

No podemos formarnos ninguna idea exacta acerca del modo como se verifica la acción de los fermentos. Puede concebirse que el fermento obra como vector del agua, absorbiendo ésta y cediéndola en seguida á las moléculas que tiene que separar. O bien, puede representarse, con Bunsen-Hüfner, la acción del fermento como análoga á la del ácido sulfúrico en la formación del éter, donde absorbe con más fuerza que el resto ciertos átomos ó grupos de átomos, dando origen de este modo á una nueva agrupación de los restantes y despues de la cual se regenera de nuevo. En ambas hipótesis falta aún la demostración de la absorción del agua, ó de tales combinaciones de los fermentos. Una tercera hipótesis, la de Nægeli, corresponde á la que ha formulado sobre la manera de producirse las fermentaciones, y se discutirá más adelante. Según ella, los fermentos mismos no entran en la combinación, sino que obran por virtud de los movimientos de sus moléculas sobre determinados grupos de átomos, cuyo cambio de lugar y nueva agrupación provocan.

Cualquiera que sea la interpretación que se dé á estos fenómenos, claro es que tenemos que tratar aquí de fenómenos de una naturaleza muy diferente de la de los que se observan en la fermentación propiamente dicha. Los fermentos solubles son cuerpos químicos solubles, no enlazados con la existencia de organismos vivos; sólo tienen el poder de producir fenómenos hidrolísicos, al paso que en la fermentación propiamente dicha se producen cambios mucho más complicados en la agrupación de los átomos, lo cual supone la intervención constante de organismos vivos. La diferencia esencial entre ambos procesos aparece con más claridad por la comparación de las causas externas que favorecen ó impiden su marcha regular. Los fermentos solubles obran bien sobre todo á una temperatura de 60° y cuando la reacción es ácida; no ejercen casi acción sobre ellos cantidades bastante grandes de agua oxigenada, de ácido fénico, de trementina, etc.; al paso que en las mismas condiciones observamos siempre una cesación completa de la vida ó, por lo ménos, del poder de provocar la fermentación que corresponde á los micro-organismos.

7. Fermentaciones.

En circunstancias particulares se ve producirse en la aptitud biológica una modificación de los micro-organismos, que se caracteriza por una descomposición y un consumo de los materiales nutritivos, formándose cuerpos particulares que chocan por su calidad y cantidad. Entre éstos representan sobre todo un papel importante los gases que se exhalan; además, se producen sin cesar cuerpos cuyo calor de combustión es menor que el de los cuerpos que les han dado origen, de

suerte que se pone en libertad cierta cantidad de fuerza. El conjunto de estos fenómenos se designa con el nombre de *fermentación*.

En último análisis, la fermentación debe referirse á la descomposición en el interior del protoplasma y á la respiración intramolecular. Podemos figurarnos que la fermentación nace de ésta y que al principio sólo representa un acto de conservación individual, resultante de la falta continua de oxígeno. Sin la combustión activa á expensas del oxígeno libre, la respiración interna sola no se halla en estado de producir la fuerza impulsiva necesaria; cierto es que cuando falta este gas prodúcese una disociación superficial de los materiales nutritivos, pero es mucho más extensa, y de esta manera se engendran las fuerzas necesarias para la vida de los micro-organismos. En el curso ulterior del desarrollo los micro-organismos se dividen en dos grandes grupos: en el uno, el poder de provocar la fermentación queda en estado de necesidad ocasionada por la falta de oxígeno; en el otro, se pronuncia poco á poco como cualidad constante. Los micro-organismos de este grupo provocan la fermentación en cuanto se les ofrecen sustancias fermentescibles, hasta cuando existe oxígeno en cantidad abundante, es decir, precisamente cuando no se deja sentir la necesidad de este fenómeno. La existencia de una sustancia fermentescible es de una necesidad innegable para que se produzca la fermentación. Sólo hay un número restringido de compuestos químicos convenientes; cada sustancia fermentescible, además, no puede servir á cualquier agente de fermentación que llegue; no es descompuesta sino por uno solo ó por un pequeño número de organismos. Cada especie bacteriana tiene una acción limitada á un pequeño número de sustancias. Hay muchos micro-organismos respecto á los cuales no se conoce sustancia alguna cuya fermentación puedan provocar. Es posible que éstos no puedan contar sino con los cambios de sustancias que resultan de la respiración; también es posible que para uno ú otro de los esquizomicetos se encuentre la sustancia cuya fermentación sea capaz de provocar.

Sólo por el exámen de los casos especiales pueden conocerse y dilucidarse la naturaleza y la característica de los materiales aptos para fermentar, así como la naturaleza de su descomposición. Distingúense gran número de fermentaciones específicas, que se designan, ora por uno ó varios productos característicos, ora por los materiales que fermentan, ora, en fin, por el agente de la fermentación. En los capítulos consecutivos se hablará primero de las fermentaciones producidas por los *sacaromicetos* y despues de las que se deben á los *esquizomicetos*, las cuales pueden dividirse en cinco grupos, á saber:

A) La fermentación de los *hidratos de carbono*; B) la de los *alcoholes poliatómicos* (glicerina, eritrita, manita); C) la de los *ácidos grasos*;

D) la putrefaccion; E) la formacion de ácido acético á expensas del alcohol.

A) FERMENTACION ALCOHÓLICA DEL AZÚCAR, PRODUCIDA POR LA LEVADURA

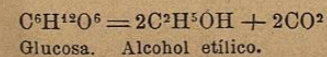
La materia necesaria para la fermentacion está representada por las glucosas, cuya fórmula es $C^6H^{12}O^6$, á saber: la dextrosa, la levulosa y la lactosa (ó galactosa); además, por la maltosa, cuya fórmula es $C^{18}H^{34}O^{17}$ y que por la adición de una molécula de agua se transforma en glucosa. La dextrosa representa la materia más conveniente; en una mezcla de glucosa y de levulosa se verifica primero la fermentacion de aquélla. El azúcar de caña y la lactosa sólo pueden fermentar cuando se transforman en glucosa; ambas pueden transformarse en la misma glucosa por la ebullicion ó por los ácidos minerales diluidos. Los demás hidratos de carbono (el almidon, la goma, la celulosa) se transforman en glucosa por los fermentos ó los ácidos. El almidon se transforma en dextrosa por la ptialina y por los ácidos, en maltosa (?) por la diastasa (malta). Todos los hidratos de carbono citados en último lugar pueden, por tanto, servir tambien para las fermentaciones, con tal de que simultáneamente se hallen en el medio nutritivo fermentos que los transformen en glucosa; porque, como estos fermentos se producen de ordinario en gran cantidad por los propios organismos que dan origen á la fermentacion (inversina de la levadura), tiene poca importancia en la práctica la imposibilidad en que se encuentran de fermentar directamente el azúcar de caña, el almidon, etc. Con frecuencia se produce la fermentacion cuando estas sustancias se hallan solas, faltando glucosas directamente descomponibles; á lo más es un poco lenta.

La descomposicion específica de las glucosas en alcohol y ácido carbónico se debe á las levaduras, pero no todas las especies de *saccharomyces* tienen el poder de provocar la fermentacion de un modo tan enérgico. Sobre todo hay dos especies que obran bien, y son: el *saccharomyces cerevisiae* y el *saccharomyces ellipsoideus*. El primero se cultiva siempre en el mosto de cerveza; prodúcese una nueva fermentacion cuando la levadura del mosto fermentado se trasporta á un nuevo líquido fermentescible. Segun el curso más ó ménos agitado de la fermentacion, se obtiene levadura *alta* ó levadura *baja*. En la primera es muy rápida la gemmacion; de ella resulta la formacion de aglomerados celulares que presentan mejores puntos de apoyo á la corriente del ácido carbónico, de suerte que se desgarran en su superficie. El *saccharomyces ellipsoideus* es el fermento más difundido; se desarrolla en los más diversos líquidos que contengan azúcar, exponiéndolos al

aire, ó bien penetra en estos líquidos por intermedio de los granos de uva, á los cuales se adhiere siempre. Todos los demás sacaromicetos, como el *saccharomyces apiculatus*, el *saccharomyces exiguus*, etc., presentan un desarrollo ménos rápido y provocan fermentaciones ménos intensas. Algunos, como el *saccharomyces glutinis*, no producen fermentacion. El *mycoderma* no produce fermentacion sino cuando se ve obligado á multiplicarse sumergido en los líquidos; esta fermentacion es poco importante y dura poco.

Las vegetaciones análogas á los sacaromicetos, producidas por los mohos, provocan fermentaciones más enérgicas que las últimas levaduras citadas, en el sentido de que sumergidas en soluciones azucaradas determinan una descomposicion bastante enérgica del azúcar, formándose alcohol y anhídrido de carbono. Al mismo tiempo se aproximan á los fermentos verdaderos, por sus condiciones de crecimiento y de forma. Estas cualidades las encontramos pronunciadas sobre todo en el *mycoderma racemosus*, el *mycoderma circinelloides* y el *mycoderma spinosus*; ménos, en el *mycoderma mucedo*, y casi nada, en el *mycoderma stolonifer*. Tambien otros mohos tienen la propiedad (cuando se desarrollan en soluciones azucaradas, al abrigo del oxígeno) de producir hue llas de alcohol y anhídrido de carbono; pero esta formacion, cuantitativamente, es muy inferior á la producida por las mucoríneas y la verdadera levadura. Se debe únicamente á la respiracion intramolecular, merced á la cual las células de cualquiera planta más elevada producen tambien alcohol y anhídrido de carbono. Además, cuando los hidratos de carbono fermentan por influjo de los esquizomicetos, sucede con frecuencia que hay abundante formacion de anhídrido carbónico y de alcohol; pero en este caso siempre se forma un gran número de otros productos, de suerte que la cantidad de alcohol es, relativamente, reducida. Por consiguiente, la formacion de alcohol y de anhídrido de carbono no es característica de la levadura, sino más bien la formacion en grandes cantidades y, por decirlo así, exclusiva de estos cuerpos á expensas de sustancias azucaradas. Además, el hecho de que, por el contrario, la presencia del oxígeno no dificulta la formacion de tales cuerpos, diferencia estos organismos de la fermentacion de aquellos que no obran sino en ausencia del oxígeno.

En otro tiempo, representóse la descomposicion de la glucosa durante la fermentacion por medio de una ecuacion muy sencilla; pensábase que se producía una disociacion de la molécula de glucosa en dos moléculas de alcohol y dos de anhídrido de carbono.

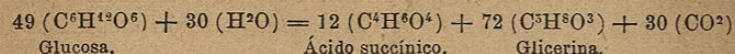


Sin embargo, Pasteur demostró que se producian de una manera

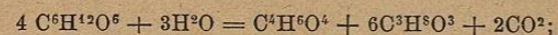
regular otros productos más, aún cuando fueran muy puros los materiales fermentescibles y la misma levadura.

Halló unos 2,5 á 3,6 por 100 de azúcar fermentado en forma de glicerina: $C^3H^5(OH)^5$; y de 0,4 á 0,7 por 100 en forma de ácido succínico: $C^4H^4(CO.OH)^2$. También demostró la presencia constante de huellas de ácido acético y, con frecuencia, de otros alcoholes, como el alcohol amílico, etc.

Se ha tratado de representar la formación de estas sustancias accesorias por una fórmula, ya según Pasteur:



ó bien, según Monnoyer:



pero sin poder establecer de una manera exacta la relación de las cantidades. Se encuentran estos mismos productos secundarios en las fermentaciones provocadas por los fermentos de las mucoríneas; á lo ménos, Fitz ha podido demostrar con certeza la presencia del ácido succínico en este caso. Además, Brefeld ha visto que los productos secundarios se forman en cantidad tanto más considerable cuanto más desfavorables sean las condiciones de la nutrición de estos agentes fermentativos. Hacia el fin de la fermentación parecen acumularse tales materias; y los agentes fermentativos, que sólo sostienen ésta difícilmente y se reducen á otras condiciones de existencia, producen en abundancia productos secundarios (el *mucor mucedo* más que el *mycoderma racemosus*, y el *mycoderma stolonifer* más que el primero).

Pudiera quizá creerse que el ácido succínico, la glicerina, etc., representan productos de nutrición propios de las levaduras. En todo caso, debemos admitir que junto con la destrucción del azúcar se producen también descomposiciones y, en presencia del oxígeno, oxidaciones complejas de las sustancias del protoplasma, nitrogenadas ó no. Estos fenómenos dan origen á la formación de los productos ordinarios de la nutrición; pero estos últimos rara vez son idénticos á los productos accesorios de la fermentación; la cantidad de éstos es mucho más considerable y su cualidad en extremo característica. Además, en este caso, la cantidad de los productos secundarios debiera de ser proporcional á la cantidad de las células de levadura vivas, y depender, por tanto, desde luego, de la cantidad sembrada. Pero, hasta ahora, no se ha observado nada semejante.

Por eso, debemos admitir que el azúcar se disocia en realidad durante la fermentación, según una ecuación complicada, con formación regular de glicerina y ácido succínico; ó bien, que la aparición de estas

sustancias depende del empleo de materiales impuros, de la presencia de esquizomicetos extraños, y provocan la descomposición de los materiales nutritivos que fermentan. Debe admitirse la posibilidad de tal contaminación respecto á todas las investigaciones hechas hasta hoy, aún cuando, desde Pasteur, se hayan esforzado los autores por tomar las mayores precauciones. Pero por los métodos primitivamente empleados no era posible obtener las levaduras en estado de pureza.

Sólo en estos últimos años ha sido cuando, merced á los métodos de Koch, ha podido Hansen obtener materiales puros en absoluto. Es preciso aguardar los resultados del análisis de los productos de las fermentaciones determinadas por estas levaduras.

Muchos sabios se han ocupado de una manera especial acerca de lo que se llama «fermentación espontánea de la levadura». Proyécese ésta cuando se abandonan á sí mismas grandes cantidades de levaduras frescas y vivaces, en presencia de suficientes cantidades de agua, á una temperatura de 25 á 30°, y cuando son insuficientes las cantidades de aire. En estas condiciones, prodúcense en abundancia anhídrido carbónico y alcohol, al mismo tiempo que la levadura se transforma en una sustancia blanda, que tratada por agua caliente da una cantidad de sustancias consideradas como productos de la destrucción ó de la nutrición de las levaduras. Según Béchamp y Schützenberger, el agua de lavado contiene albúminas, goma, un fermento levogiro llamado *zymasa*, pseudo-leucina (que encierra cantidades variables de azufre), tirosina, butalanina, carnina, xantina, guanina y sarkina. Las sustancias citadas en último lugar provienen evidentemente de la destrucción de las albúminas; pero la producción del anhídrido de carbono y del alcohol no puede explicarse sino por el hecho de que se encuentre azúcar fermentescible en la levadura, ó que un elemento constitutivo de ésta se transforme fácilmente en aquella sustancia.

Entre los generadores del azúcar puede colocarse el grupo de los hidratos de carbono, tales como la celulosa, la goma, ó también las materias proteínicas. Según Pasteur, se encuentran, pues, constantemente en la levadura sustancias análogas al azúcar, que, como tales, son difíciles de extraer, pero que bajo la influencia de los ácidos minerales se transforman en azúcar. Estas sustancias, así como la celulosa de la membrana, según Pasteur, dan los productos de la fermentación espontánea. Liebig daba otra explicación enteramente diversa de estos fenómenos. En los casos de fermentación espontánea de la levadura encontró tal cantidad de alcohol y de anhídrido carbónico (de 8 á 13,15 por 100 del peso neto de la levadura) que toda la celulosa y todos los hidratos de carbono de ésta no bastarían para producir dicha cantidad. Para dar esta última es preciso necesariamente que se verifique una disociación de las albúminas. Liebig atribuía la mayor im-

portancia á esta destrucción de las albúminas, viendo en ella el hecho constante verdaderamente esencial de la fermentación. Según el concepto de este autor, la naturaleza del proceso fermentativo se funda, en general, en el hecho de que una sustancia proteínica en vías de destrucción trasmite su movimiento químico á otra molécula.

Las investigaciones de Nægeli han demostrado de la manera más clara que en la fermentación espontánea de la levadura el proceso no se limita únicamente á ésta por depender de ella sola, sino que en las investigaciones que se han hecho, los esquizomicetos han colaborado en la destrucción de la sustancia misma de la levadura. De hecho, son tales las circunstancias descritas como necesarias para que se realice la fermentación espontánea, que necesariamente ha de producirse un desarrollo activo de esquizomicetos. Estos se alimentan entónces á expensas de las células atrofiadas de la levadura y, verosímilmente, hacen solubles estas sustancias por efecto de la acción de los fermentos segregados. Cierta cantidad de los cuerpos nitrogenados que se encuentran en el extracto acuoso puede provenir de la actividad de los esquizomicetos.

También estos últimos pueden contribuir á la formación del alcohol y del anhídrido carbónico. En las investigaciones practicadas por Nægeli, añadiendo ácido nítrico que impida el desarrollo de los esquizomicetos, no encontró sino huellas de alcohol procedentes quizá de que las débiles cantidades de sustancias sacarinas contenidas en las células fermentan cuando no se les da ninguna otra sustancia análoga. Este hecho sería semejante á las descomposiciones que se producen en un animal en ayunas. En cuanto al hecho de saber si la proteína de las células muertas puede elaborarse por otras células de la levadura, nada se sabe. En las levaduras no existen los fermentos necesarios para disolver estas sustancias. Investigaciones por medio de cultivos puros serán las únicas que podrán ilustrarnos acerca de la verdadera extensión de la fermentación espontánea y los productos de nutrición que se forman en este caso.

Cochin (1) ha tratado de determinar lo que dura la fermentación, midiendo de continuo el anhídrido de carbono formado.

Ante todo, advierte que trascurren de diez á veinte minutos antes de que se produzca una fermentación activa. Este tiempo es aún más largo en las soluciones diluidas. A partir de este momento, la curva que representa el curso de la fermentación va aumentando y describe una parábola. La incubación no depende de que la solución de azúcar tenga que penetrar en el interior de las células, puesto que se observa

(1) Cochin. *Comp. rend.*, t. XCVI.

lo mismo cuando se emplea levadura tomada de una solución en plena fermentación.

El valor cuantitativo de la fermentación depende de varios factores: de la composición de los materiales fermentescibles, de lo que dura la fermentación, de la naturaleza de la levadura y de diversas influencias exteriores.

La cantidad de azúcar de la solución no debe exceder del 35 por 100; más allá de este límite las células sufren por efecto de la falta de agua. Las cantidades más favorables corresponden á 2 y 4 por 100, después á 20 ó 25 por 100 (Wiesner). Este hecho, sin embargo, requiere todavía confirmación. A partir de cierto límite, es indiferente la cantidad que se añade de levadura. Dumas ha podido comprobar que un gramo de azúcar se descompone por completo á los 24^o en otros tantos minutos, por 20 gramos de levadura.

Añadiendo 100 gramos de levadura no cambia nada de este resultado. Con una siembra abundante en una solución pura de azúcar se produce una fermentación que cesa muy pronto, dejando una levadura agotada y pobre de nitrógeno. Cuando una cantidad relativamente débil de levadura debe producir una fermentación continua, es necesario que la solución contenga otras sustancias nutritivas y en particular materias nitrogenadas. Por lo demás, la misma acumulación del alcohol pone término á la fermentación. Cuando la cantidad formada es de 12 por 100, es difícil el desarrollo de la levadura. Cuando corresponde al 14 por 100, la fermentación cesa por completo. Este límite aún es más bajo para las formas de las mucoríneas que provocan la fermentación, bastando $3\frac{1}{4}$ á 4 por 100 de alcohol (1,3 por 100 para el *mucor stolonifer*). Estas mismas formas son también más sensibles á la influencia de la concentración. En efecto, en este caso la fermentación sólo se verifica en soluciones que contengan menos de 7 por 100 de azúcar.

Entre las influencias exteriores activas hay que señalar ante todo la temperatura. En general, el grado más favorable es el de 25^o. Sin embargo, este óptimum puede variar por el influjo de los más diversos factores. La influencia del oxígeno es muy grande. Según Nægeli, la presencia del oxígeno favorece en todos los casos la fermentación y, de preferencia, cuando la mezcla nutritiva contiene al mismo tiempo buenas sustancias nutritivas, por lo cual puede ser entónces mucho más activa la multiplicación de las células. De las recientes investigaciones de Hansen (1) resulta que la formación de las mismas cantidades de productos al abrigo del aire exige más tiempo; aún cuando sea

(1) Hansen. *Meddelelser fra. Carlsberg Lab.*, t. I, cap. 2.^o