
COMPOSICION QUIMICA DEL AGAR MEXICANO

P. H. HOPE, E. ESPERON M. y M. PEREZ
MIRAVETE
Laboratorio de Bioquímica.
Escuela Nacional de
Ciencias Biológicas, I. P. N.
México, D. F.

INTRODUCCION

Se conoce con el nombre de agar-agar o simplemente agar (Tseng, 1944) al extracto no nitrogenado, seco y amorfo, parecido a gelatina, extraído de ciertas especies de algas rojas, principalmente del género *Gelidium* y de otras agarfitas. Es el éster sulfúrico de una galactana lineal, insoluble en agua fría pero soluble en agua caliente; sus soluciones neutras al 1% forman geles estables, entre 35 y 50° C., que funden de 80 a 100° C. (Tseng, 1945).

Los estudios químicos del agar datan del año 1859 en que Payen obtiene de *Gelidium amansii* un carbohidrato en forma de gel, al que dio el nombre de gelosa. Morin (1880) encuentra que la gelosa de Payen da por oxidación ácidos músicos y oxálico. Bauer (1884) fue el primero en identificar el agar con una galactana. Tahara, Oshima, Kellner y Kinch (Tressler, 1940), hacen estudios analíticos de algas comestibles. Matsui, (1916) publica los análisis de los principales tipos de algas japonesas usadas en la fabricación del agar. Fellers (1916) en ese mismo año, da a conocer los resultados de los análisis de muestras comerciales de ese producto.

Sobre la constitución del agar han trabajado muchos investigadores, entre ellos, Neuberg y Ohle (1921), reportaron la presencia de residuos de ácido sulfúrico en combinación orgánica; Percival, Munro y Sommerville (1937) por una serie de metilaciones en el agar, fueron los primeros en establecer las características fundamentales de su estructura. Demostraron que la mayor parte de la molécula de agar está formada por unidades de beta-galactopiranosas, unidas en posición 1,3, un arreglo único en su género en la química de los polisacáridos.

Pirie (1936), hizo la observación que tanto la l-galactosa como la d-galactosa, se encuentran presentes entre los productos de acetólisis del agar.

Posteriormente Jones y Peat (1942), propusieron una fórmula para el agar, en la cual el polisacárido está representado por una cadena de unidades de galactosa, nueve de las cuales son de d-galactosa y la décima de l-galactosa. Las unidades de d-galactosa están unidas por enlaces 1,3; en el caso de la unidad de l-galactosa el enlace es a través de su cuarto átomo de carbono. Las moléculas de l-galactosa están esterificadas en el carbono sexto por ácido sulfúrico.

Barry y Dillon (1944) observaron después que la fórmula sugerida por Jones y Peat (1942), requiere un contenido de azufre de 1.8% y que en la bibliografía se reportan cantidades que varían entre 0.5 y 1.5% de azufre. Esta variabilidad puede ser debida a la mayor o menor extensión de la hidrólisis del sulfato, efectuada durante la purificación técnica del agar, ya que estos experimentos fueron llevados a cabo en un producto comercial de historia desconocida. Estos autores obtuvieron en el laboratorio un agar de *Gelidium latifolium*; contenía 3.16 % de cenizas y 0.505% de azufre, lo cual correspondería a un grupo sulfato por cada treinta y ocho unidades de galactosa. Después de purificado, las cenizas disminuyeron a 2.59% y el azufre a 0.364%, o sea un grupo sulfato por 53 unidades de galactosa.

Percival (1944) también hizo varias determinaciones del contenido de azufre en muestras de agar, obteniendo resultados más bajos (0.43 a 0.46%) que los requeridos por la fórmula de Jones y Peat (1942).

Los resultados obtenidos por Percival y Thomson (1942), con relación a las proporciones relativas de los productos de hidrólisis de los derivados metilados del agar, están particularmente en discordancia con los obtenidos por Jones y Peat. Indican que el contenido de grupos metoxilos para una molécula de agar metilado como la proponen Jones y Peat debería ser de 42%, y que el valor máximo obtenido no es mayor de 25% para una muestra representativa, y deducen por lo tanto que esa fórmula está muy simplificada.

En virtud de la variabilidad que existe en los datos sobre la composición del agar se consideró interesante

determinar los constituyentes del agar producido en las fábricas de México y comprobar si había o no similitud con el obtenido en Japón y Estados Unidos.

MATERIALES Y METODOS

Muestra usada. Un agar procedente de la Cía. Mexicana de Agar S. de R. L., de Ensenada, Baja California: en forma de escamas irregulares, de color blanco amarillento.

Humedad. Se determinó por dos métodos: 1° Tomando muestras de 2 a 5 g. secándolas al horno a 100-105° C, durante varias horas hasta peso constante; 2° Por el método de Marcusson (1905) o de extracción con xilol.

Cenizas, alcalinidad de las cenizas, arena y sílice. Se determinaron siguiendo los métodos propuestos por la A. O.A. C. (1905).

Azúfre como sulfatos. Se hicieron las determinaciones por dos métodos: 1° Calcinando 2 g. de la muestra mezclados con 4 ó 5 g. de nitrato de magnesio, disolviendo las cenizas, filtrando, insolubilizando la sílice, filtrando nuevamente y precipitando los sulfatos en forma de sulfato de bario en el filtrado y aguas de lavado: 2° Por digestión húmeda: Se oxida la muestra en un Erlenmeyer con una mezcla de ácido nítrico y perhidrol (Pérez Miravete, 1948).

Extracto etéreo. Se pesaron 8 g. de muestra; se extrajeron con éter en un aparato de Soxhlet durante 4 horas, se evaporó el éter en baño María, se desecó a 100-110° C. durante dos horas y se pesó.

Fibra cruda. Se pesaron muestras de 2 g. del material secado con éter y se determinaron por el método indicado por la A. O. A. C. (1945).

Nitrógeno proteico. Se empleo el método de Kjeldahl-Gunning. (A. O. A. C., 1945).

Determinación de reductores totales. Para el cuanteo de azúcares se utilizó el método de Lane-Eynon pero como no se obtuvieron resultados constantes, se prefirió cuantear el óxido cuproso formado, por el método permanganimétrico de Bertrand (Browne-Zerban, 1941), habiendo hecho la precipitación del óxido cuproso de acuerdo con el método de Munson y Walker (A. O. A. C., 1945). Las técnicas que se utilizaron al combinar los dos métodos fueron estudiadas por Pérez Miravete (1948).

Determinación de galactosa. Se emplearon dos métodos: el químico de van der Haar, citado por Browne-Zerban (1941) y el microbiológico propuesto por Wise y Appling (1944).

El método microbiológico permite la determinación de pequeñas cantidades de galactosa en presencia de glucosa, manosa, xilosa, fructosa, arabinosa y ácido glucourónico con exactitud de 92 a 98%. Consiste en fermentaciones diferenciales con levaduras. Los organismos empleados fueron *Saccharomyces carlsbergensis* var. *mandshuricus*, N. R. R. L. N° 379, y *Saccharomyces bayanus* N. R. R. L. N° 966. Las levaduras se mantuvieron en buenas condiciones por varios meses, sembrándolas en agar-glucosa. El comportamiento de las levaduras frente a la rafinosa se hizo siguiendo el método de Skinner y Bouthilet (1947) encontrándose que *S. bayanus* fermenta un tercio de la rafinosa mientras que *S. carlsbergensis* la fermenta totalmente. No han mostrado disminución en potencia aún en un período de ocho meses. Se usaron cultivos en agar-glucosa, de 2 a 7 días para la preparación de las suspensiones requeridas en la inoculación de las soluciones de azúcares. Para la preparación de las suspensiones de levaduras se siguió la técnica de Wise.

Se usaron 25 ml. de las soluciones de azúcares en la fermentación y se hicieron todos los experimentos en matraces Erlenmeyer de 125 ml. El total de azúcares reductores en tales soluciones nunca excedió del 2%, y la concentración de galactosa fue conservada entre 40 y 250 mg. en 25 ml. de solución.

Para aplicar este método a los polisacáridos que constituyen el agar, se hidrolizan por calentamiento con ácido sulfúrico al 2% durante varias horas, antes de someterlos a fermentación. En el caso del agar, se observó que el tiempo más adecuado era 4 horas en autoclave sin presión. A los hidrolizados ácidos de los polisacáridos se les agrega carbonato de sodio hasta llevarlos a un pH entre 5 y 6.

Para el análisis de los azúcares se siguió el método combinado de Munson-Walker y Bertrand.

El peso del óxido cuproso correspondiente a los azúcares residuales de la fermentación con *S. carlsbergensis*

Nº 379 se subtrae de aquel que corresponde a los azúcares residuales de la fermentación con *S. bayanus* Nº 966, y se calcula su equivalente en galactosa.

Determinación de ácido galactourónico Se usó el método de Dickson, Otterson y Link (1930) utilizando muestras de 5g. de agar para cada determinación.

Determinación de ácido galactónico. Se empleó el método de Hönig y Ruziczka (1929) para aislar el ácido galactónico en forma de su sal de calcio y el de Kiliani (1922) para obtener, a partir de dicha sal el ácido libre.

Los dos métodos combinados son los siguientes:

TABLA No. 1

ANALISIS DEL AGAR OBTENIDO EN MEXICO COMPARADO CON EL OBTENIDO EN JAPON Y ESTADOS UNIDOS

Determinaciones	Agar mexicano		Agar de EE.UU. (Fellers 1916)		Agar Difco (Cortina 1946)		Agar Japonés (Cortina 1946)	
	% en muestra húmeda	% en muestra seca	% en muestra húmeda	% en muestra seca	% en muestra húmeda	% en muestra seca	% en muestra húmeda	% en muestra seca
Humedad (Método oficial)	21.7	—	—	—	—	—	—	—
Humedad (Método del xilol)	21.5	—	16.57	—	17.46	—	18.36	—
Cenizas	4.11	5.24	3.85	4.61	3.48	4.21	4.67	5.72
Alcalinidad de cenizas en K ₂ O	1.15	1.47	—	—	—	—	—	—
Arena	0.44	0.57	—	—	—	—	—	—
Sílice	0.02	0.02	0.68	0.81	0.42	0.50	0.48	0.58
Sulfatos (digestión húmeda)	2.75	3.50	—	—	—	—	—	—
Equivalente en azufre	0.92	1.16	—	—	—	—	—	—
Extracto etéreo	0.08	1.10	0.30	0.35	0.13	0.15	0.20	0.24
Fibra cruda	0.05	0.07	0.80	0.95	0.10	0.12	0.15	0.18
Proteínas (NX6.25)	0.87	1.10	2.34	2.80	0.76	0.92	0.82	1.01
Extracto no nitrogenado	71.75	93.49	76.15	91.29	76.80	94.60	74.10	92.80
Reductores totales (como galactosa)	58.20	74.23	—	—	—	—	—	—
Pentosas	0.28	0.35	—	—	—	—	—	—

El agar fue hidrolizado con ácido sulfúrico al 2% durante 4 horas en autoclave sin presión, y se le agregó hidróxido de bario hasta dejar la solución ligeramente ácida; se filtra el sulfato de bario, se neutraliza la solución con carbonato de calcio y se filtra nuevamente; se evapora a vacío a consistencia de jarabe y se gotea en alcohol absoluto donde precipita la sal de calcio del ácido galactónico.

Al galactonato de calcio se le va agregando una solución de ácido oxálico hasta que todo el calcio sea precipitado; después se filtra, la solución ácida se concentra en vacío, a una temperatura entre 35 y 40° C., hasta consistencia siruposa y se deja reposar durante uno y medio a dos días con alcohol de 85% (1.7 ml. de alcohol por

cada gramo del material siruposo). Después se lava con una mínima cantidad de alcohol de 85% y finalmente con alcohol de 95%. Se deseca en vacío y se pesa.

Determinación de pentosas. Para el conteo de pentosas se siguió el método de Tollens modificado por Kröber (Browne-Zerban, 1941), que consiste en deshidratar las pentosas con ácido clorhídrico de $d = 1.06$, destilar el furfural formado y precipitarlo con floroglucina.

RESULTADOS

El análisis completo del agar obtenido en México, siguiendo los métodos ya indicados, dio los resultados que se muestran en la Tabla N° 1.

En vista de que el valor del agar se debe a su propiedad de formar geles, y como esta cualidad es debida principalmente a su contenido en polisacáridos, se consideró interesante determinar de una manera más precisa su contenido en galactanas. Para esto se hizo primero la determinación de reductores totales, habiéndose obtenido los resultados reportados en la Tabla N° II.

TABLA N° II

RESULTADO DE LA DETERMINACION DE REDUCTORES TOTALES

Tiempo de hidrólisis del agar (horas)	% de azúcar (como galactosa)
4	59.8
4	58.1
4	56.0
12	59.1
6	45.0

Después de cuantear los reductores totales se procedió a determinar directamente su contenido en galactosa, con los resultados que se muestran en la Tabla N° III.

TABLA N° III

RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE GALACTOSA EN EL AGAR POR EL METODO DEL ACIDO MUCICO

% de galactosa
67.0
63.5
52.0
49.6
68.7
59.5
Promedio 60.05%
(± 2.14)

Por no existir tablas de equivalencia de óxido cuproso a galactosa por el método combinado de Munson-Walker y Bertrand, se hicieron una serie de determinaciones con una muestra de d-galactosa, q. p., de The Coleman & Bell Co., desecada durante 4 horas a 80° C., para fijar la cantidad de óxido cuproso cuanteadada por el método permanganométrico, con relación al peso de galactosa usado.

Con el objeto de determinar el tiempo en que las levaduras efectúan la fermentación total de los azúcares se hicieron las siguientes pruebas: se prepararon 16 tubos que contenían 10 ml. de solución de d-galactosa (43.2 mg. de d-galactosa) y se les agrega a todos 7.5 ml. de extracto de levaduras. Ocho tubos se inocularon con *S. bayanus* y ocho con *S. carlsbergensis*; se pusieron a fermentar a 30° C. a distintos tiempos determinándose los azúcares residuales, obteniéndose los resultados expresados en la Tabla N° IV.

Para determinar la acción de las levaduras utilizadas, sobre la glucosa, se prepararon 4 tubos que contenían 10 ml de una solución de glucosa (44.8 mg. de glucosa) y se les agregó a todos 7.5 ml. de extracto de levaduras. Dos se inocularon con *S. bayanus* y dos con *S. carlsbergensis*. Se pusieron a fermentar a 30° C., durante 48 a 54 horas con los resultados indicados en la Tabla N° V.

TABLA N° IV

PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO DE *S. BAYANUS* N.R.L. 966 Y DE *S. CARLSBERGENSIS* N.R.L. 379 SOBRE LA GALACTOSA

Tiempo (en horas)	Microorganismo	mg. de d-galactosa residual	% de d-galactosa fermentada
6	<i>S. bayanus</i>	45.0	0.0
"	<i>S. carlsbergensis</i>	45.0	0.0
12	<i>S. bayanus</i>	42.0	2.8
"	<i>S. carlsbergensis</i>	38.5	10.9
24	<i>S. bayanus</i>	41.1	4.9
"	<i>S. carlsbergensis</i>	8.0	81.49
30	<i>S. bayanus</i>	39.0	9.73
"	<i>S. carlsbergensis</i>	15.5	64.13
36	<i>S. bayanus</i>	42.5	1.63
"	<i>S. carlsbergensis</i>	1.58	96.35
48	<i>S. bayanus</i>	42.5	1.63
"	<i>S. carlsbergensis</i>	9.5	78.01
54	<i>S. bayanus</i>	42.5	1.63
"	<i>S. carlsbergensis</i>	5.5	87.27
60	<i>S. bayanus</i>	38.5	10.78
"	<i>S. carlsbergensis</i>	4.5	89.59

TABLA N° V

ACCION DEL *S. BAYANUS* N. R. R. L. 966 Y *S. CARLSBERGENSIS* N.R.R.L. 379 SOBRE LA GLUCOSA

Tiempo (en horas)	Microorganismo	mg. de glucosa residual	% de glucosa fermentada
48	<i>S. bayanus</i>	1.2	97.33
"	<i>S. carlsbergensis</i>	0.4	99.11
54	<i>S. bayanus</i>	0.7	98.44
"	<i>S. carlsbergensis</i>	0.2	99.55

Una vez determinado el tiempo necesario para la fermentación completa de los azúcares, se efectuó una serie de fermentaciones de la d-galactosa y de mezclas de d-galactosa y de d-glucosa con el fin de comprobar la exactitud del método microbiológico diferencial que se aplicó a los hidrolizados de agar. En la Tabla N° VI se indican los resultados obtenidos de las fermentaciones de estas mezclas, y en la Tabla N° VII los obtenidos con los hidrolizados de agar.

Los resultados de las determinaciones de ácidos urónicos y pentosas en el agar se expresan en las Tablas Nos. VIII y IX

TABLA N° VI

FERMENTACIONES DE LA D-GALACTOSA Y MEZCLAS DE D-GALACTOSA Y D-GLUCOSA CON S-BAYANUS Y S-CARLSBERGENSIS

Fermentación N°	Cantidad de azúcares originales en cada matraz (25 ml. de solución).		mg. de CU ₂ O obtenido después de la fermentación con <i>S. bayanus</i> N.R.R. L. N° 966	mg. de CU ₂ O obtenido después de la fermentación con <i>S. carlsbergensis</i> N.R. R. L. N° 379	mg. de d-galactosa equivalentes al CU ₂ O	% de d-galactosa recuperada
	mg. de d-galactosa	mg. de d-glucosa				
1	107.5	0.0	200.65	4.5	98.3	91.62
2	105.4	0.0	208.70	11.71	98.5	93.45
3	105.0	0.0	193.67	5.06	94.2	89.71
4	102.0	0.0	188.04	20.94	83.5	81.86
5	43.2	0.0	85.04	3.49	40.8	94.40
6	100.0	95.4	197.50	3.10	97.2	97.20
7	96.8	93.2	192.99	0.0	96.5	99.60
8	49.8	46.7	94.58	3.37	45.5	91.30
9	49.0	49.7	101.94	13.57	44.0	89.70

d-galactosa recuperada, valor promedio: 92.09% ± 3.37

TABLA N° VII

RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE GALACTOSA EN EL AGAR POR EL METODO MICROBIOLÓGICO DE WISE Y APPLING

Fermentación N°.	Cantidad de azúcares originales en cada matraz (en 25 ml. de solución)		mg. de CU ₂ O obtenido después de la fermentación con <i>S. bayanus</i> N.R.R.L. N° 966	mg. de CU ₂ O obtenido después de la fermentación con <i>S. carlsbergensis</i> N.R.R.L. N° 966	mg. de galactosa equivalente	% de galactosa en agar
	mg. de agar	mg. de glucosa				
1	350.0	0.0	338.40	127.01	14.48	32.58
2	350.0	0.0	349.70	120.43	125.28	35.79
3	350.0	0.0	390.62	149.53	131.22	37.49
4	350.0	0.0	403.33	140.52	143.10	40.88
5	200.0	0.0	184.50	51.88	71.28	35.64
6	175.0	0.0	179.88	48.41	70.74	40.42
7	175.0	0.0	19.27	45.94	77.76	44.43

8	175.0	0.0	186.82	64.56	65.88	37.64
9	175.0	0.0	200.65	55.35	68.30	44.74
10	175.0	0.0	198.35	66.88	70.74	40.42
11	350.0	100.0	343.20	145.20	106.92	30.54
12	175.0	50.0	228.80	73.74	83.70	47.82
13	175.0	50.0	181.28	70.23	59.94	34.25
14	100.0	56.0	78.41	16.12	33.48	33.48
15	87.5	49.9	90.00	25.35	39.42	45.05
16	87.5	53.2	85.32	17.29	36.72	41.96
17	87.5	55.2	94.56	16.12	42.12	48.13
18	87.5	55.2	85.32	12.67	38.88	44.43
19	87.5	55.2	92.24	18.44	38.96	445.66

TABLA N° VIII

RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE ACIDO GALACTOURONICO EN EL AGAR MEXICANO, AGAR JAPONES Y GALACTOSA, POR EL METODO DE DICKSON, OTTERSON Y LINK

Muestra de:	CO ₂ obtenido(g)	% de ácido galactourónico presente o formado.	Observaciones:
Agar mexicano	0.0206	1.82	(con aire sin CO ₂)
" "	0.0231	2.03	(" " " ")
" "	0.0214	1.89	(" " " ")
" "	0.0237	2.09	(" nitrógeno)
Agar japonés	0.0238	2.09	(con aire sin CO ₂)
" "	0.0231	2.04	(" " " ")
" "	0.0227	2.01	(" nitrógeno)
Galactosa	0.0084	0.74	(con aire sin CO ₂)
"	0.0094	0.83	(" nitrógeno)
"	0.0094	0.83	(" ")
Prueba testigo	0.0007	0.06	(con aire sin CO ₂)

Para todas las determinaciones se pesaron 5 g. de muestra.

DISCUSION

Como se observa en la Tabla N° I, los resultados obtenidos para la humedad en el agar mexicano, fueron ligeramente más altos que los reportados por Fellers (1916) y Cortina (1946) para agares norteamericanos y japoneses; esto se debe a que se trabajó con una muestra comercial, empacada en un saco de papel y probablemente absorbió humedad durante el transporte; las cenizas fueron también más altas que en los agares norteamericanos, y en cambio más bajas que en los japoneses. La arena y la sílice dieron valores bajos.

TABLA N°IX

RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES DE FURFURAL POR EL METODO DE TOLLENS

Nº de la muestra	Furfural floroglúcido obtenido mg.
1	86.3
2	77.4
3	82.5
4	80.5
Promedio	81.7

Después de hacer algunas determinaciones del azufre en las cenizas, se observó que los resultados no concordaban, debido probablemente a que se perdía una parte durante la calcinación. Se intentó eliminar la reducción del azufre de los sulfatos como causa de error, haciéndose calcinaciones en presencia de nitrato de magnesio, pero los resultados fueron también bajos. Por esta razón se llevaron a cabo las digestiones del agar con ácido nítrico, encontrándose de esta manera una cantidad más alta de azufre (0.92 %) que las encontradas por Barry y Dillon (1944) para otros agares.

Los valores de extracto etéreo y fibra cruda de la muestra que se analizó, fueron menores que los encontrados en agares de otros orígenes; los de las proteínas son intermedios entre los reportados para agares norteamericanos y japoneses, menores que los primeros, con excepción del agar Difco, y ligeramente mayores que los segundos.

El extracto no nitrogenado se calcula restando de 100 la suma de todas las determinaciones anteriormente descritas.

Para la determinación de reductores totales se hicieron hidrólisis del agar a distintos tiempos, con objeto de ver cuál era el más adecuado y se observó (Tabla Nº II), que éste era de 4 a 6 horas, y que después de este tiempo empezaban a sufrir alteraciones los azúcares, por lo que se optó por un tiempo de 4 horas para todas las hidrólisis. Estas se hicieron en autoclave sin presión, y con ácido sulfúrico al 2%. Se comprobó que la hidrólisis es completa en estas condiciones y que es mínima la formación de impurezas que obscurecen y enturbian los hidrolizados. Para esta determinación de reductores totales se empleó el método combinado de Munson-Walker y Bertrand determinando la equivalencia de óxido cuproso a galactosa, obteniéndose valores muy semejantes a los de las tablas de Kertesz (Browne-Zerban, 1941) para el método de Bertrand.

El método de van der Haar para la determinación de galactosa en polisacáridos, recomienda la hidrólisis ácida con ácido sulfúrico de 2 a 5% durante varias horas a 105-110° C. En el caso especial del agar se encontró que las condiciones más favorables fueron: 2% de ácido sulfúrico haciendo la hidrólisis durante 4 horas a 105°C.

Este método como se ve en la Tabla Nº III da resultados variables (60.05 % \pm 2.14) y altos en relación con los obtenidos por el método microbiológico; esto se debe probablemente a que no todo el ácido múcico obtenido es producido por oxidación de la galactosa sino que se encontró en el agar la presencia de ácidos galactourónico y galactónico que por oxidación con ácido nítrico también dan ácido múcico.

Al aplicar el método microbiológico de Wise y Appling para determinar galactosa en el agar, se procedió primero a hacer las reacciones bioquímicas de las cepas de levaduras empleadas, comprobándose que *S. bayanus* Nº 966 fermenta la mayoría de los azúcares más comunes sin tener acción sobre la galactosa, en cambio *S. carlsbergensis* Nº 379 fermenta ésta junto con otros azúcares, propiedad en que se base dicho método microbiológico.

Se hicieron varias fermentaciones a distintos tiempos con objeto de ver a las cuantas horas era total la fermentación de la galactosa encontrándose (Tabla Nº IV) que a las 54 horas, ya era casi completa que después *S. bayanus* empezaba a fermentar algo la galactosa por lo que todas las fermentaciones se hicieron en este tiempo.

También se hicieron fermentaciones con glucosa a las 48 y 54 horas (Tabla Nº V), encontrándose que en este tiempo la glucosa es fermentada casi totalmente; así, en mezclas con galactosa o agar sometidas a fermentación durante este lapso se tiene la seguridad de que los azúcares residuales son exclusivamente galactosa.

Como *S. bayanus* en ausencia de glucosa fermenta cierta cantidad de galactosa, en algunas fermentaciones

de agar y galactosa se les agregó glucosa, y se obtuvieron mejores resultados.

Para determinar la exactitud del método microbiológico, se hizo una serie de fermentaciones con d-galactosa y con mezclas de d-galactosa y d-glucosa encontrándose que la cantidad de d-galactosa cuantada es de 92.09% \pm 3.37 (Tabla N° VI).

El tiempo de hidrólisis que se empleó para el agar usado en el cuantado de la d-galactosa por el método de Wise y Appling fue igual al empleado para reductores totales (4 horas en autoclave sin presión).

Como se puede observar en la Tabla N° VII las fermentaciones se hicieron con distintas concentraciones de azúcares encontrándose que a altas concentraciones (fermentaciones 1, 2, 3, 4, 5, 11, 12, 13 y 14) el método da resultados muy bajos se obtuvieron mejores resultados con concentraciones bajas de agar (fermentaciones 6, 7, 8, 9 y 10) y principalmente cuando el agar se encuentra mezclado con glucosa. En estas últimas condiciones se encontró un 45.05% \pm 2.23 de d-galactosa en el agar.

En el método microbiológico sólo se cuantea la d-galactosa pues según los últimos trabajos de Appling, Ratliff y Wise (1947), se ha visto que las dos especies de levaduras usadas, son incapaces de fermentar la l-galactosa.

El ácido galactourónico que es otra substancia que podría interferir aumentando los resultados, se ha observado en experiencias preliminares de los autores del método que tampoco es fermentada por dichas levaduras

Se intentó determinar la l-galactosa residual por el método polarimétrico determinando la rotación de los hidrolizados de agar después de la fermentación con *S. bayanus* y *S. carlsbergensis* pero debido a que la concentración de l-galactosa es muy pequeña no se observó una desviación a la izquierda apreciable: de -0.1 a -0.2° de rotación angular.

Se encontró en el agar la presencia de ácido galactourónico. Para eliminar la posibilidad de que este ácido se formara por oxidación de la galactosa se hicieron algunas determinaciones con corriente de nitrógeno y otras con corriente de aire libre de bióxido de carbono, encontrándose el mismo resultado. También se hicieron algunas determinaciones con galactosa notándose que se forma una pequeña cantidad de bióxido de carbono, esto probablemente se deba a que durante el proceso de purificación y cristalización de la galactosa se forma algo de ácido galactourónico, o bien que una pequeña parte del azúcar se oxide por el tratamiento a que se sujeta: acción del ácido clorhídrico al 12% a 135-140° C. durante 4 a 5 horas.

Como el agar contiene aproximadamente un 60% de galactosa, se consideró que parte del bióxido de carbono era desprendido por esta substancia, y se le descontó al obtenido del agar el desprendido por la galactosa, obteniéndose entonces para el agar mexicano un contenido de ácido galactourónico de 1.48% y para el japonés de 1.62%.

Se hicieron determinaciones testigo neutralizándose 0.18 ml. de solución de hidróxido de bario 0.2 N. error que está muy cerca de los límites del método.

Se pensó en la posibilidad de que hubiera ácido galactónico en el agar, empleándose en la determinación los métodos de Hönig y Ruziczka y de Kiliani obteniéndose en una proporción de 4%, un ácido cristalino en forma de agujas largas, de punto de fusión 130° C., pero con gran cantidad de impurezas de color café. No se comprobó si este ácido está originalmente en el agar; es más probable que sea un producto de oxidación de éste durante la hidrólisis, dadas las condiciones fuertemente ácidas en que se verifica.

Las pentosas se determinaron por el método de Tollens, que consiste en cuantear el furfural con floroglucinol; pero como el ácido galactourónico también da furfural, a los resultados obtenidos se les descontó la cantidad de esta substancia producida por el ácido galactourónico, obteniéndose 0.28% de pentosas.

Debido al gran número de lavados que se den al agar en su preparación, no se encontraron sulfatos en forma iónica: como probablemente los sulfatos encontrados estén en combinación orgánica, se pueden calcular el número de moléculas de galactosa por grupo HSO_4^- .

La cantidad de galactosa encontrada por el método del ácido místico es de 60.05%; si se descuenta la cantidad de ácido galactourónico encontrado (1.48%), da un 58.57% de galactosa que corresponde a 49.55% de galactana. El número de moléculas de galactosa que corresponden a cada radical HSO_4^- es de 11 en números redondos.

Para la galactosa determinada por el método microbiológico (45.05%, de galactosa corresponden a 38.11% de galactana), a cada grupo HSO_4^- corresponden 8 a 9 moléculas de d-galactosa exclusivamente ya que como se indicó anteriormente por este método no se determina la l-galactosa.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. - Se hace un análisis completo de una muestra representativa de agar mexicano de la "Cía. Mexicana de Agar", de Ensenada, Baja California. Los resultados de humedad, cenizas, arena, sílice, extracto etéreo, fibra cruda y proteínas, son muy semejantes a los encontrados para agares de otros países.
2. - El azufre en la muestra analizada fue de 0.92%.
3. - El contenido de galactosa se determina por dos métodos: el químico de van der Haar y el microbiológico de Wise y Appling; por el primero se encontró un $60.05\% \pm 2.14$ y por el segundo un $45.04\% \pm 2.23$, pero en este último caso de d-galactosa exclusivamente, porque la forma 1— no se puede cuantear por este método.
4. - Se encontró en el agar la presencia de ácido galactourónico en una proporción de 1.48%.
5. - Se aisló un ácido cristalino, en forma de agujas largas, de punto de fusión de 130°C .; no se pudo purificar y probablemente es ácido galactónico; no se comprobó si está originalmente en el agar o si es un producto de oxidación de éste durante la hidrólisis.
6. - Se puede decir que el agar casi no contiene pentosas, pues están en proporción de 0.28%.
7. -A cada grupo HSO_4^- corresponden 11 moléculas de galactosa según los resultados obtenidos por el método químico, y 8 ó 9 moléculas de d-galactosa según el método microbiológico, resultados semejantes a los encontrados por Jones y Peat (1942).

Agradecemos al Prof. Bibiano Osorio Tafall, su gentileza al proporcionarnos las muestras de agar estudiadas, y a los doctores L. E. Wise y J. W. Appling, del Institute of Paper Chemistry, Appleton, Wisconsin, por las cepas de levaduras que tuvieron la amabilidad de enviarnos.

SUMMARY

A complete analysis was made of a representative sample of Mexican Agar, from Compañía Mexicana de Agar, Ensenada, Baja California. The values obtained for moisture, ash, sand, silica, ethereal extract, crude fiber and proteins, were similar to those reported for agars from other sources. The sulfur content was found to be 0.92%.

Galactose was determined by two methods: the chemical method of Van der Haar and the microbiological technique of Wise and Appling; the results were 60.05% by the chemical method and 45.04% by the second one as the 1-isomer is not determined.

Galactouronic acid appears to be present in the amount of 1.48%.

A crystalline acid was isolated, as elongated needles, melting point 130°C .; it is probably galactonic acid but no further purification of the substance was intended. It was not proved if the substance exists originally in the agar or it was a product of oxidation during hydrolysis.

It is possible to state that the amount of pentoses are almost negligible in agar, the quantity found was only 0.28%.

To each HSO_4^- group corresponds eleven molecules of galactose according to the results obtained by the chemical method, and 8 or 9 molecules of d-galactose by the microbiological procedure. These results are similar to those reported by Jones and Peat (1942).

BIBLIOGRAFIA

- APPLING, J. W., E. K. RATLIFF y L. E. WISE: 1947. Chemical and Microbiological Differentiation of Enantiomorphs of Galactose and Xylose. *Ind. Eng. Chem., An. Ed.*, 19; 496-497.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. 1945. *Methods of Analysis*, 932 pp., Washington, D. C.
- BARRY, V. C. y T. DILLON. 1944. *Formula for Agar*. Chemistry and Industry; 167.
- BAUER, R. W. 1884. Ueber den aus Agar-agar entstehenden Zucker, über eine neue Säure aus der Arabinose nebst dem Versuch einer Classification der gallertbildenden Kohlehydrate nach den aus ihnen entstehenden Zuckerarten. *Jour. prakt. Chem., N. F.* 30: 367-388.
- BROWNE, C. A. y F. W. ZERBAN. 1941. *Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis*. 1353 pp. J. Wiley e Sons, Inc. New York, N. Y.
- CORTINA A. E. 1946 Estudio del agar mexicano obtenido en la fábrica Alga-Mex., S. A. de Atzacapozalco, D. F. Tesis, Escuela Nacional de Ciencias Químicas. U. N. A. de México.
- DICKSON, A. D., H. OTTERSON y K. P. LINK. 1930. A Method for the Determination of Uronic Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 52: 775-779.
- FELLERS, C. R. 1916. The Analysis, Purification and Some Chemical Properties of Agar-agar. *J. Ind. Eng. Chem.*, 8: 1128-1133.
- HONIG, M. y W. RUZICZA. 1929. er 62 B. 1434-1436 (Chem. Abstr. Preparation of d-gluconic and galactonic acids, 23, 4929, 1929).
- JONES, W. G. M. y S. PEAT. 1942. Constitution of Agar. *J. Chem. Soc.*: 225-231.
- KILIANI, H. 1922. *Ber.* 55 B; 75-101. (Chem. Abstr., New observations in the Chemistry of Sugars, 16: 2120. 1922.)
- MARCUSSON, J. 1905. *Mitt. Kgl. Materialprüfungsamt*, 23: 58. Citado por Scott W.
- MATSUI, H. 1916. *J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, 5: 413-417. (Chem. Abstr. Chemical Studies of Some Marine Algae, Chief Material of Kanten, 11: 2920, 1917.)
- MORIN, H. 1880. Sur la gélose. *Compt. rend., Paris*, 90: 924-926.
- NEUBERG, O. Y. H. OHLE. 1921. *Biochem. Z.*, 125: 311-313. (Chem. Abstr., The Sulfur Content of Agar, 16: 946, 1922.)
- PAYEN, M. 1859. Sur la gélose et les nids de salangane. *Compt. rend., Paris*, 49: 521-530.
- PERCIVAL, E. G. V. 1944. Ethereal Sulfate Content of Agar Specimens. *Nature*, 154, 673-674.
- J. MUNRO y J. C. SQMERVILLE. 1937. Structure of Agar. *Nature*, 139: 512-513.
- Y. T. G. H. THOMSON. 1942. Agar-agar IV. Isolation of Hepta-acetyl-dl-Galactose from 3,6-anhydro beta-methyl-d-galactoside. *J. Chem. Soc.*; 750-755.
- PEREZ MIRAVETE, M. 1948. Estudio químico del agar mexicano. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I. P. N., México.
- PIRIE, N. W. 1936. The Preparation of Heptaacetyl-dl-Galactose by the Acetolysis of Agar. *Biochem. J.*, 30: 369-373.
- SCOTT, W. W. 1946. *Standard Methods of Chemical Analysis*. D. Van Nostrand Co., Inc. New York, 2: 1343.
- SKINNER, C. E. y R. BOUTHILET. 1947. Mellibiose Broth for Classifying Yeast. *J. Bact.*, 53: 37-43.

TRESSLER, D. K. 1940. Marine Products of Commerce. Reinhold Publishing Corp., New York, 111 - 134.

TSENG, C. K. 1944. Agar: A Valuable Seaweed Product. Sci. Monthly. 58: 24-32.

1945. The Terminology of Seaweed Colloids. Science, 101, 597-602.

WISE, L. E. y J. W. APPLIG. 1944. Quantitative Determination of d-Galactose by Selective Fermentation. Ind. Eng. Chem., An. Ed., 16; 28-32.