

## Utilización del afrecho enmohecido en la fermentación alcohólica del maíz (\*)

POR EL

ING. AGR. S. SORIANO Y EL DR. R. E. TRUCCO (\*\*)

---

### ANTECEDENTES

Takamine sugirió en 1913 <sup>(1)</sup> la posibilidad de emplear preparados enzimáticos obtenidos cultivando *Aspergillus oryzae* sobre diversos materiales, entre los cuales el afrecho, para reemplazar a la malta como agente sacarificante del almidón, utilizada, como se sabe, en la industria de la elaboración del alcohol etílico por fermentación, en la destilería de granos. Sin embargo, debido a que el alcohol obtenido empleando estos preparados tiene olor y sabor desagradables, que lo hacen inadecuado para su empleo en la preparación de bebidas, este método no tuvo en un principio mayor difusión.

En 1933, tres investigadores norteamericanos, Underkofler, Fulmer y Schoene <sup>(2)</sup>, ante la gran demanda de alcohol industrial motivada por la guerra, pensaron en la posibilidad de utilizar esos preparados como agente sacarificante. Después de una serie de ensayos, cultivando *Aspergillus oryzae* sobre afrecho humedecido con solución de ácido clorhídrico 0,3 N, en tambor rotatorio, lograron obtener un preparado enzimático que, empleado en la proporción de la malta, permitía conseguir rendimientos de alcohol que alcanzaban, en algunos casos, al 92 % del teórico, en vez del 80 % que se admite, generalmente, como satisfactorio para la malta.

(\*) Trabajo realizado en los laboratorios de la Sección Microbiología del Instituto Nacional de la Nutrición y en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires. Presentado a las reuniones científicas de la Soc. Arg. de Agronomía el 28 de Agosto de 1946.

(\*\*) Profesor de Microbiología Agrícola en la Facultad de Agronomía y Veterinaria y Auxiliar de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Microbiología en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires, respectivamente.

Posteriormente, en 1943, Hao, Fulmer y Underkofler<sup>(3)</sup>, utilizando el mismo hongo, pero empleando un sistema de cultivo estático, por aereación de la masa, lograron obtener preparados enzimáticos que, usados en menor proporción del 10 % permitieron alcanzar rendimientos que llegaron hasta el 95 % del teórico. Estos investigadores señalan la ventaja económica que significa el reemplazo de la malta por tales preparados.

#### PREPARACION DEL AFRECHO ENMOHECIDO

El afrecho enmohecido utilizado en las experiencias realizadas durante la ejecución de este trabajo, fué preparado empleando cultivos de *Aspergillus oryzae* que previamente habían sido probados con respecto a su capacidad de sacarificación del almidón, y que se hicieron desarrollar desde el momento de la siembra, en forma de esporas, hasta el momento anterior a la nueva esporulación, usando en los distintos preparados los dispositivos que se detallan a continuación:

a) *Cultivo en tambor rotatorio*: Se empleó como tambor rotatorio un frasco de vidrio de 6 litros de capacidad, que mediante un dispositivo adecuado podía hacerse girar a pocas vueltas por minuto e introducirse en el mismo aire húmedo y esterilizado.

En el frasco se colocaron 500 g de afrecho humedecido con 500 cc de solución de ácido clorhídrico 0,3 N y se esterilizó a 1 atmósfera durante 1 hora. El contenido del frasco fué inoculado con 2 % de un cultivo de *Aspergillus oryzae* en afrecho. Después de la inoculación se hizo girar el frasco en forma intermitente durante 20 minutos cada 2 horas; después de las 24 horas fué girado en forma continua durante unas 34 horas, permaneciendo siempre a temperatura ambiente. Al cabo de las 56 horas el material estaba esporulado. El afrecho enmohecido se retiró del frasco y se puso a secar a temperatura ambiente.

b) *Cultivo en recipiente cerrado, con circulación de aire, incubado a 25°C*: Se empleó un desecador, colocado en posición invertida, se sujetó a la tapa una gasa doble y por el tapón de la misma se hicieron pasar dos tubos de vidrio, uno corto de entrada y otro de salida que llegaba hasta el fondo del recipiente, para la circulación del aire. La tapa se fijó al cuerpo del desecador por medio de plastilina. El desecador se llenó, dejando una pequeña cámara de aire en la parte superior, con afrecho tratado en la forma anteriormente especificada e inoculado con 5 % de cultivo, se colocó en la estufa a 25°C y se incubó durante 42 horas, aireando constantemente la masa. Al cabo de ese tiempo se abrió el desecador, observándose que el afrecho estaba completamente cubierto por el hongo esporulado en la zona periférica, con abundante desarrollo sin esporulación en la parte intermedia, mientras que en la zona central no se observaba desarrollo alguno. El contenido se mezcló bien y se puso a secar a temperatura ambiente.

c) *Cultivo en recipiente cerrado con circulación de aire incubado a temperatura ambiente*: El recipiente empleado fué un frasco de vidrio de boca ancha, con tapa común de lata, perforada a fin de permitir la aireación, y con un orificio central de mayor diámetro, que permitía el pasaje de un tubo de vidrio que

llegaba hasta el fondo del frasco. El frasco con su tapa se colocó sobre un tarro cilíndrico de lata, de diámetro un poco mayor que la tapa del frasco, provisto de dos perforaciones para la entrada y salida del aire. El cierre se efectuó también en este caso con plastilina. En el frasco se colocó afrecho preparado en la forma indicada e inoculado con 5 % del cultivo de *Aspergillus oryzae* y se incubó a una temperatura ambiente de 18°C. Al cabo de 5 días el afrecho enmohecido estaba totalmente esporulado, obteniéndose un desarrollo completamente uniforme.

d) *Cultivo en recipiente abierto*: En una olla de 3 litros se colocó afrecho humedecido con solución de ácido clorhídrico 0,3N y se esterilizó a 120°C durante ½ hora. La cantidad de afrecho era tal que la capa tenía menos de 5 cm de espesor. El material se inoculó en la forma ya indicada. La olla se cubrió con un repasador mojado y se colocó en la estufa a 30°C, incubándola durante 48 horas. Cada 12 horas se removió el material y remojó con unos 60 cc de agua. Al cabo de las 48 horas el afrecho totalmente esporulado se mezcló bien y se puso a secar a temperatura ambiente.

e) *Cultivo en recipiente abierto, sin esterilización del material*: En la olla de 3 litros se colocaron 200 g de afrecho, se le agregaron 200 cc de agua, hervida durante 5 minutos y adicionada de la cantidad de ácido clorhídrico concentrado, necesario para obtener una concentración de 0,3 N. Se mezcló bien, se dejó enfriar y se sembró con 5 % del cultivo. La olla se cubrió, como en el caso anterior con un repasador mojado y se colocó en la estufa a 25°C, dejándola por 48 horas. El material fué removido y mezclado a las 24 y a las 40 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se secó al aire el afrecho enmohecido, como en los casos anteriores.

### SACARIFICACION Y FERMENTACION

Los preparados de afrecho enmohecido obtenidos mediante los dispositivos que se acaban de describir, fueron utilizados en los ensayos de sacarificación y fermentación con los resultados que más adelante se comunican, y de acuerdo con la técnica de Hao, Fulmer y Underkofler (3), usando como materia prima harina de maíz con un contenido de almidón de 56,3 % determinado por el método de hidrólisis con malta y ácido (4).

La sacarificación se realizó en Erlenmeyer de 500 ml, en los que se colocó 60 g de maíz y 300 cc de solución de ácido clorhídrico 0,04 N, se calentó el contenido a fuego directo con una pequeña llama, agitando continuamente hasta que se formara engrudo; luego se cocinó en autoclave a 1 ½ atmósfera durante ½ hora, se enfrió, se ajustó el pH a 4,5 y se incorporó a cada Erlenmeyer 10 % del peso del maíz de afrecho enmohecido preparado en las formas anteriormente indicadas. Los Erlenmeyer se colocaron en estufa a 30° durante 1 hora, agitándose el contenido de los mismos varias veces durante ese tiempo, al cabo del cual se retiraron de la estufa y se procedió a fermentar el mosto así obtenido, a cuyo objeto se le agregó a cada uno 20 cc de un cultivo de 24 horas de *Saccharomyces cerevisiae*, raza XII, y se colocó en estufa a 30°C, donde se dejaron durante 4 días. Transcurrido ese tiempo se retiraron de la estufa, se neutralizó el contenido y se destiló, recogiendo 100 cc del destilado en matraces aforados. A los des-

tilados se les tomó la densidad con picnómetro, calculándose mediante una tabla el contenido de alcohol de los distintos mostos preparados con los diversos preparados enzimáticos ya descriptos.

#### RESULTADOS OBTENIDOS

En los ensayos realizados con los distintos preparados del afrecho enmohecido obtenidos, a cada Erlenmeyer se le agregó 10 % del peso del maíz de afrecho enmohecido, calculado teniendo en cuenta la humedad del preparado, como material seco. Las cantidades del alcohol han sido corregidas de las cantidades debidas al preparado y al cultivo de la levadura. Los resultados obtenidos han sido reunidos en la planilla que sigue:

RESULTADOS DE LA UTILIZACIÓN DEL AFRECHO ENMOHECIDO  
EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL ALMIDÓN DE MAÍZ

Preparado	Humedad del preparado	Cantidad de alcohol correspondiente a 60 g de maíz	Rendimiento % del teórico
A	20 %	15,4 g	80 %
A	20 >	15,4 >	80 >
B	38,5 >	15,0 >	78 >
B	38,5 >	15,0 >	78 >
C	17 >	15,4 >	80 >
C	17 >	15,8 >	82 >
C	17 >	16,7 >	87 >
C	17 >	16,1 >	84 >
C	17 >	16,0 >	83 >
C	17 >	16,1 >	84 >
C	17 >	15,8 >	82,5 >
D	43 >	16,1 >	84 >
D	43 >	15,0 >	78 >
E	54 >	15,0 >	78 >
E	54 >	15,4 >	80 >

#### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los ensayos detallados en esta comunicación, han permitido llegar a las conclusiones siguientes:

1º Se confirma que mediante la utilización de cepas de *Aspergillus oryzae* de elevado poder diastásico y empleando procedimientos simplificados, fáciles de realizar en la práctica, ha sido posible obte-

ner preparados enzimáticos, que pueden ser usados en reemplazo de la malta, para la elaboración de alcohol etílico en la destilería de granos.

2º La uniformidad de los resultados obtenidos en la preparación del afrecho enmohecido, demuestra que no es necesario trabajar en condiciones de asepsia absoluta, lo cual facilita enormemente la preparación industrial del mencionado producto.

3º La forma de aireación de los cultivos del hongo desarrollado sobre afrecho, siempre que ella sea intensa y uniforme, parece no modificar la actividad del producto al actuar como agente sacarificante del almidón.

4º El empleo de los distintos preparados obtenidos, ha permitido llegar, en el caso del maíz aquí estudiado, hasta un rendimiento equivalente al 87 % del teórico.

#### RESUMEN

En el trabajo se describen diversos métodos, algunos muy simplificados, utilizados en la obtención del preparado enzimático de *Aspergillus oryzae* conocido con el nombre de «afrecho enmohecido», que puede ser usado en reemplazo de la malta para la obtención del alcohol etílico en la destilería de granos.

Los resultados expuestos indican que en la preparación del mencionado producto no es necesario mantener condiciones rigurosas de asepsia, circunstancia que facilita las manipulaciones inherentes a su elaboración industrial, y que los métodos de aireación utilizados en la obtención de los cultivos desarrollados sobre afrecho, a condición de ser ésta intensa y uniforme, parecen no tener influencia sobre la actividad diastásica del producto final, al ser empleado como agente sacarificante del almidón.

Mediante los preparaos obtenidos, lograron alcanzarse, con maíz, rendimientos equivalentes al 78-87 % del teórico.

#### SUMMARY

##### THE USE OF MOLDY BRAN IN THE ALCOHOLIC FERMENTATION OF CORN

Various methods are described, some very simplified, used in the obtention of the enzymathic compound of *Aspergillus oryzae*, known under the name of moldy bran, which can be employed as a substitute for malt in the obtention of ethyl alcohol in the distillery of grains.

The results shown, indicate that during the preparation of the above mentioned product, it is not necessary to observe a rigorous asepsis, a circumstance which facilitates the inherent manipulations for its industrial manufacture. Likewise the methods of aeration used for the obtention of cultures made on bran — supposing that it will be intense and uniform —, do not seem to have much influence on the diastatic activity of the final product, when employed as a saccharifying agent of starch.

Through the compounds obtained, yields equivalent to 78-87 % were reached with corn.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) TAKAMINE: *Ind. Eng. Chem.* 6: 824 (1914).
- (2) UNDEKOFLEK, L. A.; ELLIS I. FULMER and LORIN SCHOENE: *Saccharification of Starchy Grain mashes for the alcoholic fermentation industry.* *Ind. Eng. Chem.* 31: 734 (1939).
- (3) HAO, LU CHENG; ELLIS I. FULMER and L. A. UNDEKOFLEK: *Fungal amylases as saccharifying agents in the alcoholic fermentation of corn.* *Ind. Eng. Chem.* 35 814 (1943).
- (4) *Assoc. of Official Agr. Chem. Methods of Analysis*, 5th. ed. (1940).