

Sobre la obtención de metilglioxal en la descomposición del azúcar mediante el jugo de la maceración de la levadura

POR

C. PI-SUÑER BAYO

Como repetidamente se ha demostrado, es el metilglioxal, en diversos procesos glucolísicos, un eslabón de la desmolisis. Así se ha visto, de un modo absoluto y convincente, en la descomposición del azúcar producida por la levadura (1), por los bacilos lácticos propiamente dichos (2) y por el «*Bacterium lactis aerogenes*» (3). Con un éxito igual se ha observado su formación en los procesos de desmolisis, producidos por células animales (4).

Gracias a un método de gran sencillez puede aislarse el metilglioxal, producido en gran cantidad, llegando incluso al 100 por 100 de las posibilidades teóricas. De este modo se ha logrado una demostración práctica de cómo este aldehído cetónico de tres átomos de carbono representa, en efecto (en la descomposición del azúcar), el importantísimo papel que sólo de un modo teórico e indirecto, y partiendo de su fácil ataque y consiguiente producción de ácido láctico, se le había atribuído.

Como ya hemos indicado, se ha investigado el sistema glucolísico existente en las levaduras altas y bajas, en la levadura baja desecada y en el preparado obtenido tratándola con alcohol-éter.

Siendo la fermentación alcohólica un prototipo del proceso de descomposición del azúcar, era muy interesante, para completar las experiencias descritas, observar si el jugo que resulta de la maceración de la levadura da lugar, también, a la producción de metilglioxal. En el preparado con levadura baja, siguiendo las indicaciones de A. v. Lebedew, se encuentra aún todo el complejo cimásico de la célula, pudiéndose producir con esta solución de fermento una verdadera fermentación alco-

hólica. Nos interesaba investigar si los resultados obtenidos con células activas, alteradas o muertas, se observaban, también, en la *fermentación sin células*; pues, en caso afirmativo, se tenía una clara demostración del absoluto paralelismo de los procesos de fermentación con células y sin ellas. *

Desde hace tiempo sostienen Neuberg y Kobel que se debe considerar la formación de metilglioxal como resumen y reacción principal del proceso de glucolisis. Mientras no dispongamos de una base experimental en qué apoyar la supuesta aparición de un cuerpo extraño entre el exosafosfato que se descompone y el metilglioxal, primero de los compuestos de tres átomos de carbono formados, podemos llamar a este enzima, causante del paso de cuerpos de la serie C_6 a la C_3 , *glucolasa*.

El mecanismo de producción de metilglioxal es, en la fermentación acellular y en la producción por células, idéntico, sean éstas activas o atenuadas.

En los experimentos que vamos a describir, efectuados con el jugo resultante de macerar la levadura, obtuvimos la formación del metilglioxal de una manera sencilla y sin dificultad, llegando según se ha dicho las cantidades obtenidas a un 100 por 100 de lo teóricamente posible. La levadura era siempre baja (de la casa Patzenhofer).

De los trabajos de Neuberg y Kobel acerca del mecanismo de esta reacción, se deduce lo siguiente:

Para la producción del metilglioxal basta la llamada *apocimasa*, o sea aquella parte del complejo zimásico que ha sido total o parcialmente privada del cofermento. Esta substancia contiene aún el enzima glucolísico, faltándole, en cambio, la *comutasa*, o sea el fermento necesario para la ulterior evolución del aldehído cetónico. Pero, para el ataque de la primitiva molécula de azúcar, se necesita también del concurso de una cozimasa (productora del compuesto fosfórico del azúcar). Por lo tanto, en nuestras experiencias tuvimos que partir de este compuesto fosfórico ya formado previamente, pues la apozimasa sola no es capaz de producir la fosforización del azúcar; pero sí la descomposición del difosfato de exosa previamente formado.

Sin embargo, han visto los mismos investigadores que no es indispensable la separación del cofermento mediante determinados métodos,

* Como se desprende de todo lo que sigue, estas esperanzas se han confirmado en absoluto. Del satisfactorio resultado, bien típico e importante, podemos deducir cuán injustos son los ataques que, recientemente, se han intentado a la teoría de E. Buchner, tan completa y fundamentada en todas sus partes. La deficiencia de los argumentos aducidos contra la existencia de una verdadera fermentación sin células ha sido también demostrada por diversos caminos, y de un modo convincente por A. J. Kluyver y A. P. Struyk (*H.*, 170, 110; 1927), A. v. Lebedew (*H.*, 173, 89; 1927) y K. Iwasaki y O. Meyerhof (*Biochem Zeit.*, 203, 252; 1928).

sino que basta el alterar la relación existente entre las cantidades de apo- y cozimasa mediante una suficiente dilución, con la cual la última se inutiliza en mayor o menor grado.

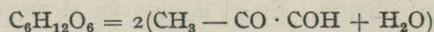
No vamos a entretenernos discutiendo si todo esto se debe a factores puramente físicos * (variación de la dispersión), o a que la cozimasa cambia el substrato que la adsorbe, o a un proceso bioquímico (algo así como favoreciendo la acción de los enzimas acompañantes (5) que atacan más fácil y rápidamente a la cozimasa que a la apozimasa), o simplemente por la disminución de la concentración en sí misma, cuya inmediata consecuencia sería que la cozimasa, más fácilmente difusible, no se encontraría (por lo menos en el foco de la reacción) en cantidad suficiente, mientras la apozimasa, no dializable, existiría en gran cantidad.

Otras muchas hipótesis pueden aún emitirse acerca de la alteración de las relaciones existentes entre las diversas partes del complejo zimásico productor de la glucolisis, pero no es éste tampoco el lugar indicado para discutir si la cozimasa necesaria para la formación del compuesto fosfórico de la exosa, y la de la dismutación, son distintas, homólogas o idénticas.

El jugo empleado en mis experiencias había sido diluido con gran cantidad de agua, libre de gérmenes, y a la que se añadía toluol como antiséptico. También he experimentado, con el líquido obtenido, luego de separar el cofermento mediante una diálisis estéril. El resultado fué prácticamente el mismo con ambos líquidos, lográndose en los dos la separación del metilglioxal.

Bastaba, por lo tanto, el hacer la investigación definitiva con una sola de las dos variedades, y en gracia a su mayor sencillez, escogimos las experiencias con jugo de la maceración muy diluido y no dializado.

El metilglioxal, acumulado por la descomposición del difosfato de exosa, fué precipitado en forma de 2-4-dinitrofenilhidrazona, obteniendo una cantidad de aldehído cetónico que se acerca mucho al máximo teóricamente posible. Debemos indicar que, por destrucción de una molécula de azúcar de seis átomos de carbono, se originan dos de hidrato de metilglioxal



* Esta hipótesis concuerda en absoluto con el hecho, hace ya tiempo demostrado experimentalmente por A. v. Lebedew (*Ann. Institut. Pasteur*, 25, 689; 1911), de que la dilución altera de un modo esencial la parte coloidal de la cimasa, así como la cozimasa existente, en no muy grandes cantidades, en la levadura, y que representa el agente que limita la glucolisis final.

PARTE EXPERIMENTAL

Antes de entrar de lleno en la descripción de la parte práctica de nuestras investigaciones, vamos a exponer, en líneas generales, el procedimiento seguido en ellas, y que el lector puede encontrar, con todo detalle, en los trabajos citados de Neuberg y Kobel.

La experiencia completa determina : el ácido fosfórico libertado, la cantidad de exosafosfato que queda aún en el líquido de la experiencia, el metilglioxal formado y la posible producción de otros hidratos de carbono.

Acido fosfórico. — Al principio y al final de la experiencia se toma una prueba del líquido (una vez precipitadas las albúminas con ácido tricloracético), y en ella se determina el fósforo colorimétricamente, según el método de K. Lohmann y L. Jendrassik (6).

Como que en la solución de zimasa sola, también tiene lugar, aunque de modo limitado, una cierta descomposición de fosfatos inorgánicos, se determina igualmente su contenido en fósforo, restando el resultado del de la experiencia principal.

Exosafosfatos existentes aún al interrumpir la experiencia. — La hidrólisis del exosadifosfato puede dar lugar, bien a exosamonofosfato, bien a productos libres de fósforo.

Para aislar los exosafosfatos totales (di y mono) se trata, en seguida de acabada la experiencia, una parte alícuota del líquido con alcohol absoluto, que precipita cuantitativamente los exosafosfatos junto con los fosfatos inorgánicos.

Como además precipitan partes constitutivas del fermento, se efectúa la misma precipitación en la experiencia control (sin exosadifosfato) y se resta la cantidad obtenida, de aquélla.

El precipitado se disuelve en poca agua, determinando en una parte alícuota de la solución el fósforo orgánico e inorgánico. La cantidad grande de solución restante se trata con acetato bórico en exceso y se alcaliniza con unas gotas de agua de barita, haciendo luego circular una corriente de ácido carbónico hasta decolorar la fenoltaleína. A las diez y ocho horas se centrifuga el precipitado, se calienta y vuelve a precipitar, y se filtra en caliente. En el líquido va el monofosfato de exosa, en el precipitado el difosfato y los fosfatos inorgánicos. Por lo tanto, el contenido en fósforo que se obtiene luego de incinerar el líquido con perhidrol y ácido nítrico, procede del exosamonofosfato.

Otros hidratos de carbono. — Se investigan en el líquido filtrado de la precipitación con alcohol de los exosafosfatos.

Se evapora hasta sequedad, se lava tres veces con agua y se evapora de nuevo hasta pequeño volumen. En esta solución se determina el poder reductor según Lehmann, y el contenido en fósforo orgánico e inorgánico. Del mismo modo se trata el filtrado alcohólico de las experiencias control, y las cantidades obtenidas (menores que en la principal) se restan de ésta, obteniéndose así la cantidad de sustancias reductoras y de ésteres alcohólicos del ácido fosfórico que provienen del exosadifosfato.

Como sería posible que parte del metilglioxal formado pasase a productos reductores, debe observarse, en experiencias análogas a la descrita, si el poder reductor es el mismo en los controles con fermento solo, y en los del metilglioxal (sin exosadifosfato).

Si lo es, indica que el poder reductor obtenido hay que atribuirlo al azúcar.

Metilglioxal. — Su precipitación se verifica, luego de separar las albúminas por el tratamiento con ácido tricloroacético, con solución clorhídrica de 2-4-dinitrofenilhidrazina.

La hidrazona producida se deposita bien, y después de abandonarla durante dos o tres horas a la temperatura de la habitación, se centrifuga y se lava el residuo, sucesivamente, con ácido clorhídrico diluido, agua y dos veces con alcohol. Para su análisis se cristaliza, primero, en piridina, y luego, en nitrobenzeno.

Las soluciones control (solamente con fermento) deben tratarse de la misma manera, para ver si dan también precipitado.

Además, el obtenido en las soluciones a las que al principio se les ha añadido metilglioxal puro, es muy interesante, por darnos la cantidad de éste que ha sufrido la dismutación durante el transcurso de la experiencia. Y, por lo tanto, este metilglioxal dismutado habrá que añadirlo al correspondiente a la cantidad de osazona depositada, para tener su volumen total.

Esta determinación se hace con paranitrofenilhidrazina en solución acética, y desecando el precipitado obtenido a 120°.

RESUMEN DE LAS EXPERIENCIAS EFECTUADAS

Experiencias con jugos frescos (resultantes de macerar la levadura)

Preparamos los líquidos siguientes:

1. 40 cc. de jugo.
200 cc. de una solución de exosadifosfato magnésico al 7'013 por 100.
960 cc. de agua.
12 cc. de toluol.

2. 10 cc. de jugo.
290 cc. de agua.
3 cc. de toluol.
3. 5 cc. de jugo.
50 cc. de solución de metilglioxal al 0'3 por 100.
95 cc. de agua.
1'5 cc. de toluol.
4. 50 cc. de solución de metilglioxal al 0'3 por 100.
100 cc. de agua.
1'5 cc. de toluol.

Duración de la experiencia : 24 h. Temperatura : 37 grados.

En 1 cc. del líquido primero se habían separado, a las veinticuatro horas, 0'3494 mgr. de fósforo; y en uno del segundo, durante el mismo tiempo, 0'0134 mgr. Por lo tanto, el fósforo puesto en libertad por hidrólisis, a partir del exosadifosfato, en 1 cc. era:

$$\begin{array}{r} 0'3494 \\ - 0'0134 \\ \hline 0'3360 \text{ mgr.} \end{array}$$

Una parte alícuota de la mezcla de fosfatos obtenida al final de la experiencia, que constaba de exosadifosfato, exosamonofosfato y fosfato inorgánico, la precipitamos con alcohol, como hemos expuesto anteriormente, y luego investigamos cuantitativamente la cantidad existente de cada una de las diversas clases de fosfatos.

Vimos que en 1 cc. existían 0'0833 mgr. de fósforo en forma de monofosfato. Substrayendo esta cantidad de la total separada, encontramos la de fósforo procedente de la completa descomposición de los exosadifosfatos:

$$\begin{array}{r} 0'3360 \\ - 0'0833 \\ \hline 0'2527 \text{ mgr.} \end{array}$$

La cantidad de azúcar que corresponde a ésta de fósforo puesto en libertad es 0'7337 mgr. por centímetro cúbico.

Este azúcar, procedente de la descomposición del exosadifosfato, ha pasado, en su mayor parte, a metilglioxal, quedando, aun al interrumpir la experiencia, en pequeña proporción disuelto en el líquido como tal azúcar. La determinación de éste la efectuamos en el líquido alcohólico resultante de la filtración del precipitado de los fosfatos, una vez concentrado por evaporación. Evaporado el alcohol, tratamos el residuo con poca agua, y en esta solución acuosa determinamos el azúcar

según el método de Lehmann-Maquetenne. En 10 cc. del líquido primero encontramos 2'05 mgr. de azúcar, y en el mismo volumen del segundo, 0'95 mgr. Substrayendo éste de aquél, tendremos la cantidad producida por descomposición del exosadifosfato:

$$\begin{array}{r} 2'06 \\ - 0'95 \\ \hline 1'11 \text{ mgr. por cc.} \end{array}$$

Y restando del producido por la descomposición total del compuesto fosfórico, tendremos la cantidad de hidrato de carbono que ha pasado a metilglioxal, por centímetro cúbico:

$$\begin{array}{r} 0'7337 \\ - 0'1110 \\ \hline 0'6227 \text{ mgr.} \end{array}$$

Para el *aislamiento de este metilglioxal* tomamos 860 cc. de la solución primera, en la que habíamos separado las albúminas con ácido tricloracético, y la precipitamos con solución ácida de 2-4-dinitrofenilhidrazina. Al cabo de cierto tiempo se depositó bien el precipitado, a las dos horas lo centrifugamos, lo lavamos con ácido clorhídrico diluído, agua y alcohol y lo abandonamos en un desecador.

En estos 860 cc. de líquido logramos obtener un precipitado de 1'71 gr. de hidrazona correspondientes a 0'3563 gr. de hidrato de metilglioxal, correspondiendo, por lo tanto, 0'414 mgr. de $\text{CH}_3 - \text{CO} \cdot \text{COH} + \text{H}_2\text{O}$ por centímetro cúbico.

Precipitando el metilglioxal que existía aún al cabo de veinticuatro horas en los líquidos tercero y cuarto (a los que se lo habíamos añadido al principio de la experiencia), vimos que, durante este tiempo, habían desaparecido por dismutación 0'212 mgr. de hidrato de metilglioxal por centímetro cúbico. (La solución sola de aldehído cetónico del líquido cuarto no se había alterado.)

Si sumamos esta cantidad dismutada a la precipitada en forma de hidrazona, tendremos que el metilglioxal total formado es 0'626 mgr. por centímetro cúbico. Y como, según el análisis de los fosfatos, la de azúcar que estaba en disposición de pasar a aldehído era 0'6227 mgr., tenemos que la cantidad verdaderamente formada es

$$\frac{626,100}{623} = 100'5 \text{ por } 100$$

de la teóricamente posible.

ANÁLISIS DE LA DINITROFENILHIDRAZONA OBTENIDA

Esta hidrazona fué cristalizada, una vez, en piridina, y otra, en nitrobenzenceno, obteniéndose entonces pura y de un punto de fusión de 298°.

En su análisis obtuvimos el siguiente resultado:

4,679 mgr. de substancia, dieron 7,200 mgr. de CO₂ y 1,220 mgr. de H₂O.
2,887 mgr. de substancia, dieron 0'658 cc. de N₂ (a la presión de 754 mm. a 24° y con solución de KOH al 50 por 100).

Análisis elemental

(C ₁₅ H ₁₂ N ₈ O ₈)	Calculado :	C = 41'66 %;	H = 2'80 %;	N = 25'93 %
P. m. = 432	Hallado :	C = 41'96 %;	H = 2'91 %;	N = 25'75 %

Otra experiencia, verificada análogamente, nos dió el mismo resultado. Durante las veinticuatro horas se separaron del exosadifosfato 0'3387 mgr. de fósforo por centímetro cúbico. El contenido en éste, bajo la forma de monofosfato de exosa, de la mezcla precipitada con alcohol, vimos que era, por centímetro cúbico, 0'0875 mgr.

Por lo tanto, el fósforo libre resultante de la completa destrucción del compuesto fosfórico de la exosa sería, por centímetro cúbico,

$$\begin{array}{r} 0'3387 \\ - 0'0875 \\ \hline 0'2512 \text{ mgr.} \end{array}$$

La cantidad equivalente de azúcar es 0'7293 mgr. Como en el filtrado alcohólico de la precipitación de los fosfatos encontramos 0'1160 miligramos de azúcar, tendremos que existían en la solución 0'6133 mgr., prestos al paso a metilglioxal.

De un modo análogo al de la anterior experiencia aislamos 0'0422 miligramos de hidrato de metilglioxal por centímetro cúbico, y la cantidad del mismo dismutada fué 0'0207 mgr. Se habían, pues, formado en esta experiencia 0'0629 mgr. de CH₃ - CO . COH + H₂O por centímetro cúbico, o sea

$$\frac{629.100}{613} = 102 \text{ por } 100$$

de lo teóricamente posible.

* * *

Se hicieron también experiencias con el jugo de la maceración de levadura dializado y fuertemente diluído (en la relación 1 : 30), que nos dieron, en líneas generales, idéntico resultado.

La descomposición de los fosfatos alcanzó, aproximadamente, la mitad de la obtenida en las experiencias anteriormente descritas, y la cantidad de metilglioxal aislado fué, asimismo, un 50 por 100 del correspondiente a las experiencias efectuadas con jugo sin dializar.

ANÁLISIS DE LA HIDRAZONA RECRISTALIZADA

4,909 mgr. de substancia, dieron 7,530 mgr. de CO_2 y 1,390 mgr. de H_2O .
2,831 mgr. de substancia, dieron 0'639 cc. de N_2 (a la presión de 754 mm. a 24° y con solución de KOH al 50 por 100).

Análisis elemental

($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_8\text{O}_8$) Calculado : C = 41'66 %; H = 2'80 %; N = 25'93 %
P. m. = 432 Hallado : C = 41'82 %; H = 3'14 %; N = 25,66 %

K. W. Institut für Biochemie. Director, profesor C. Neuberg.

BIBLIOGRAFÍA

1. C. Neuberg y M. Kobel, *Biochem. Zeit.*, 203, 463, 1928; 210 466, 1929.
2. C. Neuberg y M. Kobel, *Biochem. Zeit.*, 207, 232; 1929.
3. C. Neuberg y M. Scheuer, *Sitzungsber. d. Wiener Akademie d. Wissenschaften, Wegscheider-Festschrift*, 1929.
4. M. Vogt, *Klin. Wochenschr.*, 8, 793; 1929. — *Biochem. Zeit.*, 211, 17; 1929.
5. A. Harden y W. J. Young, *Chem. Centralbl.*, I, 1853, 1906; II, 1906. — E. Buchner y F. Klatte, *Biochem. Zeit.*, 8, 523; 1900. — H. v. Euler y K. Myrback, *Naturwissensch.*, 17, 291; 1929.
6. *Biochem. Zeit.*, 178, 418; 1926.

Publicado en el *Biochemische Zeitschrift*, t. CCXIII, fascículos 4-6, pág. 489, y *Anales de la Soc. Esp. de Física y Química*, t. XXVIII, marzo de 1930.