Por otra parte, el ensilaje ácido puede quedar en exposición al aire una vez extraído del silo, sin cubrirse de moho, durante más tiempo que el ensilaje dulce; y por esta misma causa, es menos esencial la recomendación de renovar los cortes o de extraer del silo cada vez una cantidad suficiente de forraje, para evitar el desarrollo del moho en las capas superficiales.

MODIFICACIONES DE NATURALEZA QUIMICA. Las modificaciones químicas -- que experimenta el ensilaje bajo la acción de los fermentos, no son las mismas en todos los casos, pues varían considerablemente y dependen de la clase de ensilaje, "dulce" o "ácido" que se obtiene, desde luego que el resultado es la consecuencia de dos acciones distintas: 1o.) Acción respiratoria y fermentación intercelular, con intervención de diastasas proteolíticas, producción de alcohol y desprendimiento de gas carbónico. 2o.) Acción Microbiana, que interfiere de modo distinto de un silo á otro y aún de un punto a otro del mismo silo. Y así, a veces es la fermentación de alcohol la que domina el proceso, cuando la temperatura en el silo ha subido más de 50° C.; a veces, lo contrario, son las fermentaciones láctica y acética con inicio de fermentación butírica, las que prevalecen; y esto es lo que acontece cuando la elevación de temperatura en el silo, no sube a más de unos 10° C., sobre la temperatura ambiental.

Ahora bien, desde el punto relacionado con la alimentación del ganado, lo que interesa es saber cuáles son las modificaciones que experimentan, durante el proceso que sufre el forraje en las fermentaciones producidas por los ensilajes. Los tres grupos que se toman como base para el cálculo de las raciones son: MATERIAS PROTEICAS, MATERIAS HIDROCARBONADAS Y MATERIAS GRASAS.

MATERIAS PROTEICAS. Estas experimentan un cambio considerable debido principalmente a la acción de las diastasas proteolíticas sobre los albuminoides, que son transformadas en albuminosas, peptonas y amidas. Las albuminosas y peptonas son fácilmente digeribles, en cambio las amidas no son asimilables.

Cuando la temperatura en el silo no pasa de 30° a 40° C. parte de los materias protéicas bajo la acción de las enzimas se transforman en amidas, y ello implica por consiguiente una pérdida del coeficiente de digestibilidad de la proteína del forraje. Al contrario, cuando la temperatura sube a 50° a 55° C. predomina la formación de albuminosa y peptona, á expensas de las materias protéicas del forraje; y como dichos compuestos son muy asimilables, es aconsejable bajo este punto de vista, procurar que se llenen los requisitos necesarios para obtener esa elevación de temperatura en el silo.

MATERIAS HIDROCARBONADAS. Estas sustancias se hallan representadas principalmente en los forrajes, por azúcares, almidón y celulosa. -- Los azúcares desaparecen completamente en el proceso de fermentación en el ensilaje, dando origen al desprendimiento de gas carbónico.

A su vez los demás hidratos de carbono sufren alteraciones en su composición, con pérdida de peso debido al desprendimiento de gases. De tal manera que la disminución de peso de la substancia seca que experimenta el forraje ensilado, es debido en gran parte a la descomposición de estas substancias. En conjunto, la pérdida de materias hidrocarbonadas en el forraje ensilado, puede llegar al 40% de porcentaje de estas materias que acusa el análisis en el forraje verde.

MATERIAS GRASAS. La modificación sufrida por la acción de los fermentos sobre las materias grasas, no ha sido determinada con verdadera exactitud. Los análisis practicados en los forrajes ensilados que -- han sufrido la fermentación, en comparación de los análisis de los -- mismos en estado natural, acusan un aumento de materias grasas en -- los primeros; pero este aumento no es más que aparente y se debe a -- que en el análisis se usa para aislar las materias grasas, el éter; y este solvente, además de disolver dichas substancias grasas, di---suelve también los ácidos orgánicos tales como el ácido láctico, el ácido acético y el ácido butírico, que se originan a consecuencia de la fermentación.

EXPERIENCIAS COMPROBATORIAS REALIZADAS CON  
LAS DIFERENTES ENZIMAS.

1o.) CONSERVACION Y MANTENIMIENTO.

Para la conservación y mantenimiento de las enzimas, en estado de pureza, se comprobó que lo mejor es mantenerlos a la temperatura de 2°C. con todas las reglas de limpieza para evitar toda posible -- contaminación del medio ambiente.

2o.) EXAMEN MICROSCOPICO.

Las levaduras al examen microscópico en estado fresco, se presentan como elementos redondeados y ovalados, predominando los primros sobre los segundos; teniendo de diámetro de 20 a 40 micras.

3o.) REPRODUCCION.

La reproducción se verifica por esciparidad (división simple), siendo la temperatura más apropiada de 15°C a 30°C.

4o.) ACTIVIDAD.

El grado óptimo de actividad de las levaduras en condiciones apropiadas (medios nutritivos, temperatura, concentración iónica) corresponde a una temperatura de 15°C. a 16°C.

5o.) COLORABILIDAD.

Las levaduras se comportan frente al colorante compuesto de --- Gram como gram positivas y se colorean uniformemente.

6o.) EL SACCHAROMYCES CERVISIAE.

Es el que corrientemente se emplea en la fabricación de la cerveza (levadura alta), flota en el líquido fermentecible en reposo, -- formándose una capa superior impura y otra capa inferior de levadura pura, pudiendo permanecer en estas condiciones durante un lapso de -- 24 a 48 horas.

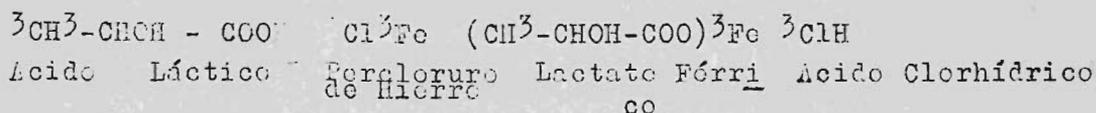
7o.) INVESTIGACION DE ACIDOS DE FERMENTACION EN EL CAFE.

a) Investigación del Acido Láctico:

Tomé 5 c.c. del líquido fermentecible; agregué 0.50 gr. de HCl N y extraje con 10 c.c. de Eter, invirtiendo la mezcla repetidas veces durante 5 minutos, decanté el éter por medio de una pipeta o embudo de separación y sobre este extracto ejecuté la reacción siguiente:

Agregué a éste 2 c.c. de agua destilada y 4 gotas de una solución de cloruro férrico al 2%; y agité. Si hay presencia de ácido -- láctico la mezcla adquiere una coloración amarillo según la reacción

siguiente:



El lactato de hierro formado se debe el color amarillo canario

b) Reacción de Uffelmann:

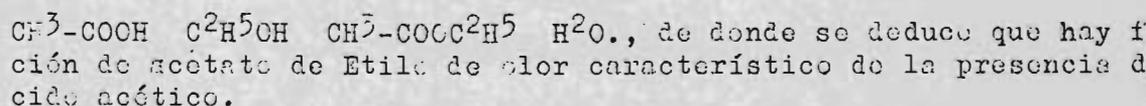
Llenamos un tubo de ensayo con agua destilada, agregamos 3 gotas de solución de percloruro de hierro al 10%, más unas gotas de agua fenolada, desarrollándose un color violeta. Divido en dos bes. A uno de ellos le agregué líquido de fermentación, en el cual observé después de la agitación que la coloración violeta desaparece desarrollándose el color amarillo canario característico de la presencia de ácido láctico, según la reacción química anterior, de donde deduje que en los líquidos fermentables hay formación de este ácido, debido a las transformaciones químicas que se verificaron en las fermentaciones.

INVESTIGACION DE ACIDO ACETICO.

Como es uno de los ácidos que se desarrollan en las fermentaciones lo investigué en la forma que a continuación detallo:

Técnica

En un tubo de ensayo se coloca el líquido de fermentación, más unas gotas de alcohol etílico y otras gotas de ácido sulfúrico que actúa como catalizador mineral, según la reacción siguiente:

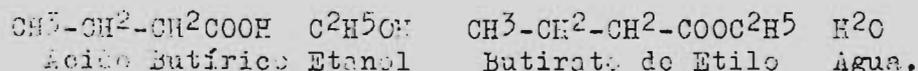


Acido Butírico

Como el ácido butírico es otro ácido que con frecuencia se presenta en todas las fermentaciones lo investigué de la manera siguiente:

En un tubo de ensayo coloqué la muestra fermentada de Café y banana.

Después agregué unas gotas de alcohol etílico, más un catalizador mineral ( $\text{SO}_4\text{H}_2$ ); después del calentamiento se desprendieron vapores característicos del ácido butírico en la reacción en que se produjo butirato de Etilo (olor a plátanos maduros), según la reacción siguiente:



## CONCLUSIONES

### INTERES DEL ESTUDIO DE LAS ENZIMAS O FERMENTOS EN LA ACTUALIDAD.

Un gran movimiento ha despertado hoy día el estudio de las enzimas ó fermentos, de tal manera que por eso he tenido el entusiasmo de desarrollar un trabajo de esta especie. En la conservación de los recursos naturales, ha tomado mucho incremento y la producción de los alimentos ha hecho que se encare el problema de la subsistencia humana desde el punto de vista biológico, debido a la forzada dependencia de éste con la tierra, por la peculiar manera de nutrición de los seres vivos.

El objeto de utilizar la acción enzimática o fermentecible que para muchos ha permanecido en el olvido, ha hecho que me interese en este estudio. Hay muchas industrias que se basan en esta acción; ejemplos de ello tenemos la fabricación de la cerveza, panificación, catetera, etc., las cuales, aprovechando la fermentación, constituyen un excelente aumento de producción alimenticia para el ser humano.

#### Las levaduras alimenticias.

Estos microorganismos son pseudo levaduras o falsas levaduras, representadas por microorganismos que son seres microscópicos, elementos que desempeñan un papel insustituible debido a sus propiedades bioquímicas. A estas levaduras pertenece el Torulopsis Utilis, de notables propiedades alimenticias empleadas en nuestro estudio. Su poder nutritivo se debe a la alta cantidad y calidad de las proteínas y vitaminas del complejo B.

Esta levadura tiene todos los aminoácidos esenciales bien balanceados y especialmente es rica en lysina, la cual es ordinariamente deficiente en las proteínas vegetales.

Los experimentos de nutrición infantil han demostrado que la inclusión de levadura en galletas y leches, produce un mayor aumento de peso del cuerpo. Más de la mitad del carbohidrato suplido se convierte en proteína y el resto en otras sustancias celulares; su eficiencia como convertidor de energía alimenticia, es muchas veces la de los vertebrados y su poder de producción de vitamina B es de 100 veces la de cualquier producto animal por caloría de alimento. Estas levaduras pues son el agente más eficaz para producir proteínas de carbohidratos y nitrógeno.

Además de su poder alimenticio, estas levaduras tienen la ventaja de propagarse industrialmente en mostos pobres en azúcares de 1% y fermentar pentosas. De allí su utilidad para aprovechar desperdicios agrícolas en la producción de alimento.

El organismo humano necesita de la acción de las enzimas, para la transformación química de los alimentos, que sólo bajo la función que dichas enzimas o fermentos ejercen sobre ellos, nos los hacen asimilables y nutritivos para el mantenimiento de las células.

Algunos fermentos se utilizan en terapéutica, tales como la pepsina, papaína, pancreatina y diastases, para favorecer la digestión y la asimilación de las materias albuminosas, hidratos de carbono y grasas. Otros son empleados particularmente en los laboratorios, para provocar reacciones o transformaciones particulares.

Entre los fermentos que los químicos pueden utilizar como reactivos tenemos que señalar los oxidantes y los hidratantes.

Aunque las oxidasas estén muy repartidas entre los seres vivos no se extraen más que de la goma arábiga y de algunos hongos. El enzima oxidante de la goma presenta cierta importancia para la preparación de los medicamentos, en razón de las incompatibilidades que pueden resultar actuando sobre los fenoles aminos, taninos etc. Pueden en efecto determinar cambios de coloración y precipitados.

Como fermentos hidratantes (Hidratasas) se emplea la invertina que permite descubrir el azúcar de caña, transformándola en azúcar invertida. Para obtener este fermento, usaremos la levadura alta (leudura de los panaderos), previamente lavada con agua esterilizada, jugada y puesta en contacto con ocho veces su peso de alcohol de 90° y desecada luego a una temperatura entre 30° y 40°. En el momento de uso, basta triturar 1 gramo del producto en 100 c.c. de agua saturada de timol.

B I B L I O G R A F I A

- CURSO DE QUIMICA BIOLOGICA..... V. Deulofeu t A. D. Marenz.  
QUIMICA FISIOLÓGICA PRACTICA..... Hawk Oser Summerson.  
QUIMICA FISIOLÓGICA..... S. Edlbacher.  
CURTIDO DE CUEROS..... Francisco José Vallejo.  
ABONOS ORGANICOS..... J. L. Rosales.  
LA OFICINA DE FARMACIA..... Dorvault.  
FERMENTOS..... José Giral Pereira.

P R O P O S I C I O N E S

VITAMINAS

TERAPEUTICA

POMADAS

FARMACIA GALENICA

TERMOMETROS

FISICA