

UN RECORRIDO POR EL NACIMIENTO DE LA ENZIMOLOGÍA Y LOS ORÍGENES DE LA BIOQUÍMICA ACTUAL

Juan José Aragón

*Departamento de Bioquímica de la UAM e Instituto de Investigaciones Biomédicas
Alberto Sols UAM-CSIC*

EN MEMORIA DE ROBERTO MARCO

I. INTRODUCCIÓN

Cuando recibí la amable invitación de Jesús Lizcano a participar en el número-homenaje de la revista Encuentros Multidisciplinares dedicado a Roberto Marco, de la cual fue uno de sus principales impulsores, me pareció oportuno dedicar mi contribución a recorrer con una visión de conjunto parte de los que fueron hitos esenciales en el origen del estudio de los enzimas, que supusieron de hecho el nacimiento de la bioquímica moderna. La razón de su elección estriba en que este tema conjunta, a mi entender, las dos vertientes definitorias de la actividad científica de Roberto: su inicio como historiador de la ciencia médica -afán que siempre tuvo presente- y su desarrollo posterior como investigador señero en el ámbito de la bioquímica y la biología molecular, donde se introdujo precisamente a través de la experimentación sobre enzimas, para pasar luego definitivamente al campo de la biología del desarrollo.

Sólo unas líneas para centrar el tema en torno al cual girará esta contribución. Es ya de común conocimiento que los enzimas - nombre designado por la Real Academia Española de la Lengua como ambiguo (Real Academia Española, 2001), y por tanto utilizable igualmente en masculino o femenino- son los agentes biológicos responsables de que puedan tener lugar la miríada de procesos químicos que median la actividad vital, o lo que es igual, la vida misma. La responsabilidad de estos agentes se asienta sobre sus elementos más básicos y característicos, su exquisita especificidad por un lado, que les permite distinguir entre la inmensa variedad de los compuestos biológicos y de sus intercambios químicos en el medio vivo y, por otro, su capacidad extrema de acelerar (catalizar) la velocidad de las reacciones propias de este medio hasta rangos de 10^5 a 10^{14} veces como promedio, pudiendo alcanzar incluso las 10^{17} veces.

Esta enorme eficacia de los enzimas es la razón de la suavidad de las condiciones con que pueden acontecer los fenómenos vitales, un hecho que tanto ha llamado la atención en biología a lo largo del tiempo y que hizo concebir muy pronto la necesidad de la catálisis (Berzelius, 1837). De forma que la inmensa mayoría de los procesos vitales necesitan ser catalizados, aun los más sencillos. El corolario es inmediato: no hay vida sin catálisis, la cual es responsable de las características distintivas de lo vivo, como la complejidad estructural, la capacidad de extraer, transformar y utilizar la energía del medio ambiente e incluso de la que es la quintaesencia de los seres vivos, su capacidad de autorreplicación.

La aparición de la catálisis se constituye así en el gran salto en la evolución molecular hacia la vida. Arthur Kornberg, el maestro de Roberto Marco durante su etapa postdoctoral en los Estados Unidos, supo ilustrar bien el papel central de los enzimas en la biología al escribir que *“What gives the cell its life and personality are enzymes. They govern all body processes; malfunction of even one enzyme can be fatal. Nothing in nature is so tangible and vital to our lives as enzymes, and yet so poorly understood and appreciated by all but a few scientists”* (Kornberg, 1989, p. 36).

II. UNA CONTRIBUCIÓN CLAVE DE ROBERTO MARCO A LA ENZIMOLOGÍA DE HOY.

Roberto Marco -es bien sabido por los que tuvimos la suerte de tratarle- poseía una lucidez intelectual muy por encima de la media. Una prueba de ello -entre las múltiples que podrían citarse- fue que tan tempranamente como en su etapa de becario predoctoral, junto a su maestro Alberto Sols, publicasen ambos un trabajo que clarificó, y en cierta medida revolucionó, el conocimiento aún nebuloso que por aquel entonces se tenía del funcionamiento de los enzimas en dependencia de los agentes que regulan su actividad, los metabolitos (compuestos del metabolismo celular que intervienen como sustratos y reguladores), en conjunción con otras proteínas, muchas de ellas enzimas a su vez. El trabajo se tituló: *“Concentrations of Metabolites and Binding Sites. Implications in Metabolic Regulation”* (Sols and Marco, 1970).

Con la exigencia de someterse sistemáticamente a las condiciones de la fisiología celular -tan característica de Sols-, y la aplicación estricta del análisis cuantitativo con una visión integradora -huella clara de Roberto-, este trabajo se convirtió pronto en un clásico a la hora de abordar cuantitativamente las funciones celulares a través de los enzimas que las gobiernan, sorteando los vagos análisis cualitativos considerados hasta entonces, como indicaron los autores al principio del artículo: *“The rapidly increasing interest in the study of the regulation of cell functions suggests the convenience of giving up the old qualitative approach in biochemistry for a more comprehensive quantitative one, if a deeper understanding of the real cellular processes is to be obtained”* (p. 227).

Sols y Marco afrontaron -y enseñaron a los demás a solventar- el problema básico que la concentración de enzima, junto con la de los metabolitos y sus varios sitios ligantes, suponen para evaluar correctamente el control que estos agentes ejercen sobre la actividad enzimática. El hecho, frecuente hasta entonces, de no analizar con claridad la magnitud de la unión de un metabolito dado a su sitio o sitios ligantes estaba en el fondo de muchos resultados inexplicados. El análisis crítico que ellos realizaron sobre estos presupuestos supuso una forma enteramente nueva y clarificadora de abordar la regulación metabólica, llegando a conclusiones mucho más cercanas a la realidad celular, que en no pocas ocasiones abatieron paradigmas hasta entonces aceptados como tales.

Con este trabajo se planteó el hecho (por primera vez con completo rigor, por extraño que hoy parezca) de que a la hora de evaluar la acción de un metabolito sobre un proceso dado (su efecto sobre un enzima), es ineludible distinguir entre la concentración del metabolito en cada uno de sus estados: total, libre y ligado; puesto que sólo el segundo tiene valor para modificar el proceso, mientras que el último, además de condicionar el anterior, impone un nivel básico de actividad de encontrarse ya unido al enzima responsable, sin tener en cambio efecto alguno sobre el mismo de hallarse ligado a otros enzimas o proteínas diferentes. Merece la pena destacar también la distinción que establecieron entre la concentración molar intracelular de una proteína enzimática determinada y lo que ellos denominaron “normalidad” de sitios de unión para un metabolito dado, al tener en cuenta que estos sitios no siempre corresponden al número de subunidades de una proteína, bien porque se compartan entre varias o bien porque algunas puedan permanecer inactivas; distinción tanto más llamativa si se considera que el estudio de la estructura cuaternaria de proteínas era aún de muy corta edad, siendo escasas las proteínas cuya estructura tridimensional se había resuelto por entonces mediante difracción de rayos X (abordaje siempre formidable pero verdaderamente gigantesco en aquella época).

Todas estas consideraciones, que hoy pueden parecer obvias, no lo eran así antes de la publicación de este artículo, en el que incluyeron también un buen número de casos de enzimas y metabolitos reguladores analizados con sus nuevos presupuestos, al igual que casos de desbalances manifiestos entre las concentraciones de unos y otros agentes. Los presupuestos sobre los que desarrollaron sus análisis, en poco tiempo se hicieron extrapolables a otros procesos bioquímicos -más allá de la estricta regulación enzimática-, que son dependientes de la unión de un ligante a una proteína o bien de la unión de proteínas diferentes entre sí, de manera que este tipo de análisis implica hoy la práctica generalidad de la regulación biológica.

El impacto de este trabajo fue muy notable desde el principio, convirtiéndose pronto en cita casi obligada a la hora de realizar análisis de regulación metabólica. Circunstancia bien conocida por los investigadores de este campo, pero que sin embargo no puede objetivarse con los sistemas actuales de evaluación de citas bibliográficas, posiblemente debido a la fuente en que se publicó o a la forma en que el artículo fue originalmente indexado.

III. LOS ENZIMAS Y EL ORIGEN DE LA BIOQUÍMICA MODERNA.

La historia es una necesidad básica en el ejercicio de la labor científica. Decía el biólogo evolucionista Ernst Mayr (1904-2005), que "*Actually, most scientific problems are far better understood by studying their history than their logic*" (Mayr, 1982, p. 6), lo que en parte recuerda la afirmación de Aristóteles de que las cosas se entienden mejor cuando uno ha logrado ver con alguna claridad como se formaron (citado en Lain Entralgo, 1978). Incluso la propia exposición de un hallazgo o de la solución a un problema no resuelto, en la forma habitual de una publicación, sitúa al científico en un contexto histórico como ha señalado Herbert Friedman: "*Scientific papers have a time-honored way of presenting discovery in the framework of antecedents, of showing the author's or authors' new ideas and observations against the background of accepted fact or established theory. Hence scientists, by consciously placing themselves in a given intellectual universe, necessarily write their own history*" (Friedman, 1981, p. xiv). De manera que, sin ser ni pálido reflejo de historiadores profesionales, los investigadores de profesión estamos obligados a recurrir a la historia si queremos explicarnos la razón de ser de un aspecto determinado de la ciencia, y en el caso de este artículo el del origen de los enzimas, puesto que fue su descubrimiento lo que marcó el inicio de la bioquímica actual.

En la protohistoria de este desarrollo, un movimiento tan oscuro y complejo como la Alquimia ofrece un antecedente de interés con el empleo de los *elixires*. Los alquimistas, protobioquímicos se les ha llamado (Florkin, 1972) por ser los primeros en usar el laboratorio -para ellos también oratorio-, creían firmemente, por diversas consideraciones, en la posibilidad de la transmutación de los metales y en particular su conversión en oro, como es conocido. Transmutación que sólo se imaginaba posible en presencia de la *pedra filosofal*, cuya preparación era tarea primordial, o también por acción de los *elixires*, como se extendió entre los alquimistas europeos.

Curiosamente, se consideraba a un elixir como una sustancia capaz de inducir un cambio químico con sólo estar presente y que podía actuar en cantidades muy pequeñas. Concepto, que como es fácil de apreciar estaba bastante cercano al término moderno de *catalizador*. Elixires a cuya búsqueda se lanzan afanosamente los alquimistas, pudiendo serlo además cualquier sustancia del laboratorio, y que tenían también otras connotaciones, como poseer las máximas propiedades médicas: devolver la juventud, inducir larga vida e incluso la inmortalidad. Los trabajos de los alquimistas, aunque estériles en sus fines, condujeron no obstante a progresos en la química, como fue el descubrimiento del alcohol y de los ácidos minerales y el desarrollo de técnicas de laboratorio, particularmente la destilación. En el siglo XIII la alquimia adquiere respetabilidad filosófica con Roger Bacon y, en particular, con San Alberto Magno quien emplea, quizás por primera vez, la palabra *afinidad* en el sentido actual al decir que "*el azufre ennegrece la plata y abrasa en general a los metales a causa de la afinidad natural que tiene por ellos*" (citado en García Font, 1976).

A lo largo del siglo XIX fueron descubriéndose agentes biológicos diversos con capacidad catalítica (enzimas), algunos ya mencionados. E incluso ya en el siglo XVIII, René Réaumur (1683-1757) y Lázaro Spallanzani (1729-1799) establecieron la actividad digestiva del jugo gástrico o de la saliva, mucho antes de que el fenómeno de la catálisis fuese reconocido. Pero el proceso cuyo estudio contribuyó más directamente al conocimiento de los enzimas y al desarrollo de la bioquímica moderna fue sin duda la fermentación alcohólica, cuya naturaleza fue motivo de preocupación prácticamente desde la antigüedad, con intenso interés para los alquimistas y los adeptos a la teoría del flogisto.

En los siglos XVII y XVIII, las ideas circulantes sobre este proceso eran considerablemente complejas. Mentas como la de Robert Boyle (1627-1691) lo asociaban a la fiebre, por la propiedad común de elevación de la temperatura, y por la misma época también se le ligó a la digestión. Un ulterior elemento a añadir fue la generación espontánea. La fermentación se iniciaba también aparentemente de la nada, lo que fue rebatido elegantemente de forma experimental por Spallanzani, aunque sus resultados fueron rechazados sin fundamento por los defensores a ultranza de la generación espontánea.

El proceso de la fermentación no comenzó a clarificarse hasta Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794) con su inmensa obra química, a pesar de lo prematuro de su muerte, guillotinado por el Terror [*"la République n'a pas besoin des savants"* (citado en Babor e Ibarz, 1965)], pronunció el presidente del tribunal que le condenó). Lavoisier mostró mediante su análisis elemental que un simple cambio químico, la escisión del azúcar en alcohol y dióxido de carbono, reemplazaba a la hasta entonces considerada como entidad misteriosa, manteniéndose constante la cantidad total de materia a lo largo del proceso, y sin sufrir cambio alguno durante el mismo la levadura adicionada. Sustancia ésta última en forma de sedimento procedente de otra fermentación, sin la cual el proceso no tenía lugar y considerada entonces como algo meramente químico.

El problema clave fue discernir las causas del proceso, la naturaleza del *fermento* implicado, concretándose ya este término en el agente responsable de la transformación, puesto que hasta entonces se le había dado un significado altamente vago. El interés por resolver este problema fue tal, que en el año octavo de la República Francesa (hacia 1800), el Instituto Nacional de la Ciencias y las Artes de Francia convocó un premio consistente en una medalla de un kilogramo de oro, para quien averiguara las características que distinguen las sustancias que actúan como fermentos de las que sufren la fermentación (Fruton, 1972). Interrogante que equivalía a formular nada menos que el problema central de la enzimología: conocer la diferencia entre lo que ahora llamamos enzima y lo que hoy conocemos como sustrato (Friedmann, 1981). El premio no llegó a concederse y fue retirado 4 años más tarde por falta de fondos.

Gay-Lussac (1778-1850), inspirado en la conservación doméstica de alimentos, pensaba que la fermentación se originaba por efecto del oxígeno, tras observar que al abrir botellas mantenidas cerradas conteniendo zumo de uvas, se iniciaba la fermentación en contacto con el aire. De manera que el *fermento* sería formado por acción del oxígeno en el líquido. Respecto a la levadura concluyó que era algo diferente del verdadero agente de la fermentación, al que llamó *fermento soluble*, a la vista de la naturaleza insoluble de la levadura, que permanecía como algo misterioso. Aunque ya un siglo antes, el pionero microscopista Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) había revelado la existencia de partículas microscópicas a modo de glóbulos en los sedimentos de la fermentación, que eran células de levadura, sin que entonces se reconociesen como tales. Gay-Lussac fue, no obstante, quien estableció la ecuación de este proceso, según la cual una molécula de glucosa es escindida en dos moléculas de dióxido de carbono y dos de etanol. O al menos así se acepta en términos generales, pues no parece que esta expresión se usase de esa forma en su notación química final en tiempos de Gay-Lussac (Schlenk, 1997).

La demostración de que los agentes responsables de la fermentación son organismos vivos y concretamente levaduras, fue realizada en 1837 de forma independiente y prácticamente simultánea por tres investigadores, Charles Cagniard-Latour (1777-1859), Theodor Schwann (1810-1882) y Friedrich T. Kützing (1807-1893). En contra de Gay-Lussac, Schwann mostró que la putrefacción que aparece tras pasar aire al medio fermentable ya hervido, podía evitarse si el aire se calienta antes a alta temperatura, con lo que probó además la no formación de microorganismos por generación espontánea. Observó Schwann que la levadura estaba presente siempre que había fermentación, la cual no se producía en condiciones que visiblemente mataban este organismo, como por ejemplo el calor. Esto, junto a su intuición refiriendo que *"the exciting principle in the fermentation process must be a*

material that is evoked and increased by the process itself, a phenomenon that applies only to living organisms" (citado en Fruton, 1972), le llevó a concluir que era el desarrollo de un organismo vivo, la levadura -el hongo del azúcar como él la llamó ("*Zuckerpilz*", luego denominado *Saccharomyces*)-, el agente responsable de la fermentación. Schwann contribuyó además significativamente al establecimiento de la Teoría Celular, considerando la célula como principio estructural y origen común a todos los seres vivos y como unidad básica del metabolismo, término acuñado por él mismo.

Sin embargo, la tesis de que la fermentación alcohólica era llevada a cabo por organismos vivos encontró un fuerte rechazo, particularmente por parte de algunos de los químicos más influyentes, como el propio Berzelius y, especialmente, Justus von Liebig (1803-1873), que hizo contribuciones trascendentales para la química orgánica y que lideraba con gran poder lo que podríamos llamar la "bioquímica" de entonces. Para Liebig, la fermentación estaba relacionada con su interpretación vitalista de la biología. De manera que al finalizar la fermentación, provocada por supuestas vibraciones tras la muerte de los organismos vivos una vez ausente la fuerza vital, se depositaría un sedimento "*llamado levadura*".

Liebig permaneció como un convencido vitalista, rehusando creer que las levaduras estuvieran vivas. Hasta el punto de que, junto con Wöhler (1800-1882) -quien en 1828 sintetizó por primera vez un compuesto orgánico, la urea- escribió un panfleto anónimo ridiculizando y atacando cruelmente la noción de que la fermentación pudiera deberse a una célula viva. Esta crítica fue particularmente sentida por Schwann, siéndole además muy perjudicial. Le impidió proseguir su actividad investigadora en Alemania, viéndose obligado a exiliarse en Bélgica como profesor de Anatomía de la Universidad Católica de Lovaina y acabando de hecho con su carrera científica.

Fue necesario esperar a la obra de Pasteur para que se hiciera justicia al hallazgo de Cagniard-Latour, Schwann y Kützing. Pasteur demostró que efectivamente la fermentación era correlativa con el desarrollo y multiplicación de la levadura y probó la inexistencia de la generación espontánea, lo que recibió reconocimiento general en 1872 marcando el comienzo de la moderna microbiología (Florkin, 1972). Sin embargo, Pasteur consideró insistentemente a la fermentación como necesaria e inextricablemente ligada al mantenimiento de la levadura como célula viva.

Por esta época se habían obtenido en forma soluble diversos agentes responsables de procesos degradativos. Como la diastasa (hoy amilasa), el primer enzima purificado, por A. Payen y J.F. Persoz en 1833 extrayéndolo de un extracto de malta; la sacarasa (entonces llamada invertasa), extraída de la levadura por Pierre Berthelot o la pepsina, identificada por Schwann para llamar al principio responsable de la digestión gástrica. Para estos agentes se acuñó el término de *fermentos solubles* (término ya utilizado por Gay-Lussac, aunque con sentido diferente) o *desorganizados*, frente a los llamados *fermentos insolubles* para aquellas actividades degradativas que no podían ser extraídas de organismos vivos, como la propia fermentación alcohólica, y que serían por ello los propios organismos como tales, por lo que también se les denominó *fermentos organizados*.

Por aquel entonces, a mediados del siglo XIX, los fermentos conocidos como *solubles*, generalmente con actividades de carácter hidrolítico, fueron considerados como catalizadores químicos, según el término ya acuñado por Berzelius. Lo que estuvo en disputa fue la cuestión de si existirían catalizadores similares en las células de levadura, que serían entonces los responsables de la fermentación de los azúcares (Fruton, 1992). Esta fue la postura de Berthelot (1827-1907), proponiendo que este proceso resultaría de la producción por los organismos vivos de fermentos similares a los solubles, que actuarían como auténticos reactivos químicos, por lo que el camino a seguir pasaba por reproducir el mismo fenómeno con medios químicos e interpretarlos en términos exclusivamente mecánicos. Postura, pues, directamente enfrentada a las ideas de Pasteur, para quien los verdaderos fermentos eran los seres organizados.

La posición de Berthelot fue fortalecida por Claude Bernard (1813-1878), cuyas observaciones sobre la digestión y particularmente sobre la degradación del glucógeno por un extracto hepático, le hicieron rechazar la idea de que un proceso de degradación química, como la conversión de azúcar en alcohol y dióxido de carbono, fuese correlativo con la vida. E igualmente coincidente con estas ideas fue Moritz Traube (1826-1894), defendiendo la naturaleza química de los fermentos e incluso anticipando de forma clarividente que el fracaso en aislarlos a partir de microorganismos podía deberse a su alteración o inactivación (Kornberg, 1989). Como veremos más adelante, la postura de Pasteur, aunque errónea, no estuvo falta de apoyo experimental.

En este marco, Willy Kühne (luego Wilhelm Friedrich Kühne; 1837-1900) -quien introdujo las palabras *miosina* y *tripsina* para las respectivas sustancias que él mismo descubrió-, acuña en 1876 la palabra *enzima*, del griego *en zýme*, “en la levadura”, en el sentido de “encontrado en la levadura”, y por ende extraído de ella, describiendo el objetivo que persiguió con ello como "*I took the liberty of giving the name enzymes to some of the better known substances that many call unorganized ferments*" (Kühne, 1877, p. 170). O sea, no para denominar por igual a los dos tipos de fermentos que entonces se distinguían, como en alguna ocasión se ha referido (Segel, 1993), sino para llamar a los fermentos desorganizados o solubles, reconocidos como agentes químicos, con el fin, pues, de perpetuar la distinción con los fermentos organizados, a los que Kühne consideraba -al igual que muchos entonces-, radicalmente distintos y estrictamente correlativos con las células vivas, enfatizando así su carácter biológico frente al químico de los fermentos solubles.

Bien es verdad que más tarde, el propio Kühne sugirió que se llamase enzimas a todos los fermentos, pero esta propuesta no tuvo entonces repercusión (Gutfreund, 1976). Resulta irónico que el término más antiguo de fermento, cuando no implicaba distinción alguna, e incluso en parte el de los elixires de los alquimistas, está mucho más cercano al concepto actual de enzimas como agentes biocatalizadores -química y biológicamente relacionados, que actúan sobre reacciones diferentes- que este nuevo término en el sentido con que fue acuñado (Friedmann, 1981). En realidad, la vieja expresión de fermento hacía igualmente referencia a la levadura, a la que de hecho se llamó así desde antiguo, derivándose del latín *fervere*, “hervir”, por alusión a la naturaleza agitante de los líquidos en fermentación (Corominas y Pascual, 1980).

En medio de la polémica entonces planteada, no resulta extraño que la nueva palabra de enzima no fuese bien recibida por muchos (Friedmann, 1997). Entre otros, fue rechazada enérgicamente por Felix Hoppe-Seyler (1825-1895) -quien acuñó el término *bioquímica* en 1877 (Florkin, 1972) e inició los primeros intentos de independencia respecto de la fisiología-, manteniendo, al igual que Traube y Berthelot, que las fermentaciones eran procesos químicos que tenían que tener solamente causas químicas. En este contexto, es de mencionar que aunque, ciertamente, Emil Fischer utilizó la palabra enzima en 1894 en su clásico trabajo sobre el modelo de la llave y la cerradura al explicar la especificidad de sustrato de los enzimas (Fischer, 1894)-, al igual que O’Sullivan y Tompson -en su también clásico estudio sobre la formación del complejo enzima-sustrato (O’Sullivan y Tompson, 1890)-, en ambos casos lo hicieron para referirse a actividades enzimáticas (glicosidasas, invertasa) que se extraían de la levadura, y por ello consideradas entonces como fermentos desorganizados.

Así las cosas, en 1897 tiene lugar un descubrimiento absolutamente trascendental para la historia de la bioquímica. Eduard Buchner (1860-1917), en el laboratorio de su hermano Hans en Munich y con la ayuda de Martin Hahn, descubre de forma accidental que un extracto de levadura es capaz de llevar a cabo la fermentación alcohólica. Hans Buchner pretendía usar los extractos para estudios inmunológicos y con objeto de mejorar su preservación, Martin Hahn sugirió añadirles sacarosa a alta concentración, pensando en su uso doméstico como conservante. Y fue Eduard Buchner el que interpretó el fenómeno al percatarse de la fermentación en esas condiciones.

El descubrimiento fue un ejemplo paradigmático de lo que en medios anglosajones se conoce como *serendipidad* (del inglés *serendipity*). Palabra de gran valor en investigación científica -no

aceptada aún en nuestro idioma-, que fue acuñada en el siglo XVIII por Horace Walpole (1717-1797), tras leer un cuento titulado “El Viaje de los Tres Príncipes de Serendip” (la isla de Ceilán, la actual Sri Lanka), publicado en Venecia en el siglo XVI, narrando los múltiples descubrimientos fortuitos que hacían estos príncipes gracias a su sagacidad (Remer, 1965). Walpole usó esta palabra para llamar al hecho de encontrar algo nuevo, no por casualidad, sino cuando se va buscando otra cosa diferente, como de hecho ha ocurrido en muchos hallazgos científicos.

El descubrimiento de Buchner fue producto de una mejora técnica; él y Martin Hahn habían perfeccionado el procedimiento de rotura de las levaduras, obteniendo extractos que estaban libres de células. De hecho, intentos de averiguar si un extracto de levadura fermentaba ya los habían hecho otros, pero sin éxito real por la contaminación celular de las preparaciones. Por ejemplo el mismo Pasteur, Berthelot o Claude Bernard, quien creyó haberlo conseguido. En el caso de Pasteur, parece ser que además utilizó una cepa de levadura menos adecuada que la de Buchner (Friedmann, 1997), y cuya invertasa -el primer enzima de la fermentación, encargado de romper la sacarosa- no soportaba el procedimiento de preparación del extracto, según se reveló mucho más tarde del examen de sus protocolos de trabajo (Kornberg, 1989).

Fueron también dificultades técnicas -que impidieron a algunos repetir el experimento de Buchner-, lo que hizo que este trabajo no fuese aceptado desde el principio, amén del conservadurismo hacia las ideas de Pasteur, rechazándose con ello que pudieran existir enzimas intracelulares (Florkin, 1975; Fruton, 1992). Paradójicamente, fue un discípulo de Pasteur, Emile Duclaux -quien le sustituyó como director del Instituto Pasteur- el que de forma más convincente aceptó el hallazgo de Buchner. Este descubrimiento tan notable -cuyo impacto trascendió las fronteras de la biología (Friedmann, 1997)- acabó, pues, con la postura de Pasteur, zanjando la polémica en torno a la necesidad de la célula viva para que la fermentación tenga lugar y terminando así con la distinción entre fermentos organizados y desorganizados.

Sin embargo, Buchner se guardó de llamar *enzima* al agente responsable de la fermentación y le denominó *zimasa*, a la vista de que, como él mismo refirió, los enzimas eran meramente agentes hidrolíticos [“*ordinary enzymes...are merely hydrolyzing agents*” (Buchner, 1897, p. 30)], puesto que ese era el tipo de agentes para los que -como hemos visto- se acuñó ese término, mientras que la fermentación alcohólica era claramente un proceso de mayor complejidad (Buchner, 1897). Fue esta la razón por la cual la palabra enzima no fue universalmente aceptada hasta bien entrado el siglo XX. Todavía en los años 1930, y por lo mismo, nada menos que Warburg, el bioquímico de más prestigio de su época, rehusaba hablar de “enzimas” refiriéndose a ellos como “fermentos” (con el término alemán de “Fermente”) (Fruton, 1992).

Pero como no es infrecuente en ciencia (el *nihil novum sub sole* de los latinos citando a Salomón) -y no se escapó a los escrutinadores sagaces de la historia-, Buchner tuvo un predecesor: la investigadora rusa Maria Manasseina (1843-1903). Quien a poco de aparecer el trabajo de Buchner reclamó la primacía del hallazgo, en base a la publicación de su tesis doctoral en 1872 (25 años antes) describiendo que la fermentación alcohólica era posible en una suspensión carente de células vivas de levadura tras haber sido destruidas por calor, de cuya gran significación supo percatarse (Lagnado, 1992). Sin embargo, la publicación de Manasseina apenas tuvo trascendencia en su momento y no pasó de ahí. La polémica con Buchner tampoco tuvo, al parecer, mayor prolongación. La mejor elaboración del trabajo de Buchner, tanto a nivel experimental como en la discusión de sus importantes y múltiples implicaciones, al igual que su rápida difusión y el hecho también de que Manasseina abandonó pronto su investigación le privó a ésta última del impacto formidable que el hallazgo del primero gozó casi de inmediato.

El descubrimiento de Buchner supuso el nacimiento de la enzimología y por ende el de la bioquímica moderna, abriendo la célula para hacerla asequible al estudio de sus funciones; en curiosa coincidencia con el descubrimiento por Joseph J. Thomson (1856-1940) en 1897 de la primera

partícula subatómica, el electrón, es decir, con lo que metafóricamente puede considerarse como la apertura del átomo. A partir de aquí, el extracto libre de células se constituyó en el método básico para el estudio químico de los seres vivos. Los extractos celulares suministraron el primer puesto de observación de un fenómeno y el punto de partida para el aislamiento y purificación del enzima o enzimas responsables, para poder investigar luego su función catalítica, la forma de regulación de su actividad, su asociación con otras enzimas y estructuras celulares y, eventualmente, el estudio de la base molecular de su función. La era de los “cazadores de enzimas”, como les llamó Arthur Kornberg (Kornberg, 1989), estaba abierta.

Sirva esta aportación sencilla de contribución al homenaje a quién además de investigador preclaro fue compañero enriquecedor y entrañable amigo, con el que compartí entusiasmo ante muchos de los logros de la investigación biológica e ilusiones por el deber ser de nuestra Universidad, a más de una particular afición a la historia del conocimiento científico.

REFERENCIAS

- Babor, J.A. e Ibarz, J. (1965): Química General Moderna. Marín. Barcelona.
- Berzelius, J.J. (1837): On a so far rarely observed force which is probably active in the formation of organic substances. Reimpresión abreviada en inglés de "Ueber eine, bei der Bildung organischer Verbindungen wirksame, bis jetzt wenig bemerkte Kraft" in Lehrbuch der Chemie, Arnoldische Buchhandlung, Vol. 6. En: Benchmark Papers in Biochemistry, Vol. 1, Enzymes (Friedmann, H.C. ed.) p. 129-132. Hutchinson Ross. Woods Hole, Massachusetts, 1981.
- Buchner, E. (1897): Alcoholic Fermentation Without Yeast Cells. Reimpresión abreviada en inglés de "Alkoholische Gährung ohne Hefezellen (Vorläufige Mitteilung)" Dtsch. Chem. Ges. Ber. 30: 117-124. En Great Experiments in Biology (Gabriel M.L. and Fogel, S. eds.) p. 27-30. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey, 1955.
- Corominas, J. y Pascual J.A. (1980): Diccionario Crítico Etimológico Castellano e Hispánico, Vol. 1. Gredos, Madrid.
- Fischer, E. (1894): Influence of configuration on the activity of enzymes. Chem. Soc. J. (Trans.) 57: 834-931. Reimpresión en inglés de "Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme" in Dtsch. Chem. Ges. Ber. 27: 2985-2993. En: Benchmark Papers in Biochemistry, Vol. 1, Enzymes (Friedmann, H.C. ed.) p. 217-223. Hutchinson Ross. Woods Hole, Massachusetts, 1981.
- Florkin, M. (1972): A history of Biochemistry, Part I Proto-Biochemistry, Part II From Proto-Biochemistry to Biochemistry. Comprehensive Biochemistry, Vol. 30. Elsevier. Amsterdam.
- Florkin, M. (1975): A History of Biochemistry, Part III History of the Identification of the Sources of Free Energy in Organisms. Comprehensive Biochemistry, Vol. 31. Elsevier. Amsterdam.
- Friedmann, H.C. (1981): Benchmark Papers in Biochemistry, Vol. 1, Enzymes. Hutchinson Ross. Woods Hole, Massachusetts.
- Friedmann, H.C. (1997): From Friedrich Wöhler's urine to Eduard Buchner's alcohol. En: New Beer in an Old Bottle. Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge (Cornish-Bowden, A. ed.) p. 67-122. Universitat de València.
- Fruton, J.S. (1972): Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology. John Wiley and Sons. New York.
- Fruton, J.S. (1992): A Skeptical Biochemist. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- García Font, J. (1976): Historia de la Alquimia en España. Editora Nacional. Madrid.
- Gutfreund, H. (1976): Wilhelm Friedrich Kühne; an appreciation. FEBS Lett. 62 suppl.: E1-E2.
- Kornberg, A. (1989): For the Love of Enzymes. The Odyssey of a Biochemist: Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Kühne, W. (1877): Experiences and remarks on enzymes and ferments. Reimpresión abreviada en inglés de "Erfahrungen und Bemerkungen über Enzyme und Fermente" Physiol. Inst. Univ. Heidelberg Unters. 1: 291-324. En Benchmark Papers in Biochemistry, Vol 1, Enzymes (Friedmann, H. C. ed.) p. 170-171. Hutchinson Ross. Woods Hole, Massachusetts, 1981.

- Lagnado, J. (1992): Was the First Biochemist a Woman? *The Biochemist* 14(5): 21-22.
- Lafín Entralgo, P. (1978): *Historia de la Medicina*. Salvat. Madrid.
- Mayr, E. (1982): *The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- O'Sullivan, C. y Tompson, F.W. (1890): Invertase: A contribution to the history of an enzyme or unorganised ferment. *Chem. Soc. J. (Trans.)* 57: 834-931. Reimpresión abreviada en *Benchmark Papers in Biochemistry*, Vol. 1, Enzymes (Friedmann, H.C. ed.) p. 208-216. Hutchinson Ross. Woods Hole, Massachusetts, 1981.
- Real Academia Española (2001): *Diccionario de la Lengua Española*. Vigésimo segunda edición. Madrid.
- Remer, T.G. (1965): Serendipity and the Three Princes. From the Peregrinaggio of 1557. (Remer, T.G. ed.) University of Oklahoma Press. Norman.
- Schlenk, F. (1997): Early research on fermentation. A history of missed opportunities. En: *New Beer in an Old Bottle. Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge* (Cornish-Bowden, A. ed.) p. 43-50. Universitat de València.
- Segel, I.H. (1993): *Enzyme Kinetics. Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley & Sons, New York.
- Sols, A. y Marco, R. (1970): Concentrations of Metabolites and Binding Sites. Implications in Metabolic Regulation. *Curr. Top. Cell. Regul.* 2: 227-273.