

CIMASAS DEL PULQUE

I

Por JUAN ROCA Y ROBERTO LLAMAS
del Instituto de Biología

EL estudio de las cimasas ofrece numerosas dificultades pues todavía no se ha llegado a esclarecer con precisión cual sea la verdadera naturaleza de las mismas: mientras que Willstatter y la escuela alemana afirman haber obtenido cimasas en estado de pureza, sin que presenten reacciones de prótidos, otros en cambio, como Sherman, que también es autoridad en la materia, y con él la escuela americana, afirman lo contrario, esto es, que siguiendo el mismo procedimiento indicado por Willstatter no han logrado obtener cimasas libres de prótidos, por lo que concluyen que son de naturaleza proteínica.

La primera cimasa obtenida en cristales fué la ureasa, logrado por Summer en 1926. Signió después la pepsina cristalizada por Northrop en 1929: el mismo investigador logró obtener la tripsina en 1931, Kunitz y Northrop cristalizaron la quimotripsina y el quimotripsinógeno en 1933, Bamann y Laeverenz, en 1934 obtuvieron una lipasa cristalizada, Theorell, en 1935 una oxidasa; Anson en 1935 aisló del páncreas de bovinos una carboxipolipeptidasa, Herriot y Northrop obtuvieron pepsinógeno cristalizado, de la mucosa gástrica de porcinos y Balls, Lineweaver y Thompson, en 1937, aislaron la papaína cristalizada y en todos estos casos comprobaron que las cimasas cristalizadas son de naturaleza proteínica.

Desconociendo por lo tanto la fórmula de constitución de las cimasas continuamos provisionalmente con el criterio de que solo podemos conocerlas por su modo de obrar, esto es, por las modificaciones de los substratos en condiciones adecuadas. En esta forma, el problema es de muy difícil solución en algunos casos, puesto que

siendo las cimasas específicas y siendo tan variados los substratos y condiciones óptimas de acción, hay que repetir muchos experimentos para llegar quizás a la conclusión de que no se encuentran tales o cuales cimasas y sin que de ello se deduzca que no puedan existir otras; puede darse el caso de no encontrar alguna cimsa, no porque no exista, sino por verificar la experiencia en condiciones inadecuadas para ese caso particular.

Es cierto que en un líquido biológico determinado podemos tener algunas orientaciones fundadas en la presencia de ciertos gérmenes, pero tampoco esto es concluyente ya que no todas las cimasas son producidas por gérmenes y además puede darse el caso de que algunos gérmenes produzcan cimasas distintas según sean los medios o condiciones en que se desarrollan.

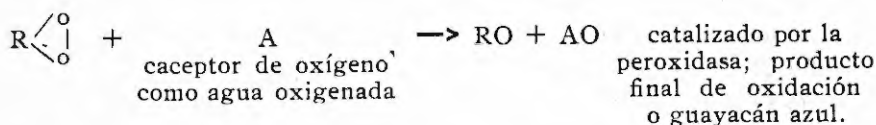
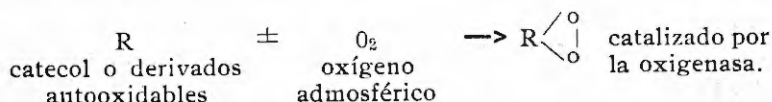
Hasta hace poco tiempo era casi imposible purificar una cimsa o separar de un mismo líquido dos o tres cimasas, pero en la actualidad se conoce perfectamente el método general de separación por el uso de adsorbentes adecuados para lo cual tiene que hacerse una serie de ensayos antes de llegar a conclusiones definitivas.

Nuestro trabajo a este respecto ha sido muy largo y delicado pues hemos tenido que repetir centenares de pruebas antes de poder establecer algunas conclusiones. Trabajando con un líquido biológico complejo como el pulque teníamos la convicción de que debíamos encontrar en él numerosas cimasas y para sistematizar nuestros estudios orientamos primero las investigaciones en el sentido de buscar cimasas de grupo, esto es, glucidasas, proteasas y esteridasas, así como oxidasas, hidrogenasas, etc., para continuar después con las propias de cada grupo, según los resultados obtenidos en las observaciones preliminares.

Todas las pruebas que hemos hecho para demostrar la existencia de glucidasas en el pulque, en distintos medios y condiciones han resultado negativas; lo mismo ha sucedido con proteasas, obrando, ya sea sobre prótidos complejos o las llamadas proteasas y otro tanto ha sucedido con las lipasas.

Al estudiar las oxidasas del pulque tuvimos en cuenta las ideas actuales sobre oxidación en Biología. Al añadir solución alcohólica de guayacán no aparece ningún cambio, pero si le ponemos ciertos extractos procedentes de materia organizada aparece color azul producido por la oxidación del ácido guayacónico merced al oxígeno activo liberado por la peroxidasa al actuar sobre el peróxido de hidrógeno diluido.

Al estudiar esos extractos se encuentra frecuentemente en ellos el o-dihidroxibenzeno o bien algunos de sus derivados. El catecol disuelto en agua y expuesto al aire toma color pardo después de cierto tiempo debido a la formación de compuestos coloridos de catecol, esto es, a la presencia de sustancias autooxidables que toman oxígeno atmosférico y en el caso de existir oxigenasas aceleran la reacción y aparecen rápidamente, todo ello conforme al esquema siguiente:



de lo que se deduce que la oxidación es un sistema en el que intervienen tres elementos más el aceptor de oxígeno. Hay además la oxidación intraorgánica producida por el glutatión; esta no se toma en cuenta en el estudio de las cimasas del pulque por ser exclusiva de los tejidos animales.

Para los ensayes preliminares empezamos por preparar los reactivos siguientes:

Solución de fenol al 5%, que llamaremos RI.

Solución de catecol al 1%, que llamaremos RII.

Solución de clor. de parafenilendiamina RIII.

Solución alcohólica de alfa naftol RIV.

Con ellos hicimos numerosas experiencias que extractamos a continuación:

10 c. c. de pulque más 0.5 c. c. de RI.....no se observa nada.

10 c. c. de pulque más 0.5 c. c. de RI más 1 de H₂ O₂.....nada, excepto burbujas de oxígeno.

10 c. c. de pulque más 0.5 c. c. de RII.....no se observa nada.

10 c. c. de pulque más 0.5 c. c. de RII más 1 de H₂ O₂.....nada, excepto burbujas de oxígeno.

10 c. c. de pulque más 0.5 c. c. de RIII.....no se observa nada.

10 c. c. de pulque más 0.5 c. c. de RIII más 1 de H₂ O₂....nada, excepto burbujas de oxígeno.

- 10 c. c. de pulque más 0.5 c. c. de RIV.....no se observa nada.
- 10 c. c. de pulque más 0.5 c. c. de RIV más 1 de $H_2 O_2$nada, excepto burbujas de oxígeno.
- 10 c. c. de pulque más 0.5 de RI más álcali a pH 9.....no se observa nada.
- 10 c. c. de pulque más 0.5 de RII más álcali a pH 9.....no se observa nada.
- 10 c. c. de pulque más 0.5 de RIII más álcali a pH 9.....no se observa nada.
- 10 c. c. de pulque más 0.5 de RIV más álcali a pH 9.....no se observa nada.
- 10 c. c. de pulque más 0.5 de RI más de $H_2 O_2$ y a los 5' álcali a pH 9.....no se observa nada.
- 10 c. c. de pulque más 0.5 de RII más 1 de $H_2 O_2$ y a los 5' álcali a pH 9.....aparece color rojo ladrillo intenso.
- 10 c. c. de pulque más 0.5 de RIII más 1 de $H_2 O_2$ y a los 5' álcali a pH 9.....no se observa nada.
- 10 c. c. de pulque más 0.5 de RIV más 1 de $H_2 O_2$ y a los 5' álcali a pH 9.....no se observa nada.
- 10 c. c. de pulque más 1 de $H_2 O_2$ más guayacán.....al principio nada, después azul.
- 10 c. c. de pulque más $H_2 O_2$desprendimiento abundante de burbujas de oxígeno.

Se repitieron las experiencias anteriores utilizando, en lugar de pulque puro el líquido eluido con fosfato primario de potasio después de haberlo adsorbido con hidróxido de aluminio, obteniendo los mismos resultados y cosa semejante resultó al adsorber el pulque con tierra de infusorios.

Hicimos un ensaye en blanco para lo cual tomamos un tubo de ensaye con 10 c. c. de agua destilada, añadiendo 0.5 c. c. de RII más 1 c. c. de $H_2 O_2$ y a los cinco minutos se alcalinizó con solución de carbonato de sodio hasta pH 9, apareciendo ligerísimo color rojizo después de media hora.

Como el pulque contiene vitamina C según demostramos oportunamente, a la que podría atribuírse la acción observada en nuestras experiencias se tomaron 10 c. c. de solución concentrada de vitamina C, añadiendo 0.5 c. c. de RII, más un c. c. de agua oxigenada a los cinco minutos solución de carbonato de sodio hasta pH 9, apareciendo en este caso ligerísimo color rojizo después de 10 minutos.

Se corroboró lo anterior repitiendo la experiencia con 10 del filtrado de pulque, adsorbido previamente con hidróxido de aluminio coloide y en este caso no apareció color alguno, demostrando con ello que la acción observada es debida a la cimasa y no a la vitamina C del pulque.

De todo esto deducimos que el pulque parece no contiene oxidases generales ya que no obran sobre los substratos típicos de fenol, catecol y sustancias análogas en medios normales esto es, en medio neutro o ligeramente ácido. En medio alcalino tampoco aparece acción manifiesta excepto en el caso del catecol en que se forma inmediatamente color rojo intensísimo lo que nos induce a suponer que ha de tratarse de una cimasa (oxidasa) específica, produciendo quizás productos análogos a los que produce la tirosinasa, que al obrar sobre la tirosina forma primero la 3:4 dihidroxifenilalanina y esta por oxidación posterior da la correspondiente quinona, la que sufre un cambio intramolecular para dar la quinona del ácido 5:6 dihidroxindol carboxílico. La tirosinasa según Pugh y Raper obra sobre diversos fenoles produciendo quinonas y si a la vez hay anilinas se forman anilino-o-quinonas y en el caso del catecol se forma la dianilino-o-benzoquinona. Pero no todos los fenoles atacados por la tirosinasa dan anilinoquinonas, cuando la cimasa obra sobre ellas en presencia de anilinas, como por ejemplo al obrar sobre la tirosina pura exclusivamente; en este caso se producen las ortoquinonas por oxidación, pero en la incapacidad de formar derivados indólicos no se obtienen los derivados anilínicos correspondientes.

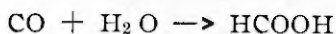
De todo esto nos parece lógico deducir que el pulque contiene una oxidasa que obra a la manera de la tirosinasa sobre sustancias dihidricas, como el catecol, produciendo por su oxidación la quinona correspondiente, pero solo aparece al cambiar la reacción del medio hasta un pH de 9 y por la incapacidad de producirse cambios intramoleculares no se forman nuevos compuestos por ulterior oxidación.

Corroboramos estos con las experiencias siguientes: poniendo en tubo de ensaye solución de tirosina pura más pulque, agua oxigenada y solución de carbonato de sodio hasta pH 9 no aparece ningún cambio de coloración ni después de 24 horas. En otro tubo de ensaye pusimos pulque, solución de carbonato de sodio, agua oxigenada, tirosina y dos gotas de anilina, en cuyo caso tampoco apareció cambio alguno, pero a un tercer tubo se puso pulque, solución de catecol al 1%, agua oxigenada, dos gotas de anilina y solución de carbonato de sodio hasta pH 9, apareciendo rápidamente color rojo cereza in-

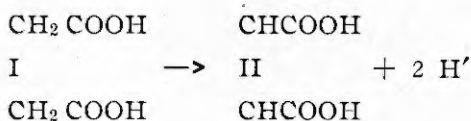
tenso, que después de algún tiempo pasó a rojo obscuro intensísimo, no desapareciendo después de 48 horas. En un cuarto tubo repetimos la experiencia utilizando solución de fenol al 5% en lugar de catecol y en este caso apareció color verde hasta ser intensísimo, pasando después al rojo obscuro: en los dos casos se han formado dianilino-o-benzoquinonas, lo que parece confirmar que en el pulque hay una oxidasa análoga a la tirosidina y quizás puede tratarse de la misma tirosinasa que puede obrar sobre substratos mono o dihidricos, reacciones que no aparecen en el pulque solo por las razones aducidas anteriormente, esto es, porque las o-quinonas formadas, por no tener sustancias apropiadas, no pueden producir los compuestos coloridos, como los derivados anilínicos correspondientes.

Por otra parte esto nos lleva a la consideración muy interesante y que en vista de lo anterior conceptuamos fundada, lo que estamos aclarando actualmente, esto es, si se trata de oxidasas o verdadera tirosinasa capaz de descarboxilar aminoácidos como la arginina que da en esta forma tetrametilenodiamina o putrescina, la lisina, que por el mismo proceso da pentametileno-diamina o cadaverina, así como la fenilalanina, tirosina, triptofano e histidina que por descarboxilación dan, feniletilamina, tiramina, indoetilamina e histamina, respectivamente, productos todos ellos sumamente tóxicos a los que podrían atribuirse los efectos perjudiciales del pulque, por lo que estamos orientando nuestros estudios en este sentido y serán objeto de una comunicación que aparecerá en tiempo oportuno.

Para investigar presencia de deshidrogenasas recordamos que en este caso se necesita un aceptor de hidrógeno capaz de combinarse con dicho elemento, al ponerse en libertad, sea por oxidación de alguna de las sustancias presentes, como en la oxidación del CO en presencia de agua, según la reacción:



o bien como en la deshidrogenación directa del ácido succínico para dar ácido fumárico:



y transformación posterior del azul de metileno (aceptor de hidró-

geno) en metileno blanco. Pero también puede haber oxidación del oxígeno e hidrógeno simultáneamente. En ausencia de oxígeno tendremos como tipo:



y en presencia a la vez de oxígeno sucederá lo siguiente:

$RH_2 \rightarrow R + 2 H'$ oxidación por deshidrogenación.

$2 H' + O_2 \rightarrow H_2 O_2$ formación de peróxido.

$H_2 O_2 + H_2 O + O$ acción de la peroxidasa.

$R_1 + O' \rightarrow R_1 O$ oxidación de sustancia secundaria.

$2 H_2 O_2 \rightarrow 2 H_2 O + O_2$ catalasa productora de oxígeno molecular.

Las experiencias que hicimos, esto es, tomamos pulque al que añadimos 0.5 c. c. de solución de azul de metileno al 0.02%, más 1 c. c. de formol al 0.4 %, más una poca de vaselina líquida para evitar la acción del aire atmosférico, todo ello, unas veces a la temperatura ambiente y otras a 37 grados, sin que desapareciese el color azul ni después de 48 horas, demostró que no había oxidación por deshidrogenación.

Pasamos ahora al estudio de la fermentación del pulque, desde el punto de vista de las cimasas que la producen, tomando en cuenta los conocimientos más recientes sobre este importante asunto.

Para ello tratamos el pulque con distintos adsorbentes y después de eluirlos convenientemente sometimos el líquido recogido por filtración, a diálisis prolongada por varios días, en presencia de toluol, utilizando después el dializado ya puro o bien se añadieron distintos iones y se sujetó todo ello a diversas temperaturas, observando los resultados, todo ello conforme a lo que se detalla a continuación, así como los resultados.

Pulque tratado con hidróxido de aluminio coloide, filtrado, eluído con fosfato primario de potasio, más glucosa al 5% en tubo de fermentación y a 30 grados: no se observó nada.

Repetida la experiencia a la temperatura ambiente, de 16 grados: no se observó nada.

Repetida la primera parte y dializando el filtrado por 5 días se prepararon en tubos de fermentación, como sigue:

1 c. c. del dializado más glucosa al 5%no se observó nada.

1 del dializado más glucosa al 5%, más una gota de ác. acético, a 30°no se observó nada.

1 del dializado más glucosa al 5%, una gota de ác. acético más Ca. no se observó nada.

1 del dializado más glucosa al 5%, más fosfato ácido.....no se observó nada.

1 del dializado más glucosa al 5%, más Mn.....no se observó nada.

1 del dializado más glucosa al 5%, más Mg.....no se observó nada.

Las experiencias anteriores se hicieron a 30°. Se repitieron a 16° con idénticos resultados.

Pulque tratado con carbonato de magnesio y eluido con K H₂ P O₄.

1 c. c. más glucosa al 5%, y a 30°.....desprendimiento abundante de CO₂.

El filtrado anterior así como los dializados anteriores dieron reacción de biuret positiva.

Pulque adsorbido con hidróxido de aluminio coloide eluido y dializado:

2 c. c. del dializado más sacarosa al 6%, a 16°.....no se observó nada.

2 c. c. del dializado más sacarosa al 6%, a 30°.....++++.

2 c. c. del dializado más sacarosa al 3%, a 16°.....no se observó nada.

2 c. c. del dializado más sacarosa al 3%, a 30°.....+++.

2 c. c. del dializado más sacarosa al 2%, a 16°.....no se observó nada.

2 c. c. del dializado más sacarosa al 2%, a 30°.....++.

Pulque tratado con carbonato de magnesio, eluido y dializado:

2 c. c. del dializado más sacarosa al 6%, a 16°.....no se observó nada.

2 c. c. del dializado más sacarosa al 6%, a 30°.....++++.

2 c. c. del dializado más sacarosa al 3%, a 16°.....no se observó nada.

2 c. c. del dializado más sacarosa al 3%, a 30°.....

2 c. c. del dializado más sacarosa al 2%, a 16°.....no se observó nada.

2 c. c. del dializado más sacarosa al 2%, a 30°.....+++

De esto se deduce que el mejor adsorbente fué el carbonato de magnesio, advirtiéndose que en este caso pasaron magnesianes que se eliminaron por la diálisis.

Al estudiar esto detenidamente tuvimos en cuenta que las fer-

mentaciones se clasifican actualmente según los cinco tipos siguientes:

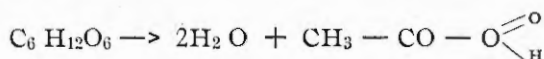
1ª—Fermentación tipo, llamada de Gay Lussac y Lavoisier en que se obtienen como productos finales alcohol y anhídrido carbónico.

2ª—La que se produce en medio sulfitado obteniendo en este caso aldehído acético y glicerol, procediendo el primero de la acción de una carboxilasa sobre el ácido pirúvico, fijándose el producto formado merced a la acción del sulfito, por lo que no puede formarse alcohol.

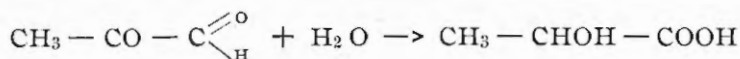
3ª—La que se verifica en presencia de carbonato de calcio y en este caso dos moléculas de glucosa dan dos moléculas de glicerol, dos de anhídrido carbónico, una de ácido acético y una de alcohol.

4ª—En este caso una molécula de glucosa da una molécula de ácido pirúvico y una de glicerol, análogo al tipo dos, pero como en este caso no hay carboxilasas y el medio es ácido no puede haber transformación del ácido pirúvico.

5ª—En este último tipo de fermentación la glucosa da aldehído pirúvico, conforme a la reacción:



y por la acción de una cetoaldehydomutasa, descubierta por Dakin y Dudeley, se introduce una molécula de agua en el aldehído y se



forma ácido láctico.

Al aplicarlo al pulque y teniendo en cuenta la presencia en el mismo de ciertas sustancias, como hemos demostrado nosotros, se comprende que en el pulque tienen lugar simultáneamente las fermentaciones tipo 1,3 y 5. Demostramos en efecto, la existencia en el pulque, de ácidos acético y láctico, así como acetona y alcoholes superiores, lo que nos induce a suponer en la fermentación de dicho líquido una fase normal de glucosa, formación de exosafosfato, aldehído pirúvico, aldehído acético y alcohol como producto final. Pero al mismo tiempo, por la acción de la cetoaldehydomutasa, parte del aldehído pirúvico se transforma en ácido láctico: al mismo tiempo, parte del aldehído acético, por la presencia de ciertos aniones se

transforma en ácido acético y otra porción, previa su transformación en aldol da ácido beta oxibutírico y luego alcohol butílico, transformándose el resto de beta oxibutírico en ácido acetilacético y por descarboxilación, en acetona y anhídrido carbónico. Esto comprueba la existencia en el pulque de los productos mencionados y al mismo tiempo explica la presencia de una cantidad relativamente pequeña de alcohol etílico apesar de la actividad de la fermentación y de la cantidad relativamente grande de sacáridos que tiene el aguamiel.

Todo esto que acabamos de mencionar parece está en contradicción con lo que se dijo anteriormente, si tenemos en cuenta lo que sucede en el intestino humano, esto es, que las fermentaciones intensas impiden la producción de compuestos tóxicos aminados, pero en realidad no existe tal contradicción ya que es bien sabido que la fermentación del aguamiel es muy intensa al principio pero muy larga en duración, se acelera al transformarse en pulque y luego disminuye notablemente y en este momento es cuando pueden aparecer los fenómenos de oxidación del carboxilo de los aminoácidos para dar los derivados amínicos correspondientes. La fermentación del pulque se parece más bien a la transformación biológica de la glucosa en condiciones anormales, en el organismo humano, demostrado por la presencia de los productos derivados que aparecen en dicho líquido.
