ALGUNOS ASPECTOS METABOLICOS DE **SACCHAROMYCES CARBAJALI**

Por A. SANCHEZ-MARROQUIN, C. DEL RIO y CELSA CELIS, del Laboratorio de Microbiología Experimental. Escuela Nal. de Ciencias Biológicas (I. P. N.), México.

Siguiendo nuestro propósito de estudiar la microflora del pulque, después de los trabajos publicados desde 1946 a la fecha (27, 28, 29, 30, 31), presentamos ahora un estudio sobre el metabolismo de la levadura **Saccharomyces carbajali,** aislada del pulque por Ruiz Oronoz (26), indudablemente una de las levaduras más importantes de esa bebida, pues junto con otras (24), contribuye al valor nutritivo del mismo (23) debido a su contenido proteico (22) y vitamínico (21). Además, en la fermentación alcohólica que acontece durante la transformación del aguamiel en pulque, esta levadura desempeña un papel preponderante y casi exclusivo.

Aunque **S. carbajali** fué observado por Río de la Loza desde 1864 (20), estudiada por Barragán (2) en 1870, Carbajal (4) en 1901 y Guillermond (10) en 1917, no fué sino hasta 1938, que Ruiz Oronoz (26) realizó un estudio completo durante el cual clasificó dicha levadura dándole el nombre que actualmente tiene.

En la presente comunicación deseamos referirnos a un aspecto del metabolismo de **S. carbajali** para dilucidar la naturaleza de los productos de fermentación de la misma, las condiciones y características de dicha fermentación, y las posibilidades que pueda presentar para utilizarse en la obtención de etanol o de otros productos de su metabolismo.

MATERIALES Y METODOS

La cepa nos fué proporcionada gentilmente por el Dr. Ruiz Oronoz, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma.

Los medios empleados fueron los siguientes: mosto simple al 10%; mosto gelosado; medio de conservación N° 29 de Fred y Waksman (9), modificado de la manera siguiente: extracto de levadura, 10 g.; peptona, 10 g.; glucosa, 10 g.; agar, 20 g.; agua, 1000 ml.; medio basal de Lodder o medio 1 de Henrici (11) al cual se le suprimió el agar y se adicionó peptona, de manera que la composición del medio fué la siguiente: glucosa, 2%; peptona, 1%; fosfato monopotásico, 0.1%; sulfato de magnesio, 0.05%. Este medio se empleó para los siguientes estudios: asimilación de substancias nitrogenadas, asimilación de compuestos carbonados, asimilación heterotrófica del CO_2, determinación de la temperatura óptima para la fermentación, investigación del pH y de la concentración óptima de glucosa, identificación y cuanteo de los productos de fermentación.

Las melazas empleadas tuvieron una concentración inicial de 45° Brix, se diluyeron convenientemente y se adicionaron de 1% de sulfato de amonio.

Los ajustes de pH se practicaron adicionando sulfúrico y efectuando las lecturas en potenciómetro Coleman.

Preparación del inóculo. En un tubo de ensayo con 10 ml. de medio 1, o bien mosto diluído, se inoculó una asada de la cepa y se incubó a 37° durante 24 horas, al cabo de las cuales 0.1 ml. de esta suspensión en plena fermentación se llevó a un tubo similar con una cantidad igual del mismo medio y se incubó a la misma temperatura otras 24 horas. Por medio de estos dos pases en medio líquido, la levadura se activa y se encuentra en condiciones de fermentar los medios subsecuentes.

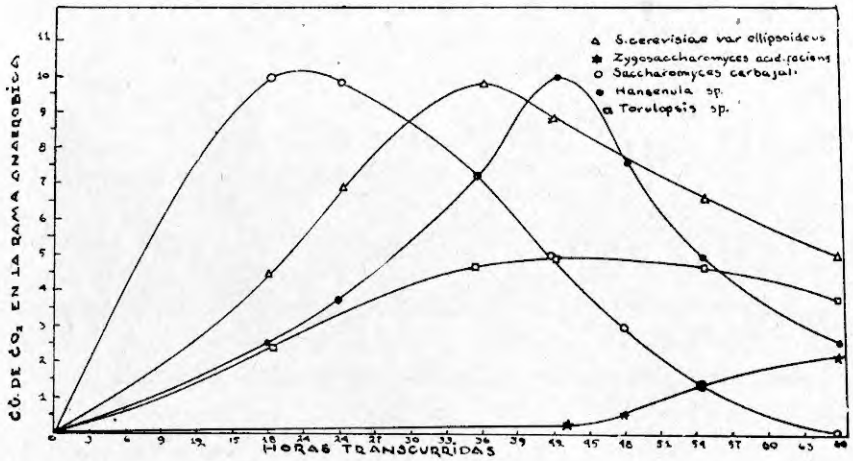
Fermentación de azúcares. Se emplearon tubos de Durham con medio 1, substituyendo la glucosa por el azúcar en estudio. Se sembraron 5 tubos con una gota de inóculo y dos sin el azúcar en estudio. Un tubo testigo permaneció sin inocular. Las lecturas se hicieron a las 48 horas para todos los azúcares, y, en los casos dudosos o negativos, se repitió el experimento haciéndose la lectura a los 8 días, como en el caso de la galactosa y la rafinosa. Se consideró positiva la presencia de gas, cuando más de la mitad de la campanita se había llenado, y se dió como positiva la presencia de ácido, siempre que la variación en los 5 tubos inoculados era de más de un grado en la escala de Sörensen, tomando como base el pH del medio no inoculado. La determinación de pH se hizo colorimétricamente empleando indicador universal. En el caso particular de la fermentación de la rafinosa, uilizamos el método de Skinner y Bouthilet (33).

Asimilación de substancias carbonadas. Las pruebas se efectuaron en 5 tubos de ensayo con medio 1 sin glucosa, al que se añadieron las diversas substancias problema en una concentración del 1%, con excepción de la gelatina que se añadió al 2%. El inóculo fué una gota de suspensión activa, y se incubó a 37°C durante 48 horas. La positividad de la prueba se determinó por comparación turbidimétrica con los testigos. Un aumento de la opacidad indicó desarrollo del germen o sea utilización de la substancia añadida. La prueba negativa mostró una ligerísima opacidad debido a la presencia de las células del inóculo.

Asimilación de substancias nitrogenadas. No seguimos el método auxanográfico de Beijerinck, porque, como lo hace notar Zimmermann (39), da resultados dudosos. Por esto empleamos el medio 1 libre de peptona, adicionando la substancia de prueba al 1%. Se prepararon tubos testigos sin fuente nitrogenada, testigos positivos con peptona, y tubos sin inóculo para prueba de esterilidad.

Las lecturas se efectuaron también por comparación turbidimétrica. El inóculo y las condiciones de cultivo fueron las mismas que para el experimento anterior.

Asimilación heterotrófica del anhídrido carbónico. Se emplearon dos series de 5 tubos de Smith con medio 1, los cuales se inocularon



Gráfica N° 1.—Producción y asimilación heterotrófica del anhídrido carbónico por **S. carbajali** y otras levaduras

con suspensión activa de la cepa y se incubaron a 30°C observando cada 12 horas la producción gaseosa. Cuando estuvo llena la rama anaeróbica, se substituyó el gas por anhídrido carbónico producido químicamente, con objeto de comprobar si es precisamente este gas el que fija la levadura.

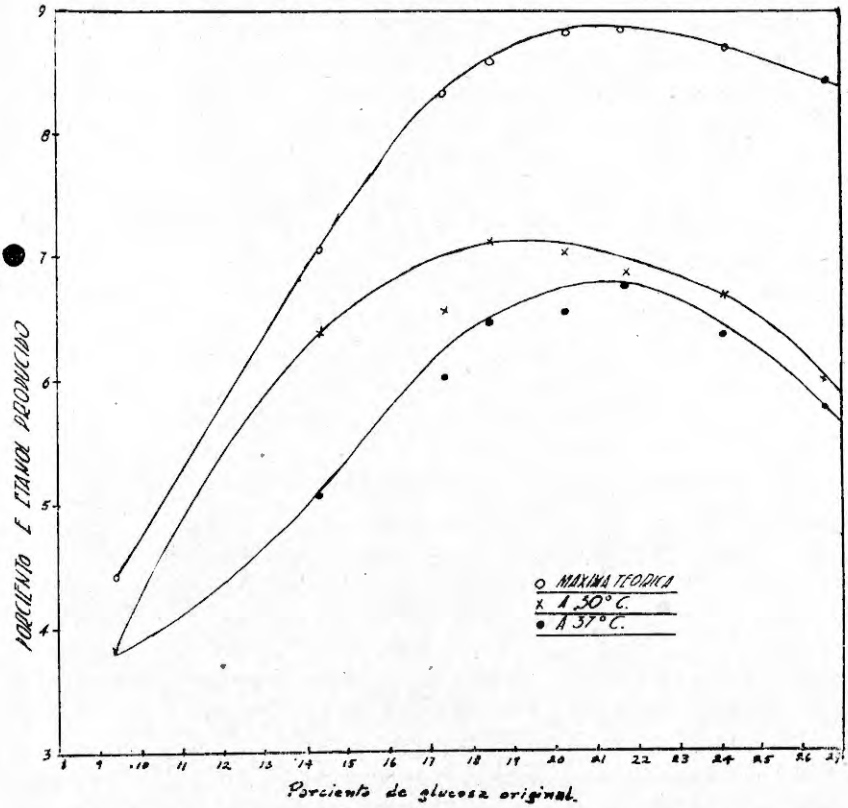
Se efectuó además un estudio comparativo de la actividad de ésta y otras levaduras para fijar el gas carbónico, empleándose 10 tubos de Smith con medio 1 e inoculando cada par de ellos con cada una de las siguienes cepas: **Saccharomyces carbajali, Zygosaccharomyces acidifaciens, Torulopsis** sp., **Hansenula** sp. y **Saccharomyces cerevisiae** var. **ellipsoideus.** Se incubaron a 30°C durante 72 horas anotando la altura de la columna líquida, o sea la cantidad de gas presente, cada 6 horas. Con este procedimiento se obtiene una serie de datos que indican: la velocidad de fermentación de la levadura en comparación con otras levaduras, y la velocidad de fijación del anhídrido carbónico producido, en comparación con las mismas levaduras.

Temperatura óptima de fermentación. Empleando medio 1 se llenaron 5 tubos de Smith para cada una de las temperaturas estudiadas. Se inoculó con 0.1 ml. de suspensión activa a cada tubo. El medio 1 se preparó de una sola vez, para que las pequeñas variaciones que hubiesen ocurrido durante su elaboración no afectaran las condiciones de la experimentación. Las pruebas se efectuaron a 16, 20, 22, 28, 30, 32, 37 y 40°C, haciendo las lecturas cada dos horas. La prueba se consideró positiva cuando 3 de los 5 tubos de Smith presentaban cuando menos 1/10 del volumen de la rama anaeróbica de gas.

pH óptimo de fermentación. Utilizando tubos de Smith con el mismo medio, se ajustaron diez valores de pH, desde 3.0 hasta 7.5, empleando soluciones de fosfato monopotásico, fosfato disódico y ácido fosfórico para los valores más bajos. Se prepararon series de 5 tubos ajustando los valores de pH con el comparador de Hellige y usando los indicadores apropiados. Se inocularon con 0.1 ml. de suspensión activa y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Las lecturas se hicieron dando como positivo aquel tubo que tuviera cuando menos 1/10 del volumen de la rama anaeróbica lleno de gas.

Concentración óptima de glucosa. Se emplearon matraces Erlenmeyer de 125 ml. con 110 ml. de medio 1, conteniendo cantidades variables de glucosa. Se ensayaron 8 concentraciones diferentes, con dos matraces para cada una de ellas, efectuando el cuanteo de la glucosa inicial y final de acuerdo con el procedimiento yodomé-

trico de Underkofler et al. (35). Se prepararon dos series de matraces conteniendo soluciones al 10, 15, 18, 20, 22, 5, 25, 27 y 30% de glucosa antes de esterilizar. Se inocularon con 1 ml. de la suspensión activa, incubando una serie a 30°C y la otra a 37°C, procediendo a cuantificar el etanol producido, de acuerdo con el procedimiento picnométrico de la A.O.A.C. (1), al cabo de 8 días de incubación.



Gráfica Nº 2.—Producción de etanol por **Saccharomyces carbajali**, y determinación de la concentración óptima de glucosa

Fermentación de mieles incristalizables. Las mieles se ajustaron por dilución a una concentración de sacarosa de 12, 15 y 18° Brix, y se fermentaron en Erlenmeyer de 125 ml. con **S. carbajali** a 28; 30 y 32°C, variando además el pH de 4.03 a 5.06 como se indica en los resultados.

Utilización de harinas. Para el estudio de la utilización de harinas en la obtención de alcohol por fermentación con **S. carbajali**, se pro-

cedió como sigue: las harinas de maíz y de arroz se diluyeron con agua en una proporción del 10%, para hidrolizarlas posteriormente mediante maceración por espacio de 2 a 3 horas y luego al autoclave durante 1½ horas a 1.5 atmósferas. El producto gelatinizado se trató con ácido sulfúrico al 1% y se esterilizó en Arnold hasta conseguir la destrucción del gel. La hidrólisis continuó en el autoclave hasta que la prueba del lugol resultó negativa. Se separaron los residuos celulósicos por medio de tamices y finalmente por papel de filtro. Los mostos se concentraron por calentamiento, para aumentar la concentración de azúcar y continuar la hidrólisis de la maltosa. Posteriormente los mostos se neutralizaron con carbonato de calcio en exceso, filtrando y ajustando el pH a 4.5. La concentración de azúcares empleada fué la de 18° Brix, por haberse encontrado que ésta era la óptima. El mosto se esterilizó y se inoculó luego con una suspensión activa de la levadura en mosto diluído, empleándose 1% de inóculo. Se incubó a 28°C y al cabo de 48 horas se determinó el etanol producido. A las 96 horas se hizo otra estimación de etanol y de azúcares residuales. En este caso los reductores se estimaron según una modificación del método de Hagedorn-Jensen a base de ferricianuro en una reacción yodométrica, leyendo las titulaciones de tiosulfato en las tablas de Browne y Zerban (3).

Identificación de los productos de fermentación. Se emplearon matraces de 125 ml. con medio 1, inoculados con 1 ml. de suspensión activa, y se incubaron a 30°C. Se hicieron investigaciones cualitativas de los productos de fermentación, en el siguiente orden: productos neutros volátiles, ácidos volátiles, productos neutros fijos, ácidos fijos y gases.

El etanol se identificó mediante las siguientes pruebas: reacción del yodoformo, reacción de Dragendorff según Feigl (7) y reacción del acetaldehido (12).

El acetaldehido se apreció por la reacción de Schiff, la acetona por la reacción de Legal, el alcohol amílico por la reacción de Rocques y el ácido fórmico por la de Eegriwe. Todas estas reacciones según Feigl (7). El ácido acético por las pruebas de la acetona y de Krüger-Tschirch (17); el ácido propiánico por la reacción de Klein (12); el glicerol por la prueba de la acroleína; el acetilmetilcarbinol se identificó por la reacción de Voges-Proskauer, según el procedimiento de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos (5) modificado por Werkman (36), y por la reacción de Lemoigne (13); el ácido láctico se identificá por su reacción con el parahidroxi-difenilo (7); el ácido succínico por la reacción de Neuberg (12); el CO_2 por sus reacciones con el

hidróxido de bario y con el carbonato de sodio y fenolftaleína (8); el hidrógeno por un procedimiento análogo al recomendado por Peterson y Johnson (19).

Análisis cuantitativo de los productos de fermentación. Los azúcares reductores se estimaron por el método de Underkofler et al. (35). El etanol, el alcohol amílico y el ácido acético, se determinaron por los métodos recomendados por la A.O.A.C. (1). El glicerol se cuantificó por el método de Malaprade (16). El ácido succínico se estimó tomando una alícuota del medio concentrado que se empleó para la determinación del glicerol, y titulando con NaOH N/10 en presencia de fenolftaleína, corrigiendo las lecturas según la acidez inicial del medio; los resultados obtenidos se dividieron entre dos para relacionarlos a medio sin concentrar. Para la cuantificación del CO_2 se improvisó un dispositivo basado en una idea de Peterson y Johnson (19), fijando el CO_2 sobre NaOH 4N mediante burbujeo a razón de una burbuja por segundo durante media hora. Se tituló una alícuota del hidróxido, determinando álcali libre de acuerdo con el procedimiento de Winkler (38), usando un exceso de cloruro de bario. La diferencia de álcali libre entre el hidróxido original y el que ha recibido el gas producido en la fermentación, indica el álcali neutralizado y permite calcular el CO_2 desprendido.

Además de estas determinaciones se estimó furfural en el alcohol obtenido de melazas. La identificación se hizo por condensación del furfuraldehido con la anilina en medio acético (12), y la cuantificación por el procedimiento de la A.O.A.C. (1).

RESULTADOS

Los resultados de las pruebas de fermentación de azúcares y asimilación de substancias hidrocarbonadas y nitrogenadas por **S. carbajali** concordaron con los obtenidos por Ruiz Oronoz (26), es decir, la levadura fermenta los siguientes azúcares: glucosa, fructosa, manosa, sacarosa y rafinosa; no fermenta la arabinosa, xilosa, ramnosa, galactosa, maltosa, lactosa, melibiosa, almidón, inulina, dextrina y esculina, ni los alcoholes: manitol, dulcitol y sorbitol. De las substancias carbonadas sólo asimila la glucosa y el CO_2. No asimila el glicerol, etanol, ácido cítrico, citrato de sodio, tartrato de sodio y etanol. Respecto a las substancias nitrogenadas, no asimila el sulfato de amonio, nitrato de potasio, caseinato de sodio y tartrato de amonio, pero sí la peptona, extracto de levaduras, asparagina, urea y gelatina.

La asimilación heterotrófica del CO_2 por **S. carbajali** comparada con la de otras 4 especies de levaduras, se muestra en la gráfica 1, en donde puede verse que la primera fué la más activa por lo que respecta a velocidad de fermentación y a la fijación del CO_2. La levadura fijó todo el gas producido por ella misma durante la fermentación.

La temperatura óptima de fermentación correspondió a 30°C como lo demuestra la tabla 1, tomando como base aquella temperatura en que la levadura necesita un tiempo mínimo para producir determinada cantidad de gas. A 40°C, además de no observarse producción de gas ni al cabo de 48 horas, se notó la falta absoluta de desarrollo celular.

En la tabla 2 se expresa el pH óptimo de fermentación, correspondiendo, aunque no de una manera muy precisa, a 4.5.

En la gráfica 2 se muestran las curvas de producción de etanol a dos temperaturas diferentes, comparadas con la curva teórica de la máxima cantidad de alcohol que podría producirse si todo el azúcar consumido se transformara en etanol, de acuerdo con la ecuación de Lavoisier para la fermentación alcohólica. El mayor rendimiento alcohólico se obtuvo con una concentración de glucosa vecina al 18%.

Los resultados del análisis cualitativo de los productos de fermentación se presentan en la tabla 3. Durante cada prueba se emplearon substancias q.p. como testigos positivos, y un cultivo de 72 horas en medio adecuado de A. **aerogenes** para el caso particular de la acetoína. Se utilizó agua destilada como testigo negativo, y en algunos casos el medio 1 sin fermentar, como por ejemplo en la reacción de Neuberg, donde podía presumirse que la peptona pudiera ser la causa de la formación de pirrol.

La cuantificación de los productos de fermentación se consigna en la tabla 4 incluyendo los balances de carbono y de óxido-reducción. Las cifras indican el promedio de 3 determinaciones. Como se ve, la levadura produjo un rendimiento alcohólico de 84.78 g. por 100 ml. de medio fermentado.

Al efectuar pruebas de fermentación con **S. carbajali** empleando melazas, harina de arroz y harina de maíz, se obtuvieron los resultados que aparecen en las tablas 5, 6 y 7 respectivamente. Para la fermentación de melazas se siguieron 3 temperaturas (28, 30 y 32°C), variando además el pH y la concentración de sacarosa. La cantidad máxima de etanol (6.8-7.0) se obtuvo en las siguientes condiciones: pH de 4.5, temperatura de 28°C y concentración de sacarosa de

18° Brix. El furfural producido en estas condiciones fué de 7 mg. por litro del destilado obtenido, partiendo de una cantidad igual de medio fermentado.

En la fermentación de la harina de arroz se obtuvo un por ciento de rendimiento alcohólico de 79.19, en tanto que en la harina de maíz esta cifra correspondió a 84.03.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran que la levadura en cuestión fermenta los epímeros de la glucosa y directamente la sacarosa. Esta particularidad es una prueba microbiológica que contribuye a demostrar la identidad ya establecida por procedimientos químicos (20, 34, 6, 14 y 15) entre la sacarosa y el azúcar de moguey, que Michaud y Tristán denominaron "agavosa" (18).

Entre los trisacáridos, fermentó la rafinosa, aunque sólo actúa sobre un tercio de este azúcar, es decir, sobre la parte fructósica de la molécula, pues no es capaz de fermentar la melibiosa que constituye las otras dos terceras partes restantes.

No asimila el glicerol ni la gelatina, empleando estas substancias en el experimento como únicas fuentes de carbono, y sólo oxida el etanol produciendo un marcado descenso en el pH, aunque aparentemente no puede asimilar esta substancia en la construcción de su propio material.

De las substancias nitrogenadas, la peptona, el extracto de levaduras, la gelatina, la asparagina y la urea fueron utilizadas directamente sin adición de factores de crecimiento.

No fueron asimilados el nitrato de potasio ni el sulfato de amonio. Respecto a esto, Wickerham (37) sostiene que levaduras que aparentemente son incapaces de asimilar esas substancias nitrogenadas, las asimilan si se les añade una dosis adecuada de factores de crecimiento en forma de vitaminas puras.

Esta levadura mostró la fijación del anhídrido carbónico, poco después de iniciada la fermentación. Este fenómeno se apreció accidentalmente al observar que en los tubos de Smith, al aumento sucesiva del volumen de gas producido durante la fermentación, seguía una disminución del mismo y el medio llenaba nuevamente la rama anaeróbica.

Se estudió la naturaleza del gas producido, comprobándose plenamente que se trata del CO_2, pues se obtuvo la misma fijación al

colocar anhídrido carbónico preparado químicamente. A este respecto no es una novedad que gérmenes heterotróficos asimilen directamente el CO_2, por un proceso químico endergónico no fotosintético. En este sentido ya nos hemos referido (32) al estado actual de tales estudios.

El pH que mostró mejores resultados, por lo que respecta a una fermentación más rápida, o sea con menos fase estacionaria, fué el de 4.5, que es más o menos el que se encuentra en el pulque cuando se inicia la fermentación alcohólica. Originalmente el aguamiel posee una reacción ligeramente alcalina, que generalmente oscila alrededor de 7.4 (15) y que posiblemente se deba a los fosfatos alcalinos que contiene, por lo que se desarrollan preferentemente gran cantidad de bacterias, como lo demuestra el hecho de que existan de 800,000 a 1½ millones por milímetro cúbico, por sólo 3 a 6 mil levaduras (25) Estas bacterias, entre las cuales se encuentran muchas productoras de ácido, por ejemplo: **Lactobacillus, Streptococcus, Termobacterium, Leuconostoc,** etc., se desarrollan en el aguamiel, originando un descenso en el pH, debido principalmente a la producción de los ácidos acético y láctico. En este nuevo medio sí se desarrollan bien las levaduras, y por eso al terminar la fermentación el número de ellas ha aumentado hasta 300,000 por milímetro cúbico, siendo en cambio el número de bacterias cercano a 100,000 (25).

De las diferentes concentraciones de glucosa estudiadas, se observó que la más conveniente por lo que respecta a utilización de azúcar es la de 21.6%, aunque no corresponde al rendimiento máximo de etanol. Este se obtiene a una concentración del 18.4%; aparentemente esta es la concentración más conveniente con miras industriales, sólo que conviene considerar también la duración del proceso fermentativo, pues con concentraciones mayores se retarda en proporción no conveniente para la producción industrial.

Los productos de fermentación identificados, demuestran que la levadura efectúa una fermentación de acuerdo con el primer esquema de Neuberg, y los productos formados se encuentran de acuerdo con el esquema, pues también cuantitativamente responden a esta suposición.

Los balances de fermentación indican que la mayor parte (90.23%) de la glucosa utilizada corresponde a un 91.7% de la original. De esto se calcula que se obtiene 82.74% de la glucosa original del medio, en forma de productos de fermentación.

Industrialmente, la levadura podría utilizarse en procesos de fermentación alcohólica a base de mieles incristalizables (melazas), en las cuales produce rendimientos convenientes sobre todo si se coloca dentro de las condiciones de pH = 4.5, concentración de sacarosa de 18° Brix, temperatura de 28°C y adición de 1% de sulfato de amonio.

Igualmente puede emplearse en la fermentación de harinas hidrolizadas de maíz y de arroz, en donde los rendimientos alcanzados fueron satisfactorios.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se presenta un estudio bioquímico de **Saccharomyces carbajali,** levadura de fondo, factor importante en la transformación del aguamiel en pulque.

Este microorganismo mostró una actividad fermentativa notable, por lo que respecta a su breve fase estacionaria, siendo capaz de fermenar la sacarosa sin previa hidrólisis, así como la glucosa, sus epímeros y un tercio de la rafinosa.

La cepa presentó una actividad inusitada en la fijación heterotrófica del CO_2, y poder restringido en la asimilación de diversas substancias como fuentes de nitrógeno.

Se determinaron las condiciones óptimas de fermentación, resultando éstas: pH de 4.5, temperatura 28°C y concentración de sacarosa 18° Brix.

Se hizo un estudio sistemático de los productos de la fermentación, investigando los compuestos orgánicos presentes en las fracciones siguientes: productos neutros volátiles, ácidos volátiles, productos neutros fijos y gases. Se caracterizaron y cuantearon etanol, 7.19%; alcohol amílico, huellas no cuantificables; ácido acético, 0.38%; glicerol, 0.42%; ácido succínico, 0.14%, y CO_2, 7.12% en medio glucosado al 18%.

En la fermentación de melazas los rendimientos alcohólicos máximos en 48 horas llegaron a un 7.04%, cuanteándose además el furfural en el alcohol producido, habiéndose obtenido una concentración de 7 mg. por litro, correspondiendo a 1000 ml. de medio fermentado con una concentración inicial de 18° Brix.

Empleando harinas hidrolizadas de arroz y maíz se obtuvieron como rendimientos máximos de etanol las cifras de 6.41 y 5.88% respectivamente, en 48 horas.

Se sugiere la posibilidad de utilizar la levadura **S. carbajali** en la industria de la fermentación alcohólica.

SUMMARY

Some metabolic aspects of **Saccharomyces carbajali** (a bottom yeast isolated from "pulque") are discussed in this paper.

It showed a remarkable fermentative activity regarding its short estacionary phase, being able to ferment sucrose without previous hydrolisis, so as dextrose, its epimers and one third of rafinose.

The heterotrofic CO_2 fixation was very active, but not the assimilation of several substances as nitrogen sources.

The optimal conditions for fermentation were: pH 4.5; temperature, 28°C; sugar concentration, 18° Brix.

The main metabolic products in the fermentation of a 18% glucose broth were: etanol 7.19%; acetic acid 0.38%; glycerol 0.42%; succinic acid 0.14%; CO_2 7.12% and traces of amylic alcohol.

The alcoholic yield in the fermentation of molasses was 7.04% in 48 hours, whereas the yield on hydrolized rice and corn mashes was 6.41 and 5.88% respectively, in the same period of time.

TABLA 1

Determinación de la temperatura óptima de fermentación de **S. carbajali**

Temperatura (grados C)	Producción de CO_2 (horas)	
	Inicial	Final
16	42	48
20	36	38
22	24	28
28	8	12
30	8	8
32	8	10
37	10	12
40	—	—

TABLA 2

Influencia del pH en la fermentación

pH	Intensidad de la Fermentación.					pH	Intensidad de la Fermentación.				
3.0	≠	≠	≠	≠	—	5.5	≠	≠	≠	—	—
3.5	≠	≠	≠	≠	—	6.0	≠	≠	≠	≠	—
4.0	≠	≠	≠	≠	—	6.5	≠	≠	≠	≠	—
4.5	≠	≠	≠	≠	≠	7.0	≠	—	—	—	—
5.0	≠	≠	≠	≠	—	7.5	—	—	—	—	—

TABLA 3

Identificación de los Productos de Fermentación

Pruebas positivas:	Pruebas negativas:
etanol	acetaldehido
alcohol amílico	acetona
ácido acético	ácido fórmico
glicerol	ácido propiónico
ácido succínico	acetoína
anhídrido carbónico	ácido láctico
	hidrógeno

TABLA 4

Análisis cuantitativo de los Productos de Fermentación

Substancia	Gramos en 100 ml. de medio fermentado.
Reductores iniciales	18.1
Reductores residuales	1.5
Azúcares utilizados	16.6
Rendimiento teórico máximo de etanol	8.48
Etanol producido	7.19
Rendimiento	84.78
Alcoholes superiores	huellas
Acido acético	0.38
Glicerol	0.42
Acido succínico	0.14
Anhídrido carbónico	7.12
Recuperación de C	90.23%
Balance de óxido-reducción	0.995

TABLA 5

Fermentaciones con Mieles Incristalizables

Exp.	Series	Conc. sacarosa en °Brix	Temp. en grados C.	pH del medio	% alcohólico producido
A	1	15	30	4.03	5.51
A	2	15	30	4.54	5.88
A	3	15	30	5.06	5.73
B	4	15	28	4.50	6.11
B	5	15	30	4.50	5.66
B	6	15	32	4.50	5.06
C	7	12	28	4.50	5.13
C	8	15	28	4.50	6.18
C	9	18	28	4.50	6.88
D	10	18	28	4.50	6.80
D	11	18	28	4.50	6.41
D	12	18	28	4.50	7.04

3 Erlenmeyer para cada serie. Las cifras representan el promedio de 3 determinaciones. Lo mismo se aplica a las tablas 6 y 7.

TABLA 6

Fermentación de la Harina de Arroz.

Experiencia	Azúcares residuales g %	Azúcares utilizados g %	Cantidad teórica máxima de etanol	Etanol a las 48 horas	Etanol a las 96 hs.
1	1.10	16.14	8.24	6.41	6.96
2	2.04	15.20	7.76	5.96	6.34
3	1.73	15.51	7.92	6.41	7.12

Azúcares reductores iniciales.....17.24%
Porciento de rendimiento 79.19

TABLA 7

Fermentación de la Harina de Maíz

Experiencia	Azúcares residuales g %	Azúcares utilizados g %	Cantidad teórica máxima de etanol	Etanol a las 48 horas	Etanol a las 96 hs.
1	1.41	14.97	7.67	5.21	6.49
2	1.26	15.12	7.72	5.06	6.73
3	0.15	16.23	8.29	5.88	6.80

Azúcares reductores iniciales.....16.38%
Porciento de rendimiento 84.03

BIBLIOGRAFIA

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1940.—Official and Tentative Methods of Analysis. A.O.A.C. Pub. Washington.
2. BARRAGAN, J., 1870.—El Cryptococcus del pulque. La Naturaleza. 1ª Serie (México), **1:** 228-233.
3. BROWNE, C. A. y F. W. ZERBAN., 1941.—Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis. 3ª Ed. John Wiley and Sons. Inc., Nueva York.
4. CARBAJAL, A. I., 1901.—Estudio sobre el pulque considerado principalmente desde el punto de vista zimotécnico Of. Tip. Sría. Fomento (México).
5. COMMITEE ON BACTERIOLOGICAL TECHNIC OF THE SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. 1942.—Manual of Methods of Pure Culture Study of Bacteria. Biotech. Pub., **5:** 19.
6. CORDERO, M., 1917.—Prolegómenos para el estudio analítico del **Agave.** Bol. Dir. Est. Biol. (México), **2:** 235-240.
7. FEIGL, F., 1939.—Qualitative Analysis by Spot Tests. Nordemann Pub. Co. New York.
8. FEIGL, F., 1943.—Laboratory Manual of Spot Tests. Academic Press Inc. Nueva York.
9. FRED, E. B. y S. A. WAKSMAN, 1928.—Laboratory Manual of General Microbiology. Mc. Graw Hill Co. Nueva York.
10. GUILLIERMOND, A., 1917.—Levaduras del pulque. Bol. Dir. Est. Biol. (México), **2:** 22-28.
11. HENRICI, A. T., 1941.—The Yeasts. Bact. Reviews, **5:** 133.
12. HUNTRESS, E. H. y S. P. MULLIKEN, 1941.—Identification of Pure Organic Compounds. J. Wiley and Sons, Inc. Nueva York.
13. LEMOIGNE, M., 1920.—Reaction specifique du 2,3 butylenegilycol et de l'acetyl-

methylcarbinol produits de la fermentation butylene glycolique. C. R. Acad. Sci. (París), **170:** 131-32.
14. MADINAVEITIA, A. y F. OROZCO D., 1940.—Contribución a la bioquímica del **Agave**. An. Inst. Biol. (México), **11:** 373-382.
15. MADINAVEITIA, A. y F. OROZCO. D., 1942.—Estudio Químico del **Agave.** Eight Am. Scient. Congress (Phys. And. Chem. Sci.) Proc., **7:** 177-184.
16. MALAPRADE, M. L., 1937.—Note sur le dosage acidimetrique de la glycerine (et de l'erythrite), au moyen des periodates. Mem. presentés a la Soc. Chim. 5me Ser. R **4:** 906-910.
17. MEYER ,H., 1933.—Nachweiss und Bestimmung organischer verbidungen. Verlag von Julius Springer. Berlín (Photolithoprint reproduction by Edwards brothers, Inc. Ann Arbor, Mich. 1943).
18. MICHAUD, G. y J. F. TRISTAN, 1892.—Researches on the Sugar of the **Agave** americana. Am. Chem. Jour., **14:** 548-550.
19. PETERSON, W. H. y M. J. JHONSON, 1941.—Laboratory Experiments in Fermentation Biochemistry. University of Wisconsin. (Mimeógrafo.)
20. RIO DE LA LOZA, L., 1864.—Apuntes sobre algunos productos del maguey. Bol. Soc. Geog. y Estad. (México), **10:** 531-539.
21. ROCA, J. y R. LLAMAS, 1938.—Las vitaminas del pulque. An. Inst. Biol., (México), **9:** 81-84.
22. ROCA, J. y R. LLAMAS, 1939.—El nitrógeno del pulque. An. Inst. Biol., (México), **10:** 29-32.
23. ROCA, J. y R. LLAMAS, 1940.—Consideraciones sobre el valor alimenticio del pulque. An. Inst. Biol., (México), **11:** 363-371.
24. ROMO, A. J., 1945.—Estudio químico de las bebidas fermentadas obtenidas del maguey **(Agave)** Bol. Inst. Quím., (México), **1:** 67-74.
25. RUIZ ORONOZ, M., 1936.—Nota acerca de la microbiología del aguamiel y del pulque. An. Inst. Biol., (Méxioc), **7:** 251-258.
26. RUIZ ORONOZ, M., 1938.—Contribución al conocimiento de las levaduras del aguamiel y del pulque I.—**Saccharomyces carbajali.** An. Inst. Biol., (México), **9:** 49-80.
27. SANCHEZ MARROQUIN, A. y C. WILD., 1946.—Estudios sobre la microbiología del pulque. I.—Características morfológicas y bioquímicas de **Lactobacillus** sp.. Ciencia (México), **7:** 207-214.
28. SANCHEZ-MARROQUIN, A., 1948.—Estudios sobre la microbiología del pulque. II.—Utilización de **Lactobacillus** sp. en la fermentación láctica del aguamiel hidrolizada. An. Esc. Nal. C. Biol., (México), **5** (1-2): 13-18.
29. SANCHEZ-MARROQUIN, A. y L. ARCINIEGA., 1948.—Estudios sobre la microbiología del pulque. III.—Actividad dextrinogénica de **Leuconostoc** aislados del aguamiel. An. Esc. Nal. C. Biol., (México) **5** (1-2): 19-27.
30. SANCHEZ-MARROQUIN, A. y H. RODRIGUEZ, 1948.—Estudios sobre la microbiología del pulque. IV.—Comportamiento serológico de dos dextrinas de Leuconostoc. An. Esc. Nal. C. Biol., (México), **5** (1-2): 29-37.
31. SANCHEZ-MARROQUIN, A., 1949.—Nuevos datos acerca de la microbiología del pulque. Mem. Acad. Nal. de Ciencias, (México), (En prensa).
32. SANCHEZ-MARROQUIN, A., 1949.—Metabolismo auto y heterotrófico de los microorganismos. Soc. Mex. Hist. Nat., Vol. X, Nº 2. (En prensa).
33. SKINNER, C. E. y R. BOUTHILET, 1947.—Melibiose broth for classifying yeasts. Jour. Bact., **53:** 37-43.
34. STONE, W. E. y D. LOTZ, 1895.—The sugar of the **Agave americana.** Am. Chem. Jour., **17:** 368-371.
35. UNDERKOFLER, L. A., J. F. GUYMON, M. M. RAYMAN y E. I. FULMER, 1943.—A semimicro method for the determination of reducing sugars in fermentation media. Iowa St. Coll. Jour. of. Sci., **17** (2): 251-256.
36. WERKMAN, C. H., 1930.—An improved technic for the Voges-Proskauer test. Jour. Bact., **20:** 121-125.
37. WICKERHAM, L. J., 1946.—A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. Jour. Bact., **52:** 293-301.
38. WINKLER, C. Citado por: TREADWELL F. P. y W. T. HALL, 1942.—Analytical Chemistry. Vol. II. Quantitative. John Wiley and Sons., Nueva York.
39. ZIMERMANN, J. G., 1938.—Citado por: A. T. HENRICI. (11.)