

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS
EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

LAS INDUSTRIAS DE LA FERMENTACIÓN
EN ESPAÑA

DISCURSO

LEÍDO EN LA SOLEMNE SESIÓN INAUGURAL DEL CURSO
ACADÉMICO DE 1927-28

POR EL ILMO. SEÑOR

D. OBDULIO FERNÁNDEZ

EL DÍA 9 DE NOVIEMBRE DE 1927



MADRID
GRÁFICAS REUNIDAS, S. A.
8, Barquillo, 8
1927

SEÑORES ACADÉMICOS:

Caracteriza a las industrias actuales la magnitud de los medios empleados: temperaturas elevadas, presiones considerables y enérgicos catalizadores; mas no todo el desarrollo fabril ha de estar vinculado al empleo conjunto de estos tres factores. En las industrias primitivas que el hombre ha venido ejercitando desde los comienzos de su existencia, solamente alguno de ellos interviene. La fabricación del pan, del vino y del queso, el curtido de las pieles, etc., no requieren las espléndidas construcciones actualmente indispensables para el manejo de aquellos potentes elementos.

El tipo industrial modestísimo, hasta familiar, de las fermentaciones fundamentales para la preparación de las sustancias que constituyeron la base de la alimentación en los primeros tiempos, va logrando un desarrollo inesperado, porque se aplican, por su generalización, a los procesos químicos más complejos que la fábrica, por los métodos exclusivos de la química, no ha conseguido dar carácter industrial.

Las fabricaciones con microbios, reducidas, hasta hace pocos años, a los alimentos y a los medicamentos, compiten con las clásicamente químicas, sin que en ellas medien temperaturas extremas

ni presiones fantásticas. Sólo tienen papel interesante los catalizadores vivos, susceptibles de reproducción asombrosa, de acción suave y tranquila a las temperaturas de la zona vital de 22 a 40 grados.

Ya tenía derecho la microbiología a entrar en la categoría de dignidad, no científica, como la apelaría F. Galton, sino de alta significación industrial por lo fácilmente que se pueden contrastar los procedimientos, vigilar los procesos y aislar los productos de las transformaciones. Las conquistas realizadas en los últimos tiempos la dan alternativa con las producciones fabriles de la química sintética. La formación de glicerina en los procesos dismutantes del desdoblamiento enzimico de la glucosa, dió un relieve tan justificado a la química microbiana de fábrica, como pudiera darlo a la clásica la obtención de un producto de primera necesidad en el orden industrial.

La transcendencia de la química bacteriológica alcanza a muchos gérmenes que los investigadores habían desdeñado sistemáticamente, porque ni eran virulentos produciendo enfermedades, ni ofrecían nada chocante en su morfología. Pero la circunstancia de que en la fermentación alcohólica por la levadura de cerveza se produjese alcohol amílico, no podía pasar inadvertida, y llevó a los bacteriólogos a inquirir bacilos y medios de cultivo adecuados para procurarse los capaces de transformar los hidratos de carbono, aun los de condensación elevada en toda clase de direcciones, en presencia y en ausencia del oxígeno atmosférico.

El éxito coronó los trabajos de muchos investigadores, y hoy se cuenta con un bacilo que desdobra las féculas formando acetona y alcohol butílico normal. Es cierto que la acetona se origina en procesos de fábrica quizá más baratos, pero no el alcohol butílico, de aplicación necesaria en la obtención del butadieno. Es posible que

este descubrimiento revolucione la fabricación del caucho sintético, porque el butadieno obtenido del butanol-1 es una primera materia más económica que el isopreno. Acaso sea probable que los nuevos estudios de la fitografía acerca de las guayulas resten importancia a la obtención del caucho del butadieno, pero siempre quedará un modo de fabricación para casos excepcionales, demostrativo de las excelencias de la química bacteriológica y de su capacidad para resolver problemas industriales en grande escala.

En países que carecen de carburantes, Australia, para no citar más que uno, se emprende el desarrollo de las industrias de la fermentación alcohólica con el objeto de procurarse el alcohol etílico necesario a los motores que la industria general y la agricultura emplean. El Gobierno australiano, de acuerdo con entidades financieras, ha favorecido el cultivo de la remolacha, no con la finalidad de extraer el azúcar, sino de obtener caldos susceptibles de sufrir la fermentación alcohólica y resolver de este modo, a pesar de los inconvenientes del alcohol, el problema de la alimentación de motores.

Consecuencia del desarrollo increíble de las industrias de tipo bacteriano es el desplazamiento de los métodos actuales, deplorable de momento, pero de resultados siempre fecundos. La destilería de la madera para procurarse ácido acético, que en algunos países constituía un venero de riqueza, sufrió rudo golpe con la síntesis económica de este ácido a partir del acetileno, y esta nueva modalidad industrial será suplantada por la formación del etanoico generado en la fermentación anaerobia de la celulosa. Los grandes hornos para obtener carbida cálcica serán sustituidos por grandes tinas de fermentación a 35 grados y por silenciosas máquinas que eliminen el aire para facilitar el crecimiento de los gérmenes transformadores.

En varias industrias se van consiguiendo ventajas no imaginadas sustituyendo los métodos químicos por los bacteriológicos, y el problema irá en aumento cuando se estatuyan para cada germen las reglas precisas para su crecimiento rápido y para facilitar la producción de los enzimas que han de transformar el medio en que se le haga vivir, como se ha logrado en la bacteriología de aplicación terapéutica formar las toxinas más virulentas con desarrollo exuberante de los gérmenes que las elaboran a expensas del terreno en que se los cultiva.

El cambio producido en la transformación de las industrias químicas es análogo al observado antes en la terapéutica y en otras manifestaciones científicas. La síntesis arrojó de la palestra económica las viejas preparaciones con productos naturales, y ahora, la que se conceptuó terapéutica trasnochada vuelve a ocupar el puesto que no debió perder, al ser influenciada por las corrientes de la bacteriología y de la bioquímica.

La síntesis de alcoholes fué uno de los primeros problemas planteados por la industria, y se abandonó quizá por las dificultades técnicas de aquella época; hoy se trata de resolverlo con anhelo tan febril, que ha hecho escribir al ingenioso químico inglés Armstrong, «que ahora se intenta plantear asuntos viejos para resolverlos con procedimientos nuevos».

* * *

Entusiasta partidario de la cooperación de la ciencia en la vida industrial, más exaltado aún que en los años precedentes, en que apenas había españoles convencidos de la necesidad de apostolado para el resurgimiento de las actividades fabriles de la nación,

espoleado por la urgencia de llevar a la práctica los principios de la ciencia pura y aleccionado por importantes Sociedades de desarrollo mundial que construyen laboratorios sólo para la ciencia, en la esperanza de que cualquier hecho de aparente insignificancia puede traducirse en realidades beneficiosas, me siento compelido a tratar en este discurso inaugural el tema que en otros inicié, reducido a una sola industria de aspecto no puramente químico, sino bacteriológico.

Quiero, con esto, demostrar una vez más la íntima conexión de la ciencia con las aplicaciones de todo género. En las industrias de la fermentación alcohólica hay motivo para estudios teóricos acerca de los cambios que los diferentes azúcares sufren por la acción de los gérmenes descomponentes, que enlazan los procesos inicial y final de la transformación bioquímica, y las garantías de rendimientos industriales, y hasta extienden su aplicación a los procesos metabólicos de los carbohidratos en el organismo humano, aportando datos de interés no sospechado a la patogenia de la diabetes, a los cambios de los azúcares en la sangre y en el músculo, a la capacidad transformadora de la célula cancerosa frente a la glucosa y al glucógeno, y a las variaciones de acidez de las carnes conservadas en frigoríficos. Y, en límites más amplios, todavía no bien concretos, el juego variadísimo de los fermentos que coadyuvan a los múltiples actos sintéticos y analíticos de la fermentación alcohólica, proyectará claridad suficiente para las exploraciones químico-clínicas inquiridoras de la epilepsia y de la eclampsia.

Interesantes aplicaciones de la química física han sido de resultado notoriamente fecundo en la biología de las fermentaciones; los estudios acerca de la difusión y del equilibrio de Donnan, han

colaborado con éxito en el de los fermentos y cofermentos endo y exocelulares; los catalíticos, con los nuevos ensayos relativos a la fermentación sin cimasa y sin agente soluble específico, imprimen un sello típico a las acciones de superficie; los relativos a la cinética fermentativa son una aportación más de la química física, y los conexiónados con la acidez, son otra prueba convincente de la existencia de un margen restringido en la concentración en hidrógeno para desenvolverse los actos fundamentales de la vida.

Tan compleja es la bioquímica de la fermentación alcohólica como la de la vida en general, y por tal causa todos los procesos químicos, exceptuados los circulatorios, se desenvuelven con la misma mansedumbre *arrolladora* característica de los procesos vitales.

LA PRODUCCIÓN DE ESTERES FOSFÓRICOS

El fenómeno de más relieve en la fermentación alcohólica es el derivado de exaltarse el proceso químico por el *fosfato bisódico*, hecho del cual se han derivado los estudios acerca de lo que Neuberg llama *fosforilización*. Experimentos de Harden y de Young probaron la existencia de relaciones casi cuantitativas entre la adición de fosfato y la velocidad con que se desenvuelve el proceso fermentativo.

Parece que la intervención del ácido fosfórico origina un cambio del poder rotatorio de la glucosa, atribuido a dos causas: una, semejante a la que produce la combustión del azúcar en el músculo, o sea la alteración del equilibrio entre las formas α y β de la glucosa para engendrar una glucosa, idéntica a la neoglucosa, predecesora

de la levulosa; otra, la síntesis de un ester fosfórico, de actividad óptica muy escasa.

En pro de la formación de levulosa, conócese un hecho de laboratorio, estudiado hace muchos años por v. Ekenstein, relativo a trastrueque del poder rotatorio de los azúcares por el influjo de los álcalis, hecho corroborado en el caso de los fosfatos alcalinos y en las plantas desérticas, objeto de los afanes de los químicos del laboratorio de Tucson (Arizona). Además, la levulosa es quemada por el organismo diabético sin que la glucosa sufra alteración.

La posibilidad de sintetizarse un ester fosfórico tanto en el caso de la levadura de cerveza como en los cambios químicos de los carbohidratos en el músculo, está fuera de duda, puesto que se conocen las diferencias de composición del cimofosfato originado por el sacaromices y el miofosfato producido en el músculo.

En la esterificación de la dextrosa interviene un fermento, la *fosfatesa*, aislada también del músculo de varios animales, fermento cuya acción es exaltada por otra sustancia, y susceptible además de reemplazo por la *insulina*, según resulta de trabajos de Brugsch y sus discípulos, pero de acción específica, puesto que aun los intra-orgánicos son diferentes.

Genérase en la esterificación por la levadura un ester *bifosfórico*, llamado ácido exosabifosfórico, que se conceptúa como el primer paso en la glucometamorfosis, aunque Neuberg y algunos de su escuela crean que la fosforilización previa al dislocamiento molecular de la glucosa es un fenómeno de orden patológico, fundándose en que muchos hongos son incapaces de fermentar el compuesto fosfórico. Este hecho indiscutible, así como las supuestas modificaciones de la permeabilidad celular de las levaduras, no son argumentos de gran fuerza para la calificación de patológico, puesto que

se admite la especificidad de las distintas fosfatasas, y Brugsch prueba que la del músculo y la del hígado no son iguales, y claro está que mucho menos lo es la de los sacaromices, apta para formar un ester bifosfórico y no unifosfórico, como es el de procedencia animal.

Admitida la analogía entre los fito y zoodesdoblamientos enzimicos de los azúcares, ha de advertirse que durante la combustión de la glucosa en los animales disminuye el fósforo inorgánico de la sangre, lo cual significa una tendencia normal, naturalísima de la glucosa a formar ester fosfórico; en las levaduras el contenido en fosfato es muy alto, y por esta circunstancia la semejanza con el proceso zoológico adquiere más relieve, puesto que en los animales la nutrición les proporciona el fósforo necesario a sus exigencias vitales, y en la levadura existe para cederle al punto requerido para sus cambios químicos. Es una condición de economía que rige los procesos vitales: el niño en los primeros meses de su vida, en la lactancia, no recibe hierro, porque durante su permanencia en el claustro materno recibió con largueza lo que ha de necesitar en su período lactante. Es muy probable que los hongos, incapaces de hidrolizar el ácido exosabifosfórico, carezcan del fósforo indispensable a la síntesis del predecesor del ácido láctico, y por consecuencia la fermentación sigue otro rumbo, normal para esas células.

El *Bacillus Coli* desdobra también la glucosa formando ácidos diferentes, y aun cuando se agregue al medio en que vive fosfato bisódico, la fermentación sigue su curso, porque carece de cimasas adecuadas a la esterificación, que no pudo elaborar por producir habitualmente ácido láctico sin previa síntesis del ester fosfórico.

Con más exactitud es calificable de patológico el fenómeno de la producción de glicerina en gran cantidad por la influencia de los

álcalis. Para lo que a mi objetivo interesa más, este proceso anómalo de la fermentación alcohólica alcanza un valor industrial considerable, y durante la época bélica de 1914 a 1918 le utilizó Austria para proporcionarse la glicerina necesaria a los fines militares.

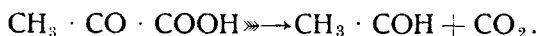
En los meritísimos trabajos de Pasteur se señala la glicerina como producto secundario de la glucometamorfosis, y en el vino también se ha señalado, pero no alcanzando de ordinario una cifra superior a 3 por 1.000. Si se cuida de alcalinizar el líquido en que se genera el alcohol glicérico, la cantidad de este poliol se eleva, pero la fermentación se complica por facilitarse la viabilidad de gérmenes que originan, entre otras sustancias, el glicol propilénico.

Connstein y Ludecke han conseguido, con la adición de cantidades cada vez mayores de sulfito sódico, disminuir la formación de alcohol etílico y de anhídrido carbónico, aumentando en cambio las de aldehído acético y de glicerina. Hecho tan notable y de gran interés teórico fué el punto de partida para la tecnología de la glicerina, cuando los Imperios Centrales estaban bloqueados y la saponificación de las grasas era insuficiente para obtener aquel alcohol en la cuantía necesaria a las exigencias de la campaña. El producto resultante del desdoblamiento sulfítico del azúcar se llamó *fermentol*, obteniéndose de él con técnicas no depuradas 25 vagones mensualmente. Es de presumir que en la actualidad, con las mejoras introducidas en la fabricación, los rendimientos sean mayores, y aun es fácil que se hayan seleccionado levaduras que aceleren el proceso de sesenta y ocho horas a cincuenta, y, por tanto, la fermentación sea más breve.

El ensayo de Connstein y Ludecke inspiró gran interés en todos los países en que la riqueza en grasas vegetales no es bastante

a sus necesidades, y como consecuencia de él, en 1920 se implantaba en los Estados Unidos de Norteamérica. Es como puede juzgarse uno de los triunfos más resonantes de la química bacteriológica en la última década.

No estorba el interés técnico al teórico para averiguar el proceso en su esencia química, antes al contrario, el estudio teórico se ve ampliado hasta profundizar en la patogenia de la diabetes. La escuela de C. Neuberg es la propulsora de estos trabajos tan instructivos. El ilustre maestro ha aislado como producto constante de la fermentación alcohólica el aldehído acético, que supone originado en la descarboxilación del ácido pirúvico por el influjo de la carboxilasa:



El aldehído es un receptor adecuado para el hidrógeno, que también se forma en la glucometamorfosis, según han probado en innumerables fitorreducciones los discípulos y colaboradores de Neuberg. Cuando el aldehído se reduce, prodúcese alcohol etílico, fenómeno completamente normal y designado por la escuela de Neuberg como primera forma de fermentación.

En el caso de producirse glicerina en proporción superior a la ordinaria, es decir, en la sulfitación, se forman cantidades equimoleculares de aldehído acético y de alcohol glicérico; luego el aceptor de hidrógeno ha cambiado, siendo verosímilmente otro aldehído, el metilgloxal en su forma enólica, $\text{CH}_2=\text{C} \cdot (\text{OH}) \cdot \text{COH}$, el que fija agua primero para generar aldehído glicérico, y éste retiene luego el hidrógeno, integrando de este modo el alcohol correspondiente: la glicerina. De tal manera se explica la segunda forma de

fermentación que sufren muchos azúcares, incluso la *d*-galactosa, por el influjo de la levadura y de otros sacaromicaceos, estudiados en aspecto tan interesante por Kumagawa (1).

Este tipo de desdoblamiento enzimico es, o parece hasta ahora, privativo del grupo de los hongos, pues las bacterias carecen de las mutasas indispensables para efectuar las transformaciones aludidas. Con las bacterias que yo he estudiado en colaboración con el Dr. Garmendia, no he conseguido producir cantidades ostensibles de glicerina, reveladoras de un cambio profundo en la marcha de lo que es fermentación normal para los bacilos (2).

Lo que se ha dado en llamar bloqueo del aldehído acético por el sulfito, por que le aísla formando la combinación alcohólico-sulfonada $\text{CH}_3 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{SO}_3\text{Na}$, y además alcaliniza el medio por liberarse una molécula de sosa por otra de sulfito, es un fenómeno tan notoriamente interesante en la bromatología, en la conservación de los vinos por los sulfitos, que no puedo sustraerme a citarlo en este sitio, para ponderar la transcendencia de este género de estudios a la mejora de los caldos vlnicos españoles, que constituyen importantísimo factor de la riqueza nacional.

Es incuestionable la formación de aldehído en el proceso de la fermentación, porque se ha podido aislar en forma de compuestos complejos con ayuda de reacciones de la química orgánica. Neuberg, empleando la condensación de Vorländer, utiliza la bimetil — 5 — 5 — bihidrorresorcina, que llama *dimedón*, la cual, en frío, y sin ningún disolvente ajeno al líquido en que efectúa el desdoblamiento, se combina con el etanal, produciendo el *aldomedón*.

(1) *Biochemische Zeitschrift*, t. 131, p. 148.

(2) *Anales Soc. Española Física y Química*, t. 21, p. 481.

Grab consiguió identificar el ácido pirúvico generador del etanal, provocando la precipitación del ácido α — metil — β — naftocinónico, ideada por Döbner.

La débil alcalinización de la mezcla fermentativa da lugar a un fenómeno dismutante, de igual categoría que el efectuado en la reacción de Cannizarro, en la que se produce una molécula de alcohol y otra de ácido a expensas de dos de aldehído, cuando éste se agita con potasa concentrada. El caso es idéntico en la fermentación alcohólica con alcalinizantes débiles, orgánicos o minerales, y en ausencia de fosfatos que induzcan la evolución del proceso en otro sentido; este fenómeno constituye lo que Neuberg denomina tercera forma de fermentación, y que se ofrece en muchas bacterias cuando se alcaliniza el medio lo suficiente para neutralizar los ácidos que se forman y que pueden ser obstáculo para que la fermentación continúe (1).

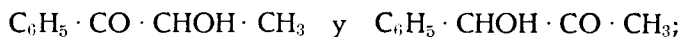
Correlativamente a la dismutación genéranse dos procesos de gran interés, uno semejante a la aldolización del etanal, que supone la existencia de un fermento capaz de unir dos moléculas de aldehído por los átomos de carbono, en combinación irreversible, y otro el de formación del ácido succínico por un mecanismo parecido, pero partiendo del ácido acético.

El primer caso, de descubrimiento reciente, debido a Neuberg, se atribuye al enzima llamado *carboligasa*, porque une no sólo los carbonos del aldehído acético, sino de otros análogos, en consonancia con los principios generales de la aldolización, y dos de las moléculas de aldehídos diferentes, como el benzoico y el acético.

(1) O. FERNÁNDEZ Y T. GARMENDIA: *Anales Soc. Española Física y Química*, tomo 21, pág. 481.

En realidad, la carboxilasa no une el aldehído benzoico con el acético, sino que previamente ha de descomponerse el ácido pirúvico, a tenor de lo que sucede en la síntesis de Perkin entre aldehídos grasos y aromáticos, o sea que el etanal ha de hallarse en estado naciente para que se aldolice con el aldehído benzoico.

La peculiaridad de la carboligasa es para estudiada con gran detenimiento, porque, como todo lo procedente de la vida, tiene un sello, hasta hace poco tiempo tenido por inconfundible: el de formar compuestos dotados de actividad óptica, es decir, que produce síntesis asimétricas. Al soldarse dos moléculas de aldehídos benzoico y acético por los grupos COH, pueden producirse dos sustancias:



la que genera la carboligasa es la última, el fenilacetilcarbinol levogiro.

En el caso de formación de benzoína con dos moléculas de aldehído benzoico, también debe producirse un enantiomorfo; pero como en la síntesis de laboratorio se obtiene el racémico, por ser las benzoínas cuerpos inestables, que se isomerizan pasando por la forma bienólica, que al recomponer el alcohol cetónico origina el ópticamente inactivo.

Cuando se somete a la acción de la levadura el piruvato sódico prodúcese una aciloína resultante de condensarse dos moléculas de aldehído acético, previa descarboxilación generadora del etanal; es el acetilmetilcarbinol legoviro y con una pequeña cantidad de butilenoglicol producido en la reducción de aquél.

La cualidad reductora del proceso de la glucometamorfosis im-

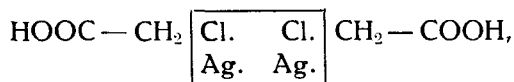
pide apreciar con claridad bastante la condensación aciloínica de los aldehidos, motivo por el cual debe eliminarse, si es posible, el efecto reductor. Este efecto es el que impide obtener rendimientos suficientes para enjuiciar los hechos en bloque, pues cuando se desea efectuar la condensación del aldehido valeriánico con el acético resulta un 80 por 100 de alcohol amílico, que se resta a la formación de la aciloína.

La carboligasa causal de esta síntesis no es privativa de las células de sacaromices; varios investigadores han encontrado entre los productos de fermentación por diferentes bacterias, acetilmetilcarbinol y glicol butilénico, cuyo origen debe buscarse en la actividad de la carboligasa elaborada por ellas, particularmente por el *Bac. lactis ærogenes*.

Tan singular hallazgo en los desdoblamientos con levadura tenía ya un precedente de gran valor en la bibliografía científica. Friedman, en 1909, en sus experiencias de circulación artificial a través del hígado con líquidos que contenían etanal, encontró que se producían cantidades considerables de ácido acetilético y de acetona, y a resultado igual le condujo la sustitución del aldehido acético por el aldol. Por el momento no podía interpretarse el hecho como obra de un enzima, pero diez y ocho años después se ha comprobado la existencia de una carboligasa que une los átomos de carbono del etanal en un compuesto de cuatro, para sufrir después el efecto complejo de las demás cimasas hepáticas.

El segundo proceso, la producción de ácido succínico, es conocido desde que se empezaron los estudios de la fermentación alcohólica y del vino. Sin desconocer la posibilidad de generarse succínico en la descomposición reductora de algunos aminoácidos bibásicos, su origen principal indudablemente es el ácido acético.

Si por las vías sintética y biológica es posible conseguir la soldadura de dos moléculas de etanal, también lo será la de dos de ácido acético. La calefacción del ácido monocloroacético con plata lleva al ácido succínico



camino ciertamente más difícil que el de una sencilla aldolización en medio alcalino; más difícil sería todavía conseguirlo con fermentos, puesto que se necesita uno que posea la aptitud para soldar carbonos y para efectuar una hidrogenación simultánea; en la levadura existe porque sus efectos están rigurosamente comprobados.

¿El fenómeno se efectuará en dos fases o en una sola?; es lo que no puede afirmarse, aunque por conjeturas es probable que se haga en dos. El ácido succínico producido en la unión de dos moléculas de ácido acético es deshidrogenado para convertirse en fumárico $\text{HOOC} - \text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$, lo cual prueba la existencia de un fermento reductor que actúa separando hidrógeno unido a átomos de carbono.

Merece registrarse hecho tan curioso, que constituye una prueba palmaria de la continuidad de las fermentaciones en los organismos. La fermentación fumárica se considera como específica de varios hongos—aunque se conozcan plantas que contienen el ácido en cantidades de importancia—, y, sin embargo, es el paso obligado en la vida para producir por un mecanismo hidratante ácido málico, que se halla en muchos frutos. La reducción tiene un complemento, en este caso particular, en la oxidación del ácido málico

en oxalacético, encontrado por Mayer en muchos animales. Este investigador ha dicho que a cada acto reductor, durante los procesos de la glucometamorfosis, corresponde uno oxidante, y que el descubrimiento de los últimos es uno de los problemas de máxima importancia en la química de las fermentaciones. La afirmación es extensiva a todos los actos oxidantes de la vida. El cofermento que Batelli y Stern han llamado *pneina*, provocador de la vitalidad temporal del tejido muscular muerto, es probablemente una mezcla de los ácidos que juegan importante papel en la glucolisis, puesto que Zaleski consigue exaltar la producción de anhídrido carbónico de las semillas muertas con un líquido azucarado que haya sufrido la fermentación alcohólica, y que otros investigadores han practicado la oxidación del ácido láctico en los caldos de cultivo de gérmenes anaerobios, con ácido fumárico.

LA ACCIÓN REDUCTORA

Destaca vigorosamente en la glucolisis por la levadura la acción reductora que supera a la producida por glándulas animales tan activas como el hígado. Continuamente se ha expuesto en las páginas anteriores que el hidrógeno se fija durante la conversión del azúcar en alcohol, sobre diferentes sustancias elaboradas en el proceso químico, y estas interpretaciones de distintos investigadores han sido confirmadas en la reducción de muchos compuestos agregados al líquido azucarado a fermentar. Constituye este conjunto de hechos un capítulo interesante de las fitorreducciones, porque apenas existe función de la química orgánica susceptible de adquirir hidrógeno, que no lo efectúe. El primer caso observado fué el de la conversión del furfural en alcohol furfúrico, y después se ha

generalizado en la serie de los aldehidos aromáticos, obteniéndose los alcoholes primarios respectivos. Las acetonas forman los alcoholes secundarios. Dos fenómenos notables ocurren en esta clase de reducciones de compuestos carbonílicos: uno de transcendencia tan considerable a los procesos vitales como es la producción de cuerpos ópticamente activos; el aldehido valerianico racémico forma el alcohol amílico correspondiente *levogiro*; las unicetonas generan el alcohol *dextrogiro*, y en cambio alguna bicetona, como el biacetilo, forma el glicol butilénico, que desvía a la izquierda.



El acetilcarbinol conduce al glicol propilénico, también *levogiro*; el *d*-citronelal origina el *l*-citronelol, y aun podrían agregarse algunos ejemplos más, tan curiosos como los expuestos.

Esta transformación en el compuesto ópticamente activo, partiendo del inactivo o en el enantiomorfo, es un caso excepcional que tiene algunos similares, pero no son como ellos verdaderos casos de síntesis asimétrica. El primero de síntesis de esta naturaleza se debe a Rosenthaler, que utilizó la emulsina para obtener los nitrilos alcohólicos combinando los aldehidos aromáticos, entre otros, el benzoico con el ácido cianhídrico.

Los originados poseen la cualidad de ser *dextrogiros*, y por tal motivo la oxinitrileasa productora recibió el nombre de *d*-oxinitrileasa. Con esta orientación Kriebel halló que el fermento aislado de las hojas del *Prunus Serotina* sintetiza con iguales sustancias y en idénticas condiciones una cianhidrina *levogira*, y Wenth llegó al mismo objetivo con los preparados de las hojas de *Taraktogenos Blumei*.

En contraposición al experimento de Rosenthaler se halla el de Feist, efectuado en las mismas condiciones, con la diferencia de hacer pasar una corriente de aire por la mezcla, con lo cual, en lugar de separar la cianhidrina dextrogira se aísla la forma óptica opuesta.

Estos ejemplos los han reproducido Bredig y Fiske substituyendo la emulsina, fermento contenido en la almendra amarga, por un alcaloide ópticamente activo, resultando que la quinina, compuesto levogiro, produce la cianhidrina del ácido mandélico-*d*, y la quinidina, dextrogiro, el inverso. Con alguna anterioridad, en 1904, consiguió Marckwald (1) obtener ácido valeriánico levogiro, calentando la sal de brucina del ácido metil-etil-malónico hasta perder anhídrido carbónico.



La consecuencia es que los alcaloides inducen a un compuesto de contrario signo óptico, y, por consecuencia, hay que admitir que la emulsina induce a la actividad rotatoria por ser un cuerpo que la posee. Es lo más semejante a lo que ocurre cuando se calientan ácido cinámico o aldehído benzoico, que carecen de átomo de carbono asimétrico, con ácido tartárico dextrogiro y resulta un cuerpo dotado de actividad óptica que forzosamente ha de ser inducida.

Si se quiere imitar la obra de los fermentos como pretendieron Cohen y Whiteley (2), y después Mac Kenzie logró (3) reduciendo

(1) *Berichte*, t. 37, p. 349. 1904.

(2) *Trans. Chemical Soc.*, t. 79, 1.305.

(3) *Trans. Chemical Soc.*, t. 89, 365.

ácidos pirúvico o mesacónico, hay que proceder con los esteres del mentol levogiro o del alcohol amílico; luego siempre hay que dar cierta intervención a un compuesto poseedor de actividad óptica.

Veinte años después de la síntesis de los nitrilos mandélicos con emulsina, el propio Rosenthaler ha vuelto a estudiar el problema de la síntesis asimétrica con levadura de cerveza y los aldehídos isovaleriánico y paratoluico para obtener nitrilos que desvían a la derecha. Pero el problema de la asimetría sólo por reducción es mucho más sorprendente y quizá menos accesible a la inteligencia por su maravillosa sencillez. En realidad existe una fuerza que motiva la creación del poder rotatorio, en el ejemplo de Rosenthaler, la actividad de los albuminoides de la levadura y de la glucosa que ésta descompone; pero ¿cuál es la razón de que con unos compuestos se origine la forma dextrorrotatoria y en otro su inversa óptica? En la imposibilidad de buscar la causa en la valencia electrónica como en los fenómenos complicados de la inversión de Walden, pueden intentarse tres ensayos de explicación.

No es frecuente entre las especies botánicas que contengan los dos enantiomorfos, aunque haya algunas pruebas en contrario, como la de los quinos, que contienen juntamente pares de isómeros ópticos: la quinina con la quinidina y la cinconidina con la cinconina, aunque siempre con predominio considerable de uno de los enantiomorfos; lo frecuente es que cada esteroisómero se halle en una planta, como acontece con los terpenos del grupo del limoneno repartidos en vegetales de diferente jerarquía; la forma dextrogira es el carveno existente en la esencia de alcaravea (*Carum Carvi*); la levogira es el citreno abundante en las esencias de auranciáceas, y la racémica es el dipenteno o cineno contenido en las de trementina de Rusia y de Suecia. Siendo este grupo de ejemplos el más

corriente, hay que pensar en que las plantas inducen una actividad óptica con exclusión de la otra, aunque los productos que elabore sean de igual naturaleza química. ¿Sus protoplasmas serán diferentes o la estructura de sus coloides variará en algún aspecto todavía no conocido?

En las experiencias de Abderhalden y Fodor, relativas a la hidrólisis de varios polipeptidos, entre otros de la glicil-*L*-leucina por el macerado de levadura con carbón animal, se encuentra un dato que puede servir de argumento comprobante de la diversa conducta de unos antípodas ópticos respecto de otros que son adsorbidos por el carbón. La hidrólisis, fenómeno aparentemente sencillo, se complica con el empleo de un adsorbente por el que muestra preferencia un estereoisomero; cualquiera de los dos posibles se fija con gran velocidad con el carbón y el otro con lentitud tan exagerada, que prácticamente no hay adsorción.

Hecho parecido puede ocurrir con los coloides albuminoideos, que *adsorben* con velocidades diferentes los estereoisomeros formados quizá en el primer momento en proporciones iguales. Quedaría en este caso de la vida, el explicar cómo al extraer los alcaloides, por ejemplo, se halla un isomero óptico y no los dos, puesto que el adsorbido allí se encontraría. Las acciones vitales no se interrumpen en el acto de fijarse sobre el coloide un compuesto, sino que continúan todos los procesos oxidantes e hidrolíticos que le descompongan en sustancias a eliminar o útiles al resto de las transformaciones protoplásmicas.

Poca luz se entrevé por el lado de los albuminoides capaces de inducir la actividad rotatoria. ¿Podría aclararse la duda poniendo en juego la estructura de los compuestos aceptores de hidrógeno y de los originados en la reducción? Ciertamente que no la resolverá en

absoluto, pero esto no debe ser obstáculo para examinar las posibilidades de la resolución, por ser necesario tomar en cuenta el gran número de factores que intervienen en todos los actos vitales.

Los aldehidos que han servido para estas experiencias tienden a producir alcoholes levogiros; los compuestos cetónicos con un carboxilo engendran también los alcoholes levogiros, y las bicetonas en orto conducen a los glicoles, que desvían a la izquierda. Las unicetonas causan invariablemente un alcohol dextrogiro. Es decir, que sustancias ácidas o susceptibles de generar un ácido por una acción química débil producen compuestos levogiros.

En la síntesis cianhídrica de azúcares de E. Fischer, la *d*-glucosa genera en proporción desigual dos nitrilo-alcoholes enantiomorfos, pero la *d*-mannosa no produce más que uno de los dos ópticamente posibles, persistiendo esta cualidad en todo el grupo mannósico, puesto que la mannoheptosa obtenida en la síntesis mencionada es levogira y produce, continuando sobre ella el agrupamiento de átomos de carbono asimétrico, una sola octosa, y ésta, a su vez, una nonosa de igual signo óptico.

Hay que contar por los datos aducidos con un agrupamiento molecular definido y hasta con una configuración estereoquímica, como se infiere de este ejemplo notable de síntesis mannósica, por existir en la mannososa un reparto de hidrógeno y de oxhidrilo en el carbono segundo, diferente que en la glucosa productora de dos nitrilos.

El tercer ensayo se refiere a la concentración en hidrógeno del medio en que se producen los enantiomorfos. En las experiencias de Feist, ya citadas, se ve cómo cambia la actividad rotatoria del nitrilo obtenido con sólo practicar la síntesis en corriente de aire.

También Ultée (1), recogiendo antiguas observaciones, señala el hecho de que la producción de nitrilo es influenciada de distinto modo por sustancias que originen iones hidrógeno u oxhidrilo. Las síntesis realizadas por Feist coinciden en este punto con las de Ultée, puesto que la aireación violenta conduce a transformar parte del aldehído benzoico en ácido.

Posteriores trabajos de Nordefeldt (2) niegan la existencia de las emulsinas de Rosenthaler y sostienen la hipótesis quizá aventurada de que la síntesis cianhídrica es obra del ácido benzoico y no de un catalizador bioquímico.

Aunque las conclusiones de Nordefeldt hayan sido contradichas por las de Kriebel y Wieland, hay una interpretación que estimo acertada: la referente a la influencia de los iones hidrógeno que orientan la actividad óptica en determinado sentido. De los trabajos acerca de la reducción catalítica y con sodio efectuados en el laboratorio de Química Biológica por el farmacéutico mayor A. González, atinentes a la transformación de la mentona y de la pulegona en mentoles activos, se deduce que la reacción ácida o alcalina lleva a un estereoisómero y no a los dos, o al racémico.

La conversión de la pulegona en mentona con carbón-paladio en líquido acético, origina un producto fuertemente dextrogiro, que al separarle el ácido, desciende en poder rotatorio. Esta *d*-mentopulegona reducida con sodio en éter acuoso genera un mentol levogiro.

El segundo fenómeno es el que atañe al rendimiento y ha sido causa de discusiones de interés teórico. La cantidad de alcohol ori-

(1) *Recueil de travaux chimi. d. Pays Bas*, t. 28, p. 248.

(2) *Biochemische Zeit.*, t. 118, p. 17.

ginado en la reducción aldehídica nunca es inferior a 10 por 100, y algunas veces alcanza a 80, lo cual supone que el hidrógeno no procede del agua, o en otros términos, no se trata de una dismutación de acuerdo con el principio de Cannizzaro, porque si fuese así, deberían formarse 50 por 100 del alcohol y 50 del ácido respectivo, hecho que implica la intervención de una molécula de agua.

Los actos reductores ofrecen en los procesos enzimicos una complejidad grande, como puede juzgarse de los hechos aludidos, y de otro para el que no se halla explicación aceptable. Si se provoca una fermentación con levadura en un líquido que contenga un kilogramo de azúcar, prodúcense 200 gramos de alcohol; si se reemplaza el hidrato de carbono por ácido pirúvico, se separan 480 gramos de alcohol, y si se hace la fermentación del ácido con glicerina, el rendimiento en alcohol es de 625 gramos.

No se limita la acción hidrogenante a transformar aldehidos y acetonas en alcoholes de igual número de átomos de carbono, sino que su alcance es mucho mayor. Los derivados nitrados de los carburos aromáticos se convierten en las respectivas aminas con igual facilidad que si se emplease el cloruro estannoso y con gradaciones sucesivas, como se logra con el uso de diferentes reductores minerales; así, el nitrobenceno pasa primero a nitrosobenceno y después a fenilhidroxilamina, antes de formarse anilina.

Innecesario parece advertir, tras de lo escrito, que los compuestos sulfurados orgánicos y minerales pierden por el influjo de la levadura su azufre o se transforman en un grupo químico más hidrogenado. Los derivados halogenados no sufren cambio en el carbono que soporta el halógeno, pero sí en las funciones oxigena-

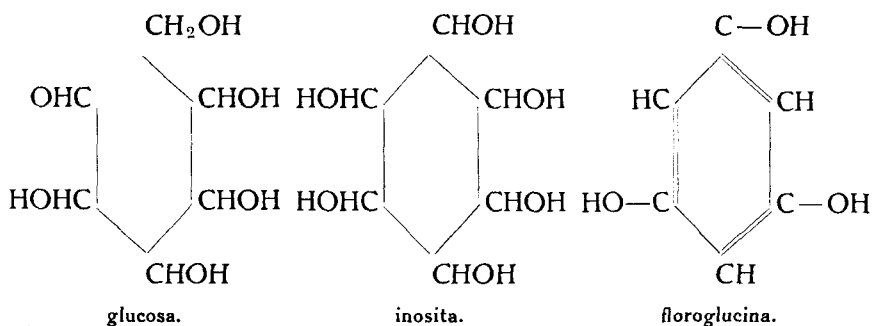
das. El cloral adquiere hidrógeno para convertirse en alcohol tricloroetilico, hecho que solamente se ha conseguido en la fermentación alcohólica, y es utilizado como punto de partida de la síntesis industrial de uretanos de altas cualidades narcóticas.

LA CICLIZACIÓN DEL AZÚCAR

Los líquidos procedentes de la transformación química de la glucosa contienen inosita, unas veces libre y otras combinada con el ácido fosfórico. Investigar este ciclanol es un medio de distinguir líquidos fermentados de otros preparados artificialmente.

En las plantas fórmanse por la influencia de las radiaciones solares, y con el concurso de enzimas, variados azúcares de cadena abierta, y, sin embargo, en muchas hojas y en gran número de frutos se encuentran inosita y sus esteres fosfóricos, o sus anhidroles metilicos, dambonita, etc. Es verosímil que el ciclanol producido lo sea a expensas de un isomero alifático, y como hasta hoy nada se ha conseguido por procedimientos físicos, debe pensarse en una acción enzimica que ciclice la cadena abierta de seis átomos en un isomero que carece de cualidades reductoras y fermentescibles. La ciclización bioquímica no sería excepcional. Algunos investigadores han podido observar cómo hojas de varias plantas, sumergidas en una disolución de glucosa y expuestas al sol, se van cubriendo de unos cristales, que son de floroglucina, fenol triatómico muy difundido entre los vegetales, bien al estado de libertad o constituyendo anhidroles y esteres complejos y acetonas diversas en sus cadenas laterales. La ciclización es en este caso evidente, y como fase intermedia de ella debe ser la inosita resultante de

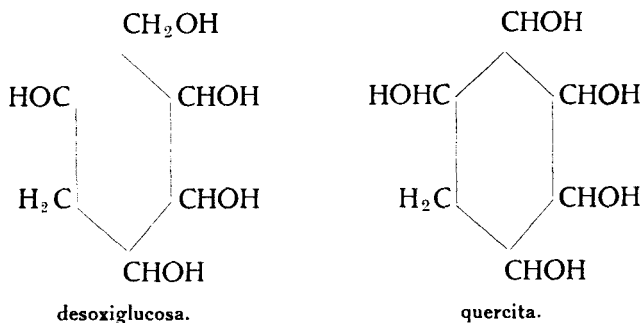
cerrarse inmediatamente la cadena, y la floroglucina como término final de una oxidación nuclear y de una deshidrogenación consecutiva.



La ciclización no sería violenta, porque al fin es cambio de postura del hidrógeno alcohólico primario, que pasa a reducir el grupo aldehídico extremo, convirtiéndole en alcohol secundario, y como resultan dos grupos univalentes, la cadena se cierra por la tendencia de las de seis átomos a formar anillos.

No debe ser único el caso el de la glucosa en lo referente a la ciclización. A medida que se profundiza más el análisis de los componentes de los vegetales, se hallan sustancias que se creía sólo existentes en corto número de especies botánicas: esto ocurre con la quercita, que parecía peculiar de la bellota, y que existe en varios frutos. El profesor Madinaveitia la aísla en proporciones mayores que de la bellota, del fruto del palmito. (*Chamaerops humilis*.) Hasta hace pocos años no se conocían azúcares de seis átomos de carbono que contuvieran cinco oxígenos, y algunos conocidos se calificaban como metilpentosas. En la actualidad, el estudio metódico de los azúcares procedentes de la hidrólisis de varios glucósidos, ha inducido a establecer un grupo titulado desoxiglucosas, de

las que es tipo el azúcar resultante de la descomposición hidrolítica de la digitalina; la digitoxosa de cuatro oxígenos.



Uno de estos azúcares probablemente origina al cerrarse su cadena abierta la quercita, que, como la inosita, ha perdido sus condiciones reductoras y fermentativas.

En igual criterio puede juzgarse de la procedencia del ácido quínico, tan frecuente en las plantas formando parte de taninos, y quizá le comporte el Dr. Ruzicka al admitir la posibilidad de ciclización bioquímica del ácido oléico en civetona, cuyo anillo de 17 átomos de carbono, no tiene otro similar que el de la muscona, principio oloroso del almizcle.

En la levadura, en la uva, en las habichuelas y, en general, en los vegetales formadores de compuestos cíclicos, originarios de los isómeros alifáticos, debe existir el fermento que efectúa la ciclización de la cadena. He empezado por buscarle, con mi colaborador el Dr. Pizarroso, en la levadura, por ser el producto natural de mayor riqueza en toda especie de enzimas, y en la bellota, rica en quercita, tratando de aislarle por los métodos conceptuados útiles, exceptuando los de Willstätter, que ensayo actualmente. Quizá la causa de no haberle encontrado es su inestabilidad frente a los

reactivos que se emplean en la extracción, tan fuertes como el alcohol, por lo cual es necesario intentar el uso de disolventes menos activos que no le destruyan o invaliden su acción. Tschirch ha pretendido aislar un grupo de fermentos que otros investigadores como Oppenheimer reputan hipotéticos y que ha llamado ciclokleiasas.

EL COFERMENTO Y LOS ACTIVADORES

Cuando se dializa zumo de levadura pierde su capacidad fermentativa por separarse una sustancia necesaria de naturaleza termoestable, pero no resistente a la desecación a 100 grados; reuniendo las sustancias separadas en la dialisis es nuevamente posible la glucolisis. Parecía indiscutible que ese cofermento fuese por su calidad un fosfato, porque en estas sales radican la termoestabilidad y la aptitud para la dialisis, y además porque durante la evolución de las células de levadura queda libre ácido fosfórico. Por añadidura, en los eritrocitos se ha aislado un compuesto fosfórico del ácido glicérico, al que se concede importancia en el desdoblamiento de la glucosa. De las experiencias de Hagman se infiere la absoluta necesidad de fósforo para la actuación del cofermento. La escuela de Neuberg sostenía que el cofermento o el activador se formaban como un acto más de la glucometamorfosis. Está ya fuera de duda que no son los fosfatos ni sus esteres glucosídicos los actuantes de cofermento, pero no se sabe mucho más, aunque a la industria interese considerablemente conocer con exactitud cuál o cuáles sean los cofermentos necesarios para la fermentación alcohólica.

Una conclusión práctica para la química industrial surgió de

estos estudios relacionados con el cofermento: las razas de levadura que son incapaces de fosforilizar apenas tienen cofermento, de suerte que la primera fase de la actividad de éste, descubierta por Svanberg y Virtanen, es la de provocar la esterificación de los fosfatos.

Las razas de levadura pobres o carentes de cofermento son las altas, pero pueden adquirir la capacidad esterificante agregándolas cofermento. Este hecho es lo que se conoce con el nombre de efecto de Euler.

La presencia del aldehído acético como efecto continuo de la carboxilasa desdoblante del ácido pirúvico llevó a Neuberg y a sus colaboradores a estudiar el influjo de 71 aldehídos, los cuales, en mayor o menor grado, activan la fermentación. Naturalmente no se forman más de tres, y ante hecho tan claro ocurrió pensar que la actividad del cofermento estaría vinculada a la reducción.

Susceptibles de reducción son los ácidos cetónicos, de los que uno está bien demostrado, el pirúvico, mas no los otros que se ensayaron y que pueden resultar de las transformaciones de los aminoácidos generados en la autólisis de las células del sacaromices. Llevando a la práctica estos aminoácidos, se ha visto que la alanina eleva el rendimiento en 33 por 100, el triptofano en 50, y la esparaguina y la ereptona en 100. Si se analizan las fases de la fermentación, se encuentra que estos productos no influyen sobre el conjunto de las enzimas, sino sobre uno solo, sobre la carboxilasa, es decir, que son activadores de la formación de aldehído acético.

En el curso de la glucometamorfosis las células elaboran vitaminas, las cuales, aisladas, también se conducen como activadores de la fermentación. Suponiendo Abderhalden (1) que las vitaminas

(1) *Fermentforschung*, año VIII, pág. 538.

de levadura son de composición parecida a la piperacina, ensayó esta sustancia, su homólogo metílico y la leucilpiperacina, hallando la sorpresa de que activan sensiblemente la fermentación.

Con finalidad idéntica Ruhl utiliza el extracto de la *Capsella bursapastoris*, y Mayer el macerado de la *Urtica urens*.

Los humores de procedencia animal también se han sometido a experimentación con buenos resultados: Rosenow empleó la tireodina y preparaciones medicinales de tiroides; Tomita, la tiroxina, y la escuela de Abderhalden, la adrenalina. La colina y su derivado acetílico son inactivas. En la hipótesis de que las materias llamadas amargas producen cambios en la composición del líquido a fermentar, Neuberg y Samberg (1) han empleado absintina, elaterina, cetrarina, cubebina, aloína y picrotoxina, las cuales, exceptuando las dos últimas, se conducen como estimulantes de la fermentación; y en el supuesto también de que los ácidos biliares provocasen cambios en la tensión superficial que tanto afectan a la vida de muchos microorganismos, han ensayado los ácidos colálico, desoxicolálico, apocolálico y abiético, que como tales ácidos actúan estimulando la fermentación, pero salificados la suprimen. Las sales sódicas de los ácidos nafténicos, silvico y de los extraídos de la copaiba, también inhiben el proceso fermentativo.

Los actos oxidantes de la fermentación alcohólica son numerosos, y para exaltarlos, Neuberg y sus discípulos decidieron el uso de la cistina, puesta en boga por Hopkins como tipo de catalizador oxidante; ni el aminoácido solo, ni el peptido cistina-ácido glutámico, exaltan más que con gran moderación los procesos de la glucometamorfosis. Todavía alcanza menos interés el empleo de la

(1) *Biochem. Zeitschrift*, t. 126, pág. 153.

queratina soluble, que como todos los albuminoides queratínicos contiene azufre en gran cantidad. Adviértese que la medida de la aceleración la efectúan en los laboratorios de Neuberg, en Berlín, Dahlen, recogiendo el gas carbónico desprendido y llevando a la vez una experiencia sin catalizador.

La cuestión referente al estímulo que provocan los compuestos orgánicos sulfurados no ha sufrido cambio alguno con los trabajos de Abderhalden. Este investigador observó, que cuando se prolonga la diálisis de los autolizados de levadura de cerveza, el producto resultante, lejos de activar la fermentación, la inhibe de modo bien notorio; por tanto, imaginó que el cofermento cambia de propiedades en las diálisis lentas, lo cual puede atribuirse a la acción digestiva de los fermentos del sacaromices, o a la hidrolizante de nucleasas y fosfatasas.

Los aceleradores son, en opinión del investigador citado, sustancias que precipitan con el cloruro mercúrico, y como los dializados y las maceraciones de células de levadura lo hacen y además dan fuerte reacción de cisteína, ensayó, como Neuberg, este aminoácido sin éxito digno de apreciación técnica.

De particular importancia son los ensayos que la escuela de Neuberg, de un lado, y Abderhalden, de otro, emprendieron en el año 1921 acerca de la influencia del carbón de distintos orígenes en fermentación. Los llamados fenómenos del carbón proceden sin duda de sus cualidades *adsorbentes*, a las que se atribuyó papel muy principal cuando se supuso que separaba por adsorción las materias tóxicas inhibidoras de la capacidad glucolítica de las células de levadura. Al menos en parte esto no es demostrable.

Aunque en la interpretación de los resultados existe discrepancia, hay acuerdo en lo relativo a la manera de exaltar la fermentación.

tación y a la rapidez con que se forma aldehído acético, hasta el punto de que no es necesario acudir a los reactivos de laboratorio para investigarlo; basta con el olfato para apreciar la aparición de fuertes cantidades, que, según estima Abderhalden, toman su origen parcialmente de la oxidación del alcohol etílico, sin que tal juicio menoscabe las opiniones de Neuberg relativas a la génesis del alcohol por reducción del aldehído acético.

La causa de la exaltación por el carbón no se ha encontrado tan segura como de experiencias minuciosas de Abderhalden parecía deducirse. El carbón *adsorbe* el etanal, y de éste se sabe que es un acelerador.

Sin poderse afirmar concretamente, hay motivo para suponer que el carbón es un coadyuvante de la carboxilasa, hallándose el principal apoyo de esta idea, en que durante la fase descarboxilante de la fermentación es necesaria la presencia de gran masa de levadura.

El talco y el kaolín actúan, aunque cuantitativamente inferiores, de modo parecido al carbón: éste, empleado solo, induce la glucólisis, pero la cantidad de aldehído formada es muy pequeña, lo cual equivale a decir que el carbón es un fermento capaz de desdoblar la glucosa. Ciertamente, no sólo transforma la glucosa, sino que Feigl (1) ha estudiado la producción de anhídrido carbónico a expensas del ácido oxálico y la de ácido yódico con el yoduro potásico y suspensiones de carbón.

Abderhalden supuso que el carbón actuaba motivando reacciones de superficie; consecuencia a la que ha llegado también Warden (2) por analogía con la conducta de las soluciones coloidales

(1) *Zeit. f. anorganische Chemie*, t. 119, pág. 305.

(2) *American J. of Physiology*, t. 57, pág. 454.

empleadas en las reacciones serológicas para sustituir a las naturales.

Recientemente, Irving (1) ha demostrado que la glucosa disuelta en líquido isotónico desaparece si se suspenden en él eritrocitos, siendo la glucolisis función lineal de la concentración del azúcar. Interpreta el autor este fenómeno como una reacción de superficie, sin que en ella intervenga el ácido fosfórico, opinión impugnable considerando otros hechos compatibles con una forma de degradación particular de los glóbulos rojos, como es la producción del ester fosfórico del ácido glicérico.

El cofermento ha sido aislado, y Meyerhof ha seguido sus efectos sobre el músculo de animales precipitando el autolizado de levadura por alcohol de 50 grados. La masa que contiene el cofermento agregado al músculo produce ácido láctico en cantidad diez veces mayor que la ordinariamente elaborada, acelerando la esterificación del ácido fosfórico hasta el agotamiento de éste.

El cofermento actuante de esa manera es idéntico al separado triturando el músculo a —2 grados con solución isotónica, y con gran rapidez exalta la producción del ácido láctico aun con el glucógeno.

Tal hecho, que conexas la glucometamorfosis en la tina de la fábrica y en el músculo, lleva a preguntar si la insulina separada del páncreas es el verdadero cofermento. Ni un solo dato concreto existe entre los millares de experiencias de todo orden efectuadas en la clínica y en la industria que pueda señalar una aproximación a la verdad; es probable que no sean la misma sustancia, pero como hecho cierto sólo se sabe que la insulina es necesaria para la pro-

(1) *Biochemical Journal*, t. 20, pág. 613. 1926.

ducción del aldehído acético, con lo cual, si se demostrase de modo indudable, sólo se deduciría la consecuencia de que la insulina es una carboxilasa o algo semejante. Además, los trabajos de aislamiento de Abel y Geiling (1), señalan en la insulina la existencia de azufre y la ausencia de fósforo, característica opuesta a la del cofermento y en consonancia con los de Funk (2), que admite la posibilidad de un péptido integrado por 15 aminoácidos $C_{69} H_{102} O_{22} N_{18} S$.

En realidad es prematuro hablar del cofermento en la glucolisis, porque en ella intervienen varios fermentos de los que sólo se juzga por sus efectos, y como cada fermento puede tener su colaborador y su activador, mientras no se aisle cada uno, será imposible conexas los resultados de los investigadores en multitud de puntos de la biología química de la fermentación alcohólica. No se oculta la dificultad de enlazar todas las hipótesis imaginadas para seguir hechos entrevistos en distintos laboratorios, porque las razas de levadura con que se trabaja son diferentes, poseen actividad variable y permeabilidad celular distinta; además, las múltiples cimasas existentes ofrecen estabilidad limitada a los reactivos y agentes de purificación.

OTRAS INDUSTRIAS DE FERMENTACIÓN

No he pretendido en las páginas anteriores presentar el estado actual de la fermentación alcohólica; quizá haya algo de esto, pero lo que me propuse fué buscar unas generalizaciones que abarcasen la química de la glucolisis por catalizadores biológicos en la tina de

(1) *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, t. 25, pág. 421.

(2) *Science*, t. 63, pág. 401.

fermentación, en el músculo o en la sangre de un diabético y hasta en el tumor de un canceroso; he querido excitar la atención de las personas que puedan interesarse por el estudio de cuestiones tan sugestivas y de valor industrial tan considerable, y además ofrecer los problemas numerosos de todo orden que de la fermentación alcohólica derivan, para extenderlos a otras industrias de la microbiología que en España deben desarrollarse. Necesariamente, para profundizar en este último aspecto sería útil realizar un trabajo relativo al estado de las industrias de la fermentación alcohólica, que no es sencillo en un país en que la estadística tiene pocos prosélitos. Mas no es el objetivo de este discurso.

Prescindiendo del vino, producto industrial de fermentación, convendría estudiar las destilerías de alcoholes como secundarias y la fabricación de cervezas. La cerveza se va difundiendo en España quizá en mayor grado del conveniente al consumo del vino, y sus enlaces científicos con la industria no guardan proporción con el abundante uso de esta bebida. Las fabricaciones de alcoholes, tanto de destilación de orujos como los precedentes de fermentar melazas de remolacha o de hidrolisis de las féculas, tampoco tienen desenvolvimiento científico proporcionado a la cuantía de la producción. En general, las industrias en que median procesos fermentativos adolecen de los mismos defectos que otras nacionales en que la ciencia no interviene de modo directo en la marcha de las fabricaciones. Obedece, en parte, a falta de bacteriólogos especializados en asuntos de técnica industrial, porque este género de trabajos hasta hace pocos años sólo han sido dirigidos a la resolución de problemas terapéuticos o sanitarios.

Por fortuna para la industria, el estado de cosas en que vivíamos ha cambiado, y aun cuando no haya especialistas pueden for-

marse con escaso trabajo, por existir núcleos de personas capacitadas por su formación biológica de abordar los problemas que susciten las industrias aludidas.

Mucho tiene que adelantar la preparación científica de nuestros viticultores para imprimir a su industria la prosperidad adecuada a este sector de la vida española. Desde la selección de levaduras, imitando a la industria cervecera, pasando por el rejuvenecimiento con los llamados *pies de cuba* y terminando en la degeneración, son asuntos de técnica microbiológica sencilla. No hay que agregar que las enfermedades de las bebidas fermentadas producidas por bacilos diversos necesitan del concurso del bacteriólogo para el aislamiento y cultivo de los gérmenes.

La elaboración de sidras, que ha adquirido en el Norte de España un desarrollo muy estimable, también prescinde de la utilidad de la bacteriología, aunque los procesos de la fermentación sigan rumbo análogo a los del mosto de uva.

Ligada a las precedentes industrias se halla la del vinagre, resultante de la oxidación del alcohol del vino, de la cerveza o de las sidras. ¡Cuánto no ha luchado la bacteriología para aislar un germen acetificante que actúe con rapidez sobre el alcohol, que no altere el gusto del vinagre y le mantenga transparente! Más de doce especies de *Bacterium* se emplean en la práctica para acetificar los productos expresados, alguna cultivable de preferencia en polipéptidos. Si en la acetificación es de la mayor importancia poseer una bacteria excelente y de resistencia a los ácidos para que la continuidad de la oxidación no se impida al anularse por la acidez, la aptitud del catalizador bioquímico, la producción de perfume y la contaminación por gérmenes extraños y aun por anguilas son dos aspectos que deben tenerse en cuenta al preparar un

buen vinagre. Las tres cuestiones implican los cuidados y las investigaciones del bacteriólogo.

Industria también de fermentación, aunque de tipo diferente de la alcohólica, es la láctea. Tan de fermentación es, que se calcula que, a pesar de no hallarse repartidos uniformemente los microbios, existen en un gramo de queso cerca de cinco millones. En las queserías viven los gérmenes en las paredes, y se contamina hasta la sal que se utiliza en la elaboración.

¡Y de qué transformaciones es teatro el queso! La primera flora que realiza una acción sobre el hidrato de carbono de la leche, prepara el campo para otra que, a la vez, es capaz de hidrolizar grasas y de quemar algún ácido procedente de la saponificación, e invalidada la especie para continuar vegetando en un medio ácido, deja el terreno dispuesto a las bacterias proteolíticas que inician la peptonización de la caseína, con lo cual la primitiva acidez se neutraliza para dar paso a los *Tyrothrix*, y luego se convierte en alcalinidad, a propósito para otra clase de microbios que viven de preferencia en medios alcalinos, realizando escisiones de todo orden en los aminoácidos disgregados de los polipéptidos. En los procesos peptonizantes, análogos a los efectuados en el intestino, se engendran aminoácidos sencillos, como la tirosina, que, descarboxilados, ocasionan aminas elevadoras de la presión sanguínea.

Cada especie de hongo o de bacteria posee cualidades diferentes, y, por tanto, viviendo a expensas del queso a las temperaturas que sean más adecuadas, da motivo a la aparición de propiedades distintas, sobre todo del olor. Los hongos son más convenientes que las bacterias desde varios puntos de vista, y por tal circunstancia el estudio de algunas especies de *Penicillium* ha inducido

a mezclarlas, a título de fermentos, con la leche para elaborar los quesos de Coulonmiers, de Brie y de Camembert.

Poco he de esforzarme para demostrar que la fabricación se halla dentro del radio de acción del bacteriólogo y de que a éste hay que acudir en primer término cuando se trate de obtener productos de la calidad que se desee. Por si mis afirmaciones no fueran de suficiente garantía, voy a corroborarlas mencionando los experimentos efectuados por Gorini con cien muestras de queso de Parma. En las primeras cincuenta se sembraron las especies seleccionadas para provocar distintas transformaciones en los componentes; en las cincuenta restantes no se agregó nada extraño a la leche y al coagulante. Al cabo de algún tiempo fueron catados los lotes por personas de buen paladar y sin saber de qué se trataba, unánimemente se decidieron por la mejor calidad del lote preparado con siembras de fermento.

Ignoro si algún establecimiento quesero ha requerido el concurso de un microbiólogo, ni si por profanos nacionales se ha intentado una siembra en buenas condiciones con el propósito de obtener una variedad determinada de queso. Tampoco existen en el país Centros que preparen cultivos en leche aséptica para realizar las siembras, como ocurre en París, en el Instituto Pasteur, donde hay una sección dedicada a investigar en este orden de conocimientos.

EL INSTITUTO DE FERMENTACIONES

Ha llegado ya el momento de atender debidamente las exigencias científicas de un grupo de industrias —las enumeradas en las páginas anteriores; la del tabaco, nueva en España; la de curtidos

y la del ensilado de semillas y forrajes— que viven una vida poco próspera por falta de cuidados serios. En España carecemos de un Instituto de Fermentaciones en que se trabaje con cuanto se relaciona con las distintas modalidades de los procesos enzimicos. Hace dos años se ha celebrado solemnemente el L aniversario de la fundación del Instituto de Fermentaciones de Berlín, que dirigió el eminente profesor Delbrüch, sostenido con la ayuda del Estado prusiano y por un grupo de fabricantes de cervezas y de licores, que funciona de modo parecido al Instituto Mellon, de Pittsburgh, también costado por los industriales interesados en la evolución regular de sus productos. Ponderó el Director del aludido Centro en su discurso las ventajas que a la industria alemana han aportado las investigaciones de las personas que allí trabajan en el orden bioquímico de preparación de medios, condiciones de humedad y aireación de la malta, de aislamiento de enzimas y bacterias acéticas, y en el mecánico de construcción de aparatos destilatorios y de procedimientos para conservación, etc. «El máximo esfuerzo común —dijo— ha sido mantener las industrias al nivel de los progresos de la ciencia, trabajando aisladamente o en colaboración con el Instituto de Investigaciones para el almidón y desecación de patatas y con el de la industria azucarera.»

No aspiro a tener en España instituciones tan espléndidas como el Laboratorio de Berlín, o los magníficos y acreditados de Calsberg. Hay que contentarse con menos, y este menos podría ser algo parecido a lo que ha hecho el Instituto Pasteur, en París.

Entre nosotros existe el Instituto Nacional de Higiene de Alfonso XIII, organismo similar al Pasteur francés, en donde se hallan bacteriólogos capacitados para resolver los problemas que los fabricantes les encomendaran, creando una Sección de fermentaciones,

en la que trabajarían agrónomos especializados en este género de asuntos. No tengo interés directo en que sea este Centro de especialización sanitaria el que se ocupe preferentemente de asuntos industriales; si lo propongo es por ser el que mejor conozco.

Es imprescindible dotar a los fabricantes de bebidas espirituosas y sus análogas de Centros consultivos en los que puedan resolver sus dificultades técnicas, y también es necesario recoger en una agrupación las personas educadas en las manipulaciones de la microbiología, conocedoras del tecnicismo indispensable para las investigaciones que se conceptúan de algún valor científico o industrial.

No representaría este esfuerzo económico un dispendio considerable, organizando solamente lo más preciso para dar satisfacción a las exigencias de momento, porque no es dispendio, sino ingreso, el preparar las industrias para mayor rendimiento; pero aunque lo representara, el país que aparece ante el mundo con reservas de oro, que han sorprendido a los celosos del resurgimiento español, debe aparecer grande en toda la línea y digno de un rango científico como el que tuvo en otras épocas de vida industrial floreciente.

Por doquier se desarrolla el culto a la invención y se facilitan medios para desenvolver gradualmente la riqueza natural de cada pueblo, mostrándose así el hombre colaborador honrado de la Naturaleza. Pretender que en España, país en que las industrias de la fermentación han alcanzado por sí solas un grado de prosperidad muy estimable, se rehagan de un modo virtual, exaltando su eficiencia y ayudando a la mejora de los productos, que a pesar del *preferencialismo* extraño tendrían cabida fácil en pueblos similares al nuestro, no es más que una empresa modestísima de indiscutible conveniencia general.