

Excmo. Sr. Director,
Excmos. Sres. Académicos,
Señores galardonados, Señoras y Señores.

Constituye para mi un gran honor, a la vez que una inexcusable obligación y deber como Académico el ocupar esta tribuna para pronunciar el discurso de inauguración del curso 1986 de esta Real Academia de Farmacia, a la que me honro con pertenecer y prestar mi humilde aportación tanto con la participación en sus sesiones de los jueves y demás reuniones científicas como en las publicaciones de sus Anales.

Dos han sido las principales motivaciones del tema de este discurso que con el título "**La ultracentrífuga de Svedberg. Un punto de partida de la Biología Molecular**" pretendo desarrollar con la sana y prioritaria intención: primero, de aburrir lo menos posible al bondadoso y heterogéneo público que nos honra con su presencia, y después, de estimular a los jóvenes investigadores, que hoy van a recibir su primer galardón, ante la difícil y, en muchos casos, desalentadora tarea que se les avecina pero que, en la inmensa mayoría de las veces, ha de verse compensada con resultados útiles, en mayor o menor alcance, al progreso y bienestar de nuestra comunidad.

La primera y fundamental de las razones, antes aludidas, la constituye el transcendental hecho de que la ultracentrífuga, introducida en la investigación por Svedberg, al igual que otras muchas técnicas de índole físico y físico-químico, contribuyó de forma decisiva a poder abordar, desde los conocimientos de la Química y de la Física el, hasta bien entrados en la primera mitad de nuestro siglo, inexpugnable y misterioso mundo de la materia viva; pudiéndose superar la gran barrera que deslindaba el tratamiento racional y estructural de aquellas ciencias del estudio simplemente macroscópico y morfológico de las que, entonces, de forma un tanto ambigua y genérica, se enmarcaban con la denominación de Ciencias Naturales. Con la ultracentrífuga y el transcendental hecho, que más adelante comentaremos, de lograr sedimentar las proteínas, componente esencial de los tejidos biológicos, y entonces catalogadas únicamente como substancias de una gran complejidad, pudo abrirse una era en la Química de las proteínas, que afrontaba su estudio bajo la consideración de compuestos definidos, formados por macromoléculas de peso molecular, composición y configuración estructural determinadas.

La segunda justificación, más de cariz un tanto testimonial y de gratitud, la constituye el hecho de que el profesor Svedberg, desde su Instituto de

Físico-Química de la Universidad de Uppsala, al igual que otros relevantes científicos del mundo entero, mantuvo siempre una entrañable y eficaz coordinación con la floreciente y entusiasta investigación española de mediados de siglo, a través del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y su inolvidable Secretario y promotor, Prof. Albareda. Su colaboración, tanto mediante conferencias y coloquios en España, como proporcionando plazas y temas de investigación en su Instituto para los becarios españoles, fue de tal relieve que el Consejo de Investigaciones no dudó en otorgarle su más alta consideración de Consejero de Honor en mayo de 1949.

Sin duda alguna, se trataba de una acertada política científica, que permitiría sentar las bases para un posterior desarrollo de nuestra investigación en los campos de las ciencias y humanidades, situándola a sus más altas cotas en los conciertos internacionales de los años 60 y 70. Relevancia científica que, por supuesto, repercutiría directamente en el, hoy añorado, resplandor económico e industrial de España de este y posterior período.

Estos hechos, junto al de haber sido uno de sus afortunados becarios y colaboradores científicos del curso 1951-52, que me permitió elaborar la Tesis Doctoral en Ciencias Químicas, así como la reciente celebración del centenario del nacimiento del profesor Svedberg (Agosto, 1884), me dan pie para haceros, como símbolo de reconocimiento y en memoria de su personalidad, una exposición de sus más destacadas aportaciones científicas con la ultracentrífuga, entrelazadas simultáneamente con los actos más relevantes de su vida dedicada, con plenitud vocacional, a la docencia y a la investigación.

INTRODUCCION

Theodor Svedberg, hijo único de Elias Svedberg y Augusta Alstermark, nació el 30 de agosto de 1884 en Flerang a unos 100 Km al norte Uppsala (Suecia). Su padre, un industrial ejecutivo, ejerce su profesión de ingeniero de minas y metalúrgico en diversas industrias siderúrgicas de Suecia y Noruega. La vida familiar de los primeros años escolares de Svedberg, transcurre en muy diferentes lugares de Escandinavia, captando rápidamente la distracción preferente de su padre Elias, hacia las plantas y minerales, pues fue siempre su incondicional compañero en sus excursiones botánicas. Afición que mantendría durante toda su vida, como la atestigua su famoso herbario personal en el que se conserva una gran colección de plantas, de más de 90 años, en perfectas condiciones.

Cursó los estudios de nivel medio en la escuela pública Karolinska Laverket de Orebró, recibiendo enseñanzas de eminentes profesores de Química y Física, que lograron despertar en él un interés tan entusiasta por estas materias que, a diario, después del horario de clases, le permitían estudiar y practicar en el laboratorio de la escuela. Llegando a construir, en aquel entonces (1900 a 1903), no solo alguna de las aplicaciones punteras de los circuitos eléctricos como un transmisor Marconi y un transformador Tesla, sino a organizar simultáneamente algunas demostraciones y exhibiciones públicas como la transmisión telegráfica entre los dos pabellones de la escuela.

Su atracción y admiración por los nuevos descubrimientos e invenciones de la Física y la Química motivó que, aun por encima de su permanente amor a la Naturaleza, en especial la Botánica, decidiera matricularse en la Facultad de Ciencias Químicas, y no de Biología, de la Universidad de Uppsala, en el año 1904, después de diplomarse en bachiller, mediante un brillante examen privado y anticipado, solicitado en la Escuela de Gothenburgo. Presumiblemente, ya intuía que, desde la Química y la Física, era la única posibilidad de acceder y penetrar en el complicado y fascinante conocimiento de la naturaleza viva y de esta forma satisfacer su constante apasionamiento por el mundo animal y vegetal.

El gran interés y sólida formación sobre química general, adquirida en los cursos de Bachiller y de forma especial en las prácticas de Química realizadas en su laboratorio particular, le permitieron avanzar en sus estudios universitarios de tal manera que en el tiempo excepcional de menos de dos años (septiembre-1905), alcanza su primera graduación universitaria (Fil. Kand.) con excelentes calificaciones. En este momento Svedberg se siente realmente preparado para iniciarse en la investigación, si bien ya, como alumno universitario, habría realizado algunos intentos y experiencias con la preparación de coloides metálicos, de las que surgiría su primera publicación el año 1905 a los 21 años de edad.

Los nuevos tratados de "*Theoretische Chemie*" de Nernst (1903); "*Zur Erkenntnis der Kolloide*" de Zsigmondy y el "*Anorganische Fermente*" de Bredig constituyen su lectura preferida, de la que emanarían sus inquietudes científicas y sus originales programas de investigación. Los cuales configurarían el inicio de una nueva era en la investigación química de la Universidad de Uppsala, ya que, entonces, esta había sido más bien de carácter descriptivo, preparativo y analítico.

Aquí, antes de pasar adelante, debemos resaltar que Svedberg en su formación como profesor universitario fue un auténtico autodidacta, pues si bien dialogaba y consultaba sobre temas científicos con sus colegas de Facultad, nunca tuvo un maestro directo que le guiara y orientara en su trayectoria docente e investigadora. Su propia mentalidad creadora le permitió: desarrollar nuevos métodos para la obtención de soluciones coloidales en líquidos orgánicos mediante la descarga eléctrica; introducir los métodos físicos para el estudio del tamaño, frecuencia de distribución, carga eléctrica y movimiento de las partículas coloidales; y aplicar un nuevo tratamiento matemático para describir e interpretar sus resultados.

Esta nueva personalidad docente y científica, una vez alcanzado el Grado de Doctor en Filosofía con la tesis doctoral sobre "Estudios para el conocimiento de las disoluciones coloidales", defendida en el año 1907, le facilitó, primero, alcanzar el nombramiento universitario de Docente en Química. Y más adelante, cuando sus investigaciones y publicaciones lograron relevancia internacional, a propuesta de sus colegas Stromholm y Widman, y con el fuerte apoyo de Avante Arrhenius, a pesar de los reparos del Ministerio de Universidades, Svedberg obtuvo un Real nombramiento de Profesor de Físico-Química de la Universidad de Uppsala en enero de 1913, siendo ésta la primera plaza de profesor de Físico-Química creada en Suecia.

La, entonces, naciente ciencia de los coloides llegó a fascinarle, pues estaba

convencido de que el estudio de los sistemas coloidales le ayudaría, en última instancia, a obtener algunas aclaraciones sobre los distintos procesos de la biología. Para él la diferenciación entre los sistemas cristalinos y coloidales era de una especial significación e importancia, en aquel momento en que la existencia de las moléculas era puesta en tela de juicio por algunos científicos de la talla de Wilhelm Ostwald.

Sus primeras investigaciones sobre coloides, llevadas a cabo en colaboración con Benedicks, recientemente nombrado docente en Físico-Química, y un seleccionado grupo de alumnos, versaría sobre la preparación y obtención de organosoles de más de treinta metales diferentes, con suficiente estabilidad para hacer un detallado estudio físico-químico de los mismos, tanto en lo referente a los factores químicos y físicos que afectan a su estabilidad, como todo lo concerniente al tamaño, movilidad, y frecuencia de distribución de sus partículas.

Las dificultades, no sólo económicas sino también de medios materiales, que tuvieron que afrontar no fueron pocas, ni triviales, y únicamente superables por el entusiasmo y la ilusión puestos en el empeño. Sirva, como ejemplo, la construcción y montaje manual de Ultramicroscopio de Zsigmondy-Siedentopf que, a su vez, como precisaba de una fuente de luz muy intensa, proporcionada mediante un arco eléctrico, y todavía la ciudad de Uppsala no había sido electrificada, la corriente eléctrica fue suministrada mediante una dínamo accionada por un motor de aire caliente, provisto de un gran volante que, no sin gran riesgo, debía ser impulsado manualmente. Pero con este ultramicroscopio pudieron estudiar los movimientos brownianos de las partículas de los soles metálicos y apreciar como están afectados por la naturaleza del solvente, la viscosidad, la temperatura y demás factores. Logrando Svedberg, además de interpretar estos resultados con las nuevas teorías de Einstein (1905, 1906) y de von Smoluchowski (1906), ser el primero en verificar algunas de estas teorías.

Su primer viaje al extranjero fue a Alemania, donde entre otros científicos visitó a Zsigmondy y Siedentopf, presentando gran atención, en el laboratorio de aquél, a sus experimentos con los coloides de azufre.

Todo este período de intenso trabajo quedó plasmado en muchas publicaciones sobre los diversos problemas que presentaba la química coloidal y una monografía concerniente de coloides inorgánicos. También sus propias contribuciones experimentales a la, entonces, latente discusión sobre si las moléculas existían, o no, como partículas, vieron la luz en la monografía "Die Existenz der Moleküle" del año 1912.

Las investigaciones de Svedberg en la década posterior a su nombramiento como profesor de Físico-Química, estuvieron plenamente consagradas a un estudio físico-químico más profundo de los sistemas coloidales, y en especial al conocimiento de la distribución de partículas por su tamaño. Sus primeros trabajos realizados con la absorción de la luz, difusión y el movimiento browniano en las soluciones coloidales marcaban como poco probable la existencia de discontinuidad de estas propiedades en la transición de la materia desde el estado cristalino al coloidal. Con este motivo, él y todo su equipo de colaboradores iniciaron una larga serie de investigaciones sobre estos problemas.

Era indudable que mediante el ultramicroscopio se podía lograr la curva de distribución de partículas, si bien la tarea sería extraordinariamente laboriosa. Entonces surgen dos posibles procedimientos como alternativa: para los coloides y suspensiones groseras la velocidad de sedimentación, y para los coloides más finos, la medida de los desplazamientos debidos al movimiento browniano. Ambas técnicas, llevadas a cabo con un número suficientemente grande de partículas, podían proporcionar unos buenos resultados sobre la distribución por tamaño. No obstante, también se ensayaron otros métodos más rápidos, como por ejemplo: la coagulación fraccionada, el registro gráfico de la sedimentación por pesada automática, para sistemas groseros y suspensiones; y finalmente el equilibrio de sedimentación en el campo gravitatorio.

Todas estas actividades también dieron lugar a importantes hallazgos que fueron publicados en varias tesis doctorales, entre las cuales cabe destacar el clásico trabajo sobre el movimiento browniano (A. Westgren, 1913) con el que se pudo obtener un excelente valor para el número de Avogadro ($6,05 \pm 0,03 \times 10^{23}$), el de la absorción de la luz y el tamaño de las partículas (N. Pihlblad, 1918) y el de síntesis eléctrica de coloides (G. Borjenson, 1921).

A partir de este momento Svedberg empieza a ver con claridad que, para lograr un método adecuado que permita el estudio de la distribución por tamaño de las partículas de un sistema coloidal, debería medirse la variación de la concentración con la altura, dentro de un dispositivo de sedimentación, mediante observaciones ópticas. De aquí que realizaran muchos trabajos sobre las propiedades ópticas de los sistemas coloidales.

Al poner en práctica estos proyectos basados en las medidas de sedimentación de partículas en el campo gravitatorio, que permitieron obtener las curvas de frecuencia del tamaño de las partículas, bien por pesada automática del conjunto de partículas depositadas en función del tiempo o bien a partir de la medida de la absorción de la luz a las diversas alturas durante la sedimentación, se percataron de que en ambos procedimientos el campo gravitatorio no era lo suficientemente intenso para lograr sedimentar partículas de soles metálicos de diámetro inferior a 200 nm. Pero, no obstante, Svedberg y sus discípulos no podían renunciar a la sedimentación de las partículas más pequeñas y primeramente formadas, ya que estaban especialmente interesados en estudiar los procesos de formación y crecimiento de las partículas coloidales.

Y fue entonces cuando, en el Simposio de Química Física de la American Chemical Society (Enero-1923), Svedberg y H. Rinde, al comunicar estos resultados anunciarían, por primera vez, su propósito de estudiar la sedimentación de los coloides más finos mediante un campo de fuerzas más intenso como el centrífugo.

GENESIS DE LA ULTRACENTRIFUGA

A partir de estos momentos Svedberg toma conciencia de la necesidad de desarrollar métodos centrífugos, para poder continuar con sus investigaciones en las dispersiones coloidales. Pero corrían los tiempos difíciles y pesimistas de postguerra de la 1ª conflagración mundial y su tratado de Versalles

de 1920, y en Suecia era prácticamente imposible conseguir subvenciones económicas para la investigación. Afortunada y oportunamente, Svedberg es invitado por el Prof. J. H. Mathews de la Universidad de Wisconsin (U.S.A.) a dar unas conferencias y organizar la investigación sobre la química coloidal en aquella Universidad. Aceptó esta invitación con gran entusiasmo, y de inmediato empezó en Madison a planificar investigaciones tales como: la sedimentación en campos centrifugos, electroforesis, difusión, síntesis eléctrica de coloides, y el estudio del proceso fotográfico.

En la Universidad de Madison se rodeo de magníficos e ilusionados colaboradores como: E. O. Kraemer, con quien ensayó las síntesis de soluciones coloidales por medio del arco eléctrico de alta frecuencia; J. B. Nichols que participó en la construcción de la primera centrifuga óptica, en la que la sedimentación de las partículas coloidales podía seguirse fotográficamente; y J. Williams con el que, más tarde, junto con un grupo de estudiantes, elaboraron importantes aportaciones a la teoría sobre la sedimentación en la ultracentrifuga. Sin embargo, con esta nueva centrifuga, no pudo realizarse el cálculo simple de la velocidad de sedimentación, debido a que las partículas descendían por sedimentación y simultáneamente por convección a lo largo de las paredes de la célula. No obstante, Svedberg, a su regreso a Uppsala, cruzando el Atlántico en septiembre de 1923, diseñó un nuevo proyecto de centrifuga.

La estancia en los Estados Unidos le fue extraordinariamente útil, porque allí pudo convivir y disfrutar, durante ocho meses, de un ambiente emprendedor y ansioso de acometer todo tipo de proyectos de investigación en los distintos campos de la ciencia.

Norteamérica había comprendido que la clave del aprovechamiento de su enorme potencial de riqueza natural, para lograr su colosal desarrollo económico y social, residía y debía ir refrendado por una sólida investigación científica pura y aplicada. De aquí que Svedberg regresara a Uppsala plétórico de ilusión y de nuevas ideas, gracias a las cuales pudo afrontar el desencanto y escasez de recursos, todavía reinantes en los países europeos.

Así, con la colaboración de Rinde, pudo poner en marcha su nuevo proyecto de centrifuga en la que la célula de la solución a sedimentar debía tener forma de sector circular y simultáneamente, desarrollar la importante teoría que les permitió deducir la famosa ley del cuadrado de dilución radial. De esta forma llegarían a alcanzar una sedimentación sin convección. Pero, al mismo tiempo, estaban convencidos de que si pretendían llevar a cabo la sedimentación de soluciones coloidales, tan finas que sus partículas no podían ser observadas con el ultramicroscopio, era preciso que la nueva centrifuga proporcionara un campo centrifugo más fuerte que la centrifuga óptica construída en Madison. Con tal fin, diseñaron el nuevo prototipo, basándose en el principio del equilibrio utilizado en los descremadores de la leche, usando su sistema básico de impulsión y sustituyendo el dispositivo separador por un rotor especialmente construido para la centrifuga. La parte superior del separador fue reformada de forma que el rotor girara dentro de un recinto completamente cerrado en una atmósfera de hidrógeno a presión reducida y controlada, lo cual permitía asegurar una sedimentación libre de convección.

En julio de 1924, los ensayos de esta nueva centrifuga habían sazonado lo

suficiente como para estimar adecuada su publicación en el Journal of the American Chemical Society, y allí, por primera vez, aparecía el nombre de la ultracentrífuga, pues su título era: *“La Ultracentrífuga. Un nuevo instrumento para la determinación del tamaño y distribución de las partículas en los coloides amicroscópicos”*. Al final de la publicación los autores justificaban así la nueva denominación “La nueva centrífuga que hemos construido permite la determinación de partículas que no pueden ser observadas con el ultramicroscopio. Por analogía con la denominación del ultramicroscopio y el aparato de ultrafiltración nosotros proponemos para este nuevo instrumento el nombre de ultracentrífuga”.

Esta primera ultracentrífuga estaba accionada por un motor eléctrico, que impulsaba un rotor de acero de unos 4,5 cm de diámetro, con una velocidad de 10.000 rpm, equivalente a un campo centrífugo de 5.000 veces el de la gravedad (5.000 g). Con posterioridad en 1929, el mecanismo de impulsión se cambió por el sistema de motor directo como el de “la centrífuga óptica”, lográndose una máquina relativamente pequeña y económica, que después sería conocida como la “ultracentrífuga de equilibrio” de Svedberg.

LA ULTRACENTRIFUGA Y LAS PROTEINAS

Después del éxito alcanzado con el campo centrífugo de 5.000 g de la nueva ultracentrífuga al conseguir medir la velocidad de sedimentación de las partículas del oro coloidal de hasta unos 5 nm, en la mente de Svedberg persistía y dominaba su denodado amor e interés por los problemas del mundo biológico. Y pensó que posiblemente con su nuevo método —extrapolando sus estudios sobre los coloides inorgánicos de más finas partículas— había llegado el momento de abordar a las piezas fundamentales constituyentes de la materia viva, esto es, las proteínas.

Los conocimientos que se tenían sobre la química de las proteínas, eran muy parcos y deficientes. Por los trabajos de Emil Fischer se sabía que estaban formados por aminoácidos unidos por los enlaces peptídicos. En disolución formaban soluciones coloidales con partículas de peso alto, quizás superiores a 10.000. En los años veinte y anteriores se aislaron varias proteínas mediante métodos de salificación y precipitación fraccionada. En algunos casos se consiguió conocer su composición aproximada en aminoácidos, si bien era corriente suponer que su composición dependía, como en el caso de otros soles coloidales, del procedimiento de preparación. En definitiva, entonces las proteínas se caracterizaban fundamentalmente por su origen, solubilidad, rotación óptica y composición elemental, y de forma general se las consideraba como sustancias de gran complejidad.

Los intentos realizados para alcanzar una idea del tamaño de las partículas de las soluciones de proteínas no fueron afortunados. Los experimentos que ofrecían alguna garantía fueron los basados en las medidas de la presión osmótica, realizadas por S.P.L. Sørensen (1917), y daban como conclusión que la albúmina de huevo tenía un peso medio de partículas de 34.000. Pero, treinta y dos años después, Güntelberg y Lindertrom-Lang (1949), demostraron que un peso molecular de alrededor de 45.000 se acomodaba mejor a los viejos datos de Sørensen que el indicado por él mismo. Bien pu-

diera ser que, en aquel entonces, él pensaba que su primera cifra de 34.000, dada tímidamente, ya la consideraba como un peso de partículas demasiado alto para la proteína, por lo que le era difícil dar crédito a valores superiores, como los que emanaban de un gran número de sus experimentos.

De acuerdo con la opinión generalizada de los químicos, Svedberg estaba prácticamente convencido de que las proteínas eran sistemas polidispersos, coloides liofílicos, y lo que él pretendía era determinar la distribución de frecuencias del tamaño de partículas en una disolución de proteínas. "¿Por qué no intentarlo con la albúmina de huevo?", se preguntó con Nichols que se trasladó expresamente desde la Universidad de Madison para investigar este apasionante problema. Los primeros experimentos fueron desalentadores, pues no pudieron observar sedimentación alguna.

Posteriormente en colaboración con Robin Fåhræus, profesor de Patología de Uppsala, intentó ensayar con la caseína natural de la leche, logrando su sedimentación pero poco definida porque este polidisperso mostraba una amplia distribución de frecuencias de partículas de tamaños comprendidos entre 10 y 70 nm. Entonces Fåhræus propuso ensayar con la hemoglobina, a lo que Svedberg arguía que no sería fácil, puesto que según la bibliografía, basándose en su contenido en hierro, su peso molecular debería situarse próximo a 17.000, es decir, prácticamente la mitad que el dado por Sörensen para la ovoalbúmina, ya investigada sin éxito. No obstante, el experimento con la hemoglobina se inició el 16 de octubre de 1924 y según relata el mismo Svedberg ese día a medianoche es despertado por una llamada telefónica de Fåhræus, que observaba la experiencia, y con esta feliz noticia: "The (su nombre familiar), veo un amanecer". A los pocos minutos, ya en el Instituto, Svedberg comprobaba que una acusada claridad en la parte superior de la célula demostraba que la hemoglobina estaba sedimentándose. Unas semanas después a partir de los experimentos de equilibrio de sedimentación dedujeron que su peso molecular era del orden de 4×17.000 , es decir suficientemente grande como para ser sedimentada por una fuerza centrífuga de 5.000 veces la de gravedad y a 10.000 rpm.

Pero es que, además, la otra circunstancia de especial relevancia, que acompaña a este primer éxito de Svedberg con la ultracentrífuga, fue que la sedimentación de la hemoglobina era tan nítida que manifestaba la gran uniformidad de las partículas de la solución de hemoglobina. Se trataba, pues, de un coloide monodisperso producido por la naturaleza, en fuerte contraste con el oro coloidal preparado por el hombre. Indudablemente, por primera vez, este experimento evidenciaba la existencia de las moléculas proteicas. En la primera publicación de estos hallazgos, en el *Journal American Chemical Society* (1926), puntualizan "La falta de un método eficaz para la determinación de los pesos moleculares de substancias que poseen una estructura complicada ha sido un serio obstáculo en el avance de nuestros conocimientos sobre la Química de las proteínas. En el presente trabajo, con esta finalidad, se propone un método cuya utilidad será ilustrada con unas cuantas medidas preliminares de la hemoglobina" y más adelante señalaban "Estas medidas deberán ser consideradas más bien ilustrativas de un posible método, que como definitivas sobre el peso molecular de la hemoglobina. Esperamos poder comunicarles, más adelante, una técnica más depurada para tales determinaciones".

Los pesos moleculares de la albúmina de huevo y de la hemoglobina demostraban claramente que, al menos algunas proteínas, tenían pesos moleculares comprendidos entre 30.000 y 70.000. Sin embargo, las medidas del equilibrio de sedimentación no suministraron suficiente información sobre la homogeneidad de las proteínas, y por supuesto, el método de la presión osmótica al ofrecer un valor promedio para el peso molecular de la proteína, nada aclaraba sobre la uniformidad del tamaño de las moléculas.

La total entrega y dedicación de Svedberg a estas investigaciones, para él apasionantes, del mundo desconocido de las proteínas, le hizo delegar en alnos de sus más destacados colaboradores, las nuevas líneas de trabajos físico-químicos que había planificado a su regreso de Estados Unidos. Así, el desarrollo de la nueva técnica de electroforosis correría a cargo de Arne Tiselius, por cuyo desarrollo y gran utilidad bioquímica sería galardonado con el Premio Nobel de 1948; el estudio sobre la difusión fue llevado a cabo por Ole Lamm, que le permitió elaborar el "método de la escala", de gran valor para la observación de los experimentos de difusión y de sedimentación, y a Y. Björnstahl le fueron encomendados los trabajos sobre la birrefringencia en los coloides.

Para hacer factible el análisis de la homogeneidad o polidispersidad de una proteína disuelta, pensó Svedberg, se precisaría disponer de un método de velocidad de sedimentación, en el que la linde de separación del soluto y disolvente, en una solución diluida de una substancia monodispersa, debiera estar determinada únicamente por su coeficiente de difusión. Y así un mayor ensachamiento de la linde, que el correspondiente a la difusión de la substancia, o la aparición de lindes separadas, marcarían la evidencia de una falta de homogeneidad en el sistema.

Del peso molecular alcanzado para la ovoalbúmina y la hemoglobina se pudo deducir que, para lograr una eficiente separación, era necesaria la acción de un campo centrífugo más intenso, del orden de 70.000 a 100.000 g, lo que suponía un incremento de la fuerza centrífuga disponible de hasta casi veinte veces. Pero evidentemente esto no podía lograrse simplemente con un aumento de la velocidad de la centrífuga, sino que antes de que la primera centrífuga de alta velocidad pudiera construirse deberían discutirse y resolverse numerosos problemas no sólo de orden técnico, sino también de naturaleza económica, para poder financiar su proyecto de construcción.

A pesar de la difícil situación financiera de aquellos años, Svedberg por indicación de Fåhræus alcanzó de la nueva fundación "*Therese and Jhon Anderssons Mine*" de investigación médica, una substancial subvención que complementada con otra de la Sección de Química de la Fundación Nobel, le permitió poner en marcha su verdadero proyecto de investigación sobre el estudio del tamaño y estructura de las moléculas proteicas, a partir de la acción de altos campos centrífugos.

La importancia y la novedad de este procedimiento de emprender y comprometerse a estas investigaciones con una subvención especial, dio lugar a la siguiente anécdota, que merece la pena comentar: al encontrarse Svedberg con uno de sus colegas, éste le pregunta, no sin cierta preocupación. "¿cómo te atreves a aceptar una cantidad tan grande (unas 40.000 CS) para un proyecto tan arriesgado?. ¿Imagínate que fracasas?"; su única y escaeta contestación fue esta: "Yo no voy a fracasar".

Con la colaboración de F. Ljungström, Director de la Compañía Ljungström de turbinas de vapor de Estocolmo, que propuso el uso de turbinas de aceite para simplificar el problema de lubricación, se construyó en sus talleres la primera ultracéntrica de turbinas de aceite, cuyos primeros ensayos, realizados en Uppsala el 10 de enero de 1926, fueron un auténtico fracaso, pues en lugar de las 40-42.000 rpm proyectadas, solamente se alcanzaron 19.000 rpm.

Pero en lugar de cundir el desánimo, enseguida se percataron de la serie de dificultades técnicas que deberfan ser resueltas. Tales como: un nuevo diseño de turbinas y cojinetes, modificación del sistema de propulsión de aceite, equilibrar el peso del rotor para evitar las vibraciones, y giro del rotor en atmósfera reducida de hidrógeno para salvar la fricciones de gases y corrientes de convección por calentamiento.

Todas estas superaciones e innovaciones fructificarfan en un gradual aumento de la velocidad de rotación, alcanzando, al cabo de cinco meses de incansantes intentos, las 40.000 rpm del proyecto inicial. No obstante, es interesante resaltar que, ya en el mes de marzo de ese mismo año, Svedberg exponía ante los miembros de la Real Academia de Ciencias de Uppsala, la sedimentación de la hemoglobina con esta nueva ultracéntrica.

En los años sucesivos, amén de resolver, sobre la marcha, otros problemas técnicos de menor importancia, la nueva ultracéntrica pudo ser empleada a diario en trabajos de rutina y Svedberg puso en práctica su principal y obsesivo tema de investigación: el estudio de la uniformidad de las moléculas proteicas a partir del análisis ultracéntrico de los diagramas de sedimentación obtenido por el método de la velocidad de sedimentación.

Esta línea de trabajo fue abordada en un amplio frente de proteínas, no sólo humanas y animales sino también vegetales, siendo digno de resaltar que en su diario de laboratorio, al reseñar sus repetidas experiencias con la carboxihemoglobina, anotaba literalmente como conclusión fundamental "No ha podido ser apreciado ni el más ligero indicio de la presencia de moléculas de diferentes tamaños". No obstante, según advierte K.O. Pedersen, su posterior y más directo colaborador, debe tenerse presente que era poco probable que en aquellas condiciones experimentales, pudieran ser apreciadas diferencias de bajos tantos por cientos en las masas moleculares.

En pleno trabajo intensivo, de día y noche, enfrascado en estas cuestiones, nunca desprovistos de muchas dificultades experimentales, propicias al desaliento, Svedberg recibe el 11 de noviembre de 1926 la buena nueva de la Academia Sueca de Ciencias concediéndole el premio Nobel de Química por "sus trabajos sobre sistemas dispersos". El premio de Física del mismo año le correspondió a Jean Perrin por un trabajo similar en el que hace referencia a su descubrimiento del equilibrio de sedimentación. Y, al mismo tiempo, R. Zsigmondy recibía su pospuesto premio Nobel de Química del año 1925, por "la elucidación sobre la naturaleza heterogénea de las soluciones coloidales y los métodos propuestos para su estudio". Se trataba, pues, de un reconocimiento científico mundial a tres grandes maestros en el campo de la incipiente Química Coloidal.

El premio Nobel de Svedberg, en el que, sin lugar a duda, se galardonaba no sólo sus destacadas contribuciones al estudio de las dispersiones coloidales sino también sus relevantes y contemporáneos resultados en este mismo cam-

po, logrados con su ultracentrífuga, constituyó un formidable estímulo y garantía para lograr nuevas aportaciones económicas estatales y privadas, que le permitirían ampliar y dar un nuevo ritmo a sus proyectos de investigación. En efecto, una vez construido su anhelado nuevo edificio para el Instituto de Físico-Química, son muchas las peticiones de científicos extranjeros que desean trabajar con la ultracentrífuga y sobre diversos tipos de proteínas, siendo las primeras en estudiarse las cromoproteínas ficoeritrina, ficocianina y hemocianina y las proteínas séricas albúmina y globulinas.

Según relata el propio Svedberg, uno de los resultados alcanzados más sensacionales fue el descubrimiento de las, por él denominadas, moléculas gigantes de la hemocianina. Pues de conformidad con su contenido en cobre, la hemocianina extraída de la sangre de caracoles, "*Helix pomatia*"; procedentes de los viñedos de Alemania, debería estar formada por partículas con un peso mínimo situado entre 15—17.000. Pero la gran sorpresa surgió cuando, al ausentarse del laboratorio una vez iniciada la primera centrifugación de esta proteína, a los pocos minutos su colaborador rumano Dr. Chirnoaga le comunica telefónicamente: "algo extraño está sucediendo, venga y vea". Y en efecto, personalmente pudo comprobar, con gran sorpresa, que la hemocianina ya había sedimentado un corto recorrido mostrando una linde muy pronunciada. En una simple estimación se calculaba que el tamaño de sus partículas serían del orden de algunos millones y que todas las moléculas deberían tener las mismas dimensiones. Esta era la primera vez que se observaban moléculas gigantes de tamaño uniforme. Después también podría demostrarse que la hemocianina presentaba un peso molecular constante disuelta en tampón en un amplio intervalo de pH.

También fue sorprendente e inesperado, el hecho de que la mayoría de las proteínas estudiadas con posterioridad se mostraron como sistemas monodispersos, cuyas partículas eran del mismo tamaño dentro de los errores experimentales del método. En muy pocos casos aparecían sistemas cuasi-dispersos que, por un simple cambio de pH, tomaban la forma de soluciones monodispersas de proteínas. Realmente en una sola ocasión, además de la caseína, se encontró una proteína polidispersa, ésta fue la gelatina que, por aquel entonces, era utilizada como proteína "modelo o patrón".

Después de estos primeros estudios, de varios años, sobre proteínas llegó a la conclusión de la existencia de ciertas reglas concernientes a sus respectivos pesos moleculares. Así en la carta al editor de Nature, publicada el 8 de junio de 1929, y titulada "Masa y tamaño de las moléculas proteicas", escribe: "Nuestro trabajo ha sido recompensado con el descubrimiento de una inesperada y sorprendentemente íntima conexión entre las diferentes proteínas, según la cual una misma proteína puede, según el pH a que sea puesta, mostrar la masa molecular, tamaño y forma de otra proteína; así como por la existencia de una relación concerniente al tamaño y estructura de las moléculas proteicas. Se ha encontrado que, desde el punto de vista de sus masas moleculares, todas las proteínas naturales estables, estudiadas hasta ahora, pueden dividirse en dos grandes grupos: las hemocianinas con pesos moleculares del orden de millones y todas las restantes proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 35.000 y 210.000. A su vez este último grupo podría estar integrado por cuatro subgrupos, en los que las masas mole-

culares características de los tres subgrupos más altos, en primera aproximación, se derivan de la masa molecular del primero multiplicada por dos, tres y seis". Y más adelante continúa: "Cuando se pretende dar una explicación a estas inesperadas regularidades, será preciso tomar conciencia del hecho, ya revelado por muchas experiencias bioquímicas, según el cual la naturaleza, para producir substancias orgánicas dentro de la célula viva, parece trabajar siguiendo un número muy limitado de directrices principales. La gran variedad se muestra sólo en la especificación de detalles. Así, parece como si las numerosas proteínas fuesen construidas de conformidad con un plan general que les proporciona únicamente un limitado número de masas y tamaños moleculares cuando se presentan en solución acuosa. Siendo la variación en los constituyentes de las distintas proteínas (diferentes porcentajes de los distintos aminoácidos, etc.) la responsable de los cambios de sus propiedades químicas y electroquímicas adecuadas para que las células puedan hacer uso de ellos en sus diversas finalidades".

Estos primeros revolucionarios resultados publicados por Svedberg y su escuela, fueron acogidos por los científicos del mundo entero, dedicados a la Química Biológica con gran expectación y sorpresa y, en algunos casos, no desprovista de ciertas reservas, ya que comulgaban con la idea tradicional de que "las proteínas eran substancias de gran complejidad" y no podían admitir fácilmente que las moléculas de proteínas tuvieron un tamaño tan concreto como el definido por su peso molecular. Pero es que cuando Svedberg lanzó su hipótesis acerca de "un sistema periódico para las proteínas" según la cual existe un número limitado de pesos moleculares de las proteínas, pudiendo expresarse los pesos moleculares de los grupos más altos, como simples múltiplos de los de grupos más bajos, el escepticismo alcanzó cotas realmente prominentes.

Así K.O. Pedersen, químico danés, graduado en Copenhague, que fascinado por las investigaciones de Svedberg y sus libros, decidió en enero de 1930 trasladarse por dos años a la Universidad de Uppsala, donde se quedaría para siempre, pues sería no sólo su colaborador más directo, sino también el continuador de sus trabajos, después de su jubilación y en la actualidad, relata algunas anécdotas de este escepticismo, a cargo de algunas personalidades científicas de aquella época. Al consultar al Profesor Brönsted sobre su intención de ir a trabajar con Svedberg, la contestación reflejaba una marcada desconfianza en sus investigaciones, pues reconocía que era un gran físico-químico experimental y una persona encantadora, pero no daba mayor importancia al descubrimiento de la ultracentrífuga, recomendándole que eligiera mejor entre Freundlich en Alemania, Rideal en Cambridge o Hinselwood en Oxford.

Más adelante, antes de abandonar Copenhague para dirigirse a Uppsala, Pedersen visitó en el Carlsberg Laboratory al profesor S.P.L. Sörensen, uno de los padres de la química de las proteínas. También le manifestó sus grandes dudas sobre la hipótesis de la multiplicidad de Svedberg, y no confiaba que pudiera tener una aplicación de tipo general. Pues no podía pasar a creer que las proteínas fuesen substancias tan definidas como para poderles asignar un determinado tamaño y una masa. Debe tenerse presente que, entonces, Sörensen estaba estudiando la solubilidad de las globulinas séricas y daba por

sentado que la mayoría de las proteínas formaban sistemas disociables y reversibles con un peso molecular no uniforme.

La realidad fue que no pocos químicos dudaban de los hallazgos de Svedberg y algunos de ellos se preguntaban si, en cierto modo, no podría ser algún tipo de artefacto lo que Svedberg y sus colaboradores estaban midiendo.

Al inicio de la década de los años treinta, Svedberg, con la garantía y confianza plena que le habían dado sus propias medidas experimentales, lejos de sucumbir ante los escépticos y sus críticas, y con la seguridad de poder refutarlas, con nuevas y más tajantes investigaciones, planifica un nuevo plan de trabajo que implicaría a proteínas de las más diversas procedencias: proteínas de semillas, cromoproteínas, proteínas respiratorias, etc., etc. Pero, como condición previa, para poder abordar esta tarea era preciso disponer de más ultracentrífugas que, después, conseguiría instalar ya en el nuevo edificio de su Instituto. Entre ellas, se montaron cuatro de velocidad media para medidas de equilibrio que dieron resultados altamente satisfactorios.

El análisis por ultracentrifugación de la uniformidad de las moléculas proteicas, requería indefectiblemente elevar la eficacia de la ultracentrífuga de alta velocidad, incrementando, aun más, su fuerza centrífuga. Con este propósito, y ayudado por el ingeniero Gustav Boestad, Profesor del Instituto Tecnológico de Estocolmo, construyeron una segunda y completamente nueva ultracentrífuga de turbina de aceite. Los primeros ensayos estuvieron acompañados de diversas dificultades técnicas para lograr construir un rotor que pudiera alcanzar la velocidad deseada de 55.00 rpm. Los ensayos con este Rotor I, hasta conseguir una centrifugación libre de efectos perturbadores, duraron casi tres meses, pero con él solamente pudieron llevar a cabo algunos experimentos de rutina en campos centrífugos superiores a 200.000 g, ya que cuando la centrífuga estaba a punto para el trabajo ordinario, el Rotor I explotaba a 50.00 rpm, después de haber sido utilizado durante 120 días a diversas velocidades y, en algunos casos, superiores de hasta 56.000 rpm.

En aquellos días Svedberg recibió una importante ayuda económica de la fundación Rockefeller, con la que pudo hacer frente a la ingente suma de dificultades, que preveía para conseguir su propósito de construir una ultracentrífuga de un gran poder de resolución para el estudio de la polidispersidad de las moléculas y asegurar campos centrífugos de, a ser posible, 10^6 g.

En el período comprendido entre los años 1932 y 1937, posiblemente el más duro y agitado de la vida de Svedberg, se construyeron y ensayaron una veintena de rotores de los cuales la mitad explotaron y otros sufrirían deformaciones tan importantes que inutilizaban su posterior empleo. Hasta que, finalmente, a comienzos del año 1939 con el Rotor XXI se alcanzó el diseño perfecto, pues, por primera vez, se eliminó completamente la gradual deformación de los huecos de las células. De este modelo se fabricaron lo menos 10 unidades, algunas en la LKB, que fueron exportadas y en ningún caso explotaron.

En la actualidad, todavía están en uso, en Uppsala, dos ultracentrífugas de turbinas de aceite con los rotores XXI y XXIV del mismo diseño final. Lo cual, según manifiestan Pedersen y S. Claesson (éste su sucesor en la Dirección del Instituto, en su jubilación), "no es frecuente en un científico, que inventa un nuevo instrumento, alcanzar un grado de perfección tal, que aquél

no tenga que ser modificado durante más de un tercio de siglo de experimentación". Las ultracentrífugas de proyectos posteriores, impulsadas por motor, indudablemente pueden utilizarse en un intervalo de temperatura más amplio y, por supuesto, son de más fácil manejo, pero la ultracentrífuga de Svedberg no ha sido nunca superada en precisión y exactitud.

LA PRUEBA DE LAS MEZCLAS, EL PUNTO ISOELECTRICO Y LA DIFRACCION DE RAYOS-X DE LAS PROTEINAS

Los difíciles y penosos ensayos, durante varios años, de los nuevos rotores, dirigidos personalmente por Svedberg, supusieron para él una etapa de fuerte tensión y esfuerzo. Pues con frecuencia solía desahogarse con sus colaboradores diciendo que "cada nueva prueba y explosión del rotor le quitaba un año de vida". No obstante, si bien la realidad era otra ya que, según sus colaboradores, conservaba un plétórico y saludable aspecto juvenil, algunas veces después de fracasar con varios rotores, estuvo tentado de no seguir adelante con su empeño, pues no veía la posibilidad de lograr la construcción del rotor deseado. Y se preguntaba si realmente merecía la pena proseguir en el perfeccionamiento de la ultracentrífuga o sería preferible concentrarse en otros temas. Pero su denodado interés por las proteínas y su gran anhelo de confirmar o desaprobar su hipótesis sobre el sistema de múltiplos para los pesos moleculares, le impulsaron a no abandonar su proyecto. Siendo tal su apasionamiento por el tema y la alegría que le proporcionaron los resultados alcanzados, que después de su jubilación recordaría la década de los años treinta como el período más feliz de su vida científica. No en balde, J. W. Williams uno de sus primeros colaboradores de la Universidad de Wisconsin, y destacado especialista en ultracentrifugación, con motivo de la conmemoración del Cincuentenario de la Ultracentrifugación, celebrado en Bethesda (Marylan), en febrero de 1975, califica a esta etapa como el "período de oro" de la trayectoria científica de Svedberg proyectada íntegramente sobre la ultracentrífuga y su aplicación al estudio de las proteínas.

En efecto, paralelamente al perfeccionamiento técnico de la ultracentrífuga, realizó un estudio extensivo del mayor número posible de especies animales, procedentes de muy diversas partes del mundo. En estas investigaciones, con aproximadamente un centenar de diferentes proteínas respiratorias, encontró que sus coeficientes de sedimentación pertenecían a un número limitado de grupos, y al objeto de comprobar si estos coeficientes, dentro de cada grupo, eran idénticos o diferían, ideó la que denominó "prueba de las mezclas". En ella las proteínas se mezclaban en aproximadamente iguales proporciones y se centrifugaba. Si en el diagrama de la experiencia solamente aparecía una linde, no había lugar a duda que ambas proteínas tenían el mismo coeficiente de sedimentación, con un límite de error de $\pm 2\%$ para proteínas con pesos moleculares superiores a 300.000. Pudo encontrar que, por regla general, dentro de un bien definido grupo de animales todas las especies tenían el mismo valor para el coeficiente de sedimentación. Y ante este hecho Svedberg comenta "Por el contrario el número observado de diferentes constantes de sedimentación es tan reducido, que necesariamente la misma constante deberá presentarse en más de una clase de animales y en

proteínas respiratorias que contienen diferentes grupos activos. Lo cual parece indicar que solamente unas pocas masa moleculares son estables y debería depender de la composición de la molécula, respecto a varios aminoácidos, el que tenga lugar una u otra posibilidad. Por consiguiente, la constancia del peso molecular, dentro de un cierto grupo animal, deberá representar una medida de la similitud de ciertos procesos químicos conducentes a la formulación de las proteínas respiratorias”.

Si bien la ultracentrifugación había demostrado que las proteínas respiratorias procedentes de grandes grupos de determinadas especies de animales, tenían el mismo peso molecular, el problema era comprobar si químicamente eran iguales o diferentes. Para ello se llevaron a cabo estudios electroforéticos de varias de estas proteínas y se encontró que el punto isoeléctrico y las curvas movilidad-pH variaban de forma distinta de una especie a otra e incluso entre especies muy relacionadas entre sí. Y como consecuencia Svedberg afirma: “La constante de sedimentación y el peso molecular pueden utilizarse como propiedades características de cada grupo y el punto isoeléctrico es específico da cada especie”.

El extenso estudio de la influencia del pH en la estabilidad de hemocianinas procedentes de diferentes clases de animales mostró que, mediante cambios de pH, aquéllas podían disociarse o asociarse para formar moléculas de masas iguales a las encontradas para las hemocianinas de otros animales. Sobre este hecho Svedberg en un trabajo del año 1936, comentaba “A ciertos valores críticos de pH se produce una profunda variación en el número y porcentaje de los componentes básicos. El cambio de pH necesario para que tenga lugar la variación no es superior a algunas décimas de unidad de pH, por consiguiente las fuerzas que mantienen unidas las partes disociables deben ser muy débiles. Lo más sorprendente del hecho es que un mismo cambio de pH, en sentido contrario, realmente origina una asociación de las partes disociadas para dar la misma molécula antes disociada. Por esta razón nosotros creemos que está plenamente justificado el usar el término molécula para las partículas de hemocianina a pesar de su gigantesco tamaño. Su masa no puede estar cambiando constantemente, como sucede en las partículas de los coloides ordinarios, y además presenta un intervalo definido de estabilidad con respecto al medio donde se encuentra. Por tanto lo más probable es que las partículas de hemocianina tengan una estructura definida”.

De gran relevancia, que merece la pena destacar en apoyo de las ideas y resultados logrados por Svedberg, en el segundo lustro de los años treinta, es el hecho de que, al comienzo de la siguiente década, en medio del escepticismo bastante generalizado, al que anteriormente se hizo mención, los estudios de las proteínas con otros métodos, también de naturaleza física, empiezan a corroborar que se trata de sustancias químicas con moléculas uniformes y bien definidas.

Entre estos estaban los estudios de J. H. Northrop sobre la pepsina cristalizada, y las investigaciones con rayos-X de J. D. Bernal y D. Crowfoot de esta misma proteína, cristalizada según el método de Northrop por J. Philpot en Uppsala, y posteriormente analizada en el laboratorio de Bernal. En una carta al editor de Nature en 1933, titulada “La fotografía de Rayos-X

de la pepsina cristalizada”, Bernal y Crowfoot dan cuenta de estos trabajos y comentan “no solo estas medidas confirman estos grandes pesos moleculares, sino que también dan una gran información sobre la naturaleza de las moléculas proteicas y seguramente se completará cuando el análisis sea más profundo..... A partir de la intensidad de los “spots” (rayos difractados) más distantes se puede deducir que la ordenación de los átomos dentro de una molécula proteica pertenece también a un tipo perfectamente definido, aunque sin la periodicidad que caracteriza a las proteínas fibrosas”.

Estas informaciones fueron recibidas por Svedberg con un gran optimismo puesto que en definitiva se trataba del primer estudio con éxito, realizado con Rayos-X, en una proteína globular hidrosoluble, que suministra una conformación, totalmente independiente, según la cual las proteínas son sustancias con un perfectamente definido alto peso molecular.

Estos definitivos y confirmadores resultados de sus, ya copiosos, datos, recopilados a lo largo de casi dos décadas, le dan pie para, primero, poder afirmar, rotundamente en 1939, “Nosotros tenemos razón al creer que las partículas en las soluciones de proteínas y los cristales de las proteínas están contruidos conforme a un proyecto que hace indispensable a todos los átomos para completar su estructura”; y más adelante, tal era la fe depositada en el alcance de las nacientes técnicas físicas, como medio poderoso para el estudio de la estructura de la materia, que se atreve a pronosticar “El análisis con Rayos-X (y posiblemente con rayos de electrones) nos dará posteriormente una completa imagen de la arquitectura de las moléculas proteicas tal como se encuentran en su forma cristalina”.

Sin embargo, nada nuevo, ni en pro ni en contra de la ley de los pesos moleculares múltiples aportaron estas primeras experiencias de difracción de rayos-X para las proteínas cristalizadas. Esto unido al hecho de que, al principio de los años cuarenta, cuando en muy diversos centros se desarrolla un amplio estudio de proteínas no-respiratorias, se encontrasen, incluso en Uppsala, muchas proteínas con pesos moleculares bastante inferiores al de la unidad básica de 17.600, enunciada por Svedberg, y otras moléculas proteicas que, en absoluto, se ajustaba al sistema de los múltiplos, fue motivo para que, en todo el mundo, surgieran severas y razonables críticas a la citada ley propuesta inicialmente por Sverberg.

Por todo ello, después, con una mirada retrospectiva, pudo concluirse que Svedberg estaba en lo cierto al sostener que las proteínas son compuestos perfectamente definidos, pero estaba equivocado en cuanto a suponer que su hipotético sistema de los múltiplos se podía aplicar a toda clase de proteínas. No obstante, no hay duda de que dentro de ciertos grupos de proteínas existe un sistema definido de múltiplos basado en un origen genético común. Debiéndose resaltar, en favor de su esencial descubrimiento, que, con posterioridad, pudo confirmarse experimentalmente una homogeneidad de las proteínas incluso mayor que la anticipada por Svedberg. En la que él intuía que la composición en aminoácidos de una proteína de una determinada especie podía variar en una cierta extensión, incluso en las proteínas del mismo individuo, en momentos diferentes, dependiendo de su disponibilidad para varios aminoácidos; debiendo considerarse a los pesos moleculares como unos valores medios.

Finalmente debe resaltarse que aunque esta hipótesis no pudo alcanzar su aplicación general, sus críticas y polémicas contribuyeron en forma decisiva al desarrollo de la Química de las proteínas pues, a finales de los años treinta y principio de los cuarenta, se despertó un gran interés por este grupo de substancias.

LA PRIMERA MONOGRAFIA Y LOS SUCESIVOS PERFECCIONAMIENTOS TECNICOS Y TEORICOS

Después de la precoz descripción de la primera ultracentrífuga de turbina, aparecida en varias revistas y tratados de 1927, no se había publicado ningún detalle desde el punto de vista de la posterior ultracentrífuga elaborada y utilizada por Svedberg. Ya que era reacio a emprender esta tarea por considerarla como una pérdida de tiempo y "un volver atrás", frente a sus muchos nuevos proyectos de investigación pendientes de realización. No obstante en 1934, con la colaboración de K.O. Pedersen, hicieron un primer borrador, para una monografía de la ultracentrífuga, que después tuvo que ser modificado y ampliado al ir incluyendo las modificaciones introducidas en los nuevos rotores y demás detalles técnicos, con lo que la definitiva monografía no se empezó a imprimir hasta casi un lustro más tarde.

El problema que surgió, en aquellos tiempos de la fuerte tensión europea que precedió a la segunda guerra mundial, fue el idioma en que debía ser publicada. Svedberg quería editarla en inglés, pero su antiguo editor alemán estaba decidido a que formase un volumen más de su *Handbuch der Kolloidwissenschaft in Einzeldarstellungen*. Al final, llegaron al acuerdo "salomónico" de que deberían imprimirse dos ediciones y que el manuscrito inglés y la traducción alemana deberían ser enviadas a sus respectivos editores en el mismo día. Bien entendido que, dada la situación política de la Alemania nazi, el editor alemán exigió que no constara, en la versión alemana, su traducción directa del original inglés. Y menos traducido por el Prof. Carl Drucker, judío refugiado procedente de la Universidad de Leipzig, que desde 1934 trabajó permanentemente en Uppsala. Los dos manuscritos fueron remitidos desde Uppsala a principios de febrero de 1939. La revisión de las pruebas finales concluyen en el otoño de este mismo año, después de estallar la guerra. Los primeros ejemplares de la Oxford University Press se rebieron en Uppsala el 3 de enero de 1940 y un mes antes habían llegado los de Theodor Steinkoff de Leipzig.

En esta extensa monografía, se detallan los aspectos de la construcción y perfeccionamiento de la ultracentrífuga de velocidad media para el método de equilibrio de sedimentación y la de turbina de aceite de alta velocidad para el procedimiento de la velocidad de sedimentación. De los sistemas ópticos adaptados por la observación y registro del experimento, se exponen primeramente los basados en la absorción de la luz visible o ultravioleta y después el procedimiento de la escala de Lamm, basado en la observación y medida de la variación de la refracción de la luz que proyecta una escala de divisiones y que se hace pasar a través del gradiente de concentración producido en la sedimentación de la solución. Pues tanto el método de Toepler

“Schlieren” como el de la rendija diagonal de Philpot-Svenson nunca dieron resultados aceptables en Uppsala. Y, por supuesto, aquí también se especifican los aspectos teóricos de ambas técnicas de ultracentrifugación, así como los procedimientos de cálculo de los parámetros del equilibrio y de la sedimentación.

Inicialmente Svedberg para que sus colaboradores, que de prácticamente todo el mundo habían llegado a Uppsala atraídos por sus revolucionarios descubrimientos en la Química Biológica, pudieran continuar investigando con la ultracentrífuga, realizó las gestiones necesarias para proporcionar a sus respectivos centros el equipo completo a precio de coste de fabricación de la LKB de Suecia, pues de esta forma también ellos podrían ir verificando los resultados que el iba logrando.

No obstante, el alto precio y la complejidad del equipo instalado en Uppsala restringiría, en buena parte, su uso más generalizado. De aquí que en los Estados Unidos, pronto se diseñaran y construyeran varios tipos de ultracentrífugas, unas para trabajos con proteínas y otros con virus.

La más conocida de las americanas fue la ultracentrífuga impulsada por aire, diseñada y construida por J. H. Bauer y E. G. Pickels en los laboratorios de la International Health División de la Fundación Rockefeller en Nueva York. El Dr. Bauer para poder llevar a cabo sus estudios sobre el virus de la fiebre amarilla, contrató los servicios de Pickels, entonces estudiante graduado que trabajaba con el Prof. S. W. Beams en la Universidad de Virginia, para construir un tipo de ultracentrífuga que careciera de cojinetes mecánicos. Para ello partiendo del mecanismo de la ultracentrífuga movida por aire de E. Henriot y E. C. Huguenard, y su anterior experiencia con Beams, fue capaz de construir la que después se llamaría “ultracentrífuga impulsada por aire”, no comercializada, aunque de ella se construyeron varias unidades para diversos proyectos de investigación. Tales como los desarrollados sobre virus, por Pickels y E. W. G. Wyckoff, en la división de Biofísica del Instituto Rockefeller o los de Beard y Wyckoff que en este mismo centro lograron purificar el virus del papiloma del conejo. También en esta centrífuga, Stanley y colaboradores encontraron el procedimiento adecuado para la purificación y caracterización de diversos virus de plantas, incluyendo el virus del mosaico del tabaco. Y en el Departamento de Físico-Química de la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard, bajo la dirección del Prof. E. J. Cohn, durante y después de la 2ª Guerra Mundial, se desarrolló un programa de fraccionamiento del plasma sanguíneo humano en cuya instrumentación este modelo era indispensable.

Del mismo modo que la centrífuga óptica de Madison, construida por Svedberg y Nichols fue la precursora de la centrífuga de equilibrio de sedimentación, ésta impulsada por aire constituyó el modelo prototipo de una nueva máquina comercial puesta a punto en 1947. Para salvar algunos problemas de la impulsión del rotor por aire, ésta se sustituyó por un motor eléctrico y engranajes de transmisión, además de otras innovaciones. Esta nueva ultracentrífuga tuvo pronto gran éxito y con ella nació una nueva industria creada por la Specialized Instrument Company de Belmont, California, que más tarde llegaría a ser la Spinco División of Beckman Instruments, Inc.

La primera ultracentrífuga analítica Spinco, Modelo E, fue instalada en

el laboratorio de Virus de la Universidad de California en Berkeley en 1947. En poco menos de dos décadas fue construido el n° 1000 que también fue adquirido por este mismo laboratorio de virus para uso del Prof. Howard K. Schachman en Berkeley. Lo cual da fe tanto de rápido crecimiento del campo de la ultracentrifugación como de la calidad de los nuevos modelos.

Desde el modelo E, original de Spinco, a los actuales, los criterios fundamentales han permanecido prácticamente inmutables. Si bien es cierto que en todas sus distintas partes se han introducido mejoras y modificaciones, así como nuevos accesorios tales como: fuente de luz minocromática, control electrónico de velocidad, un dispositivo de exploración ultravioleta, circuito de computadores para la programación, etc., etc.

En años sucesivos han ido apareciendo nuevas marcas de ultracentrífugas como por ejemplo: la M.S.E. (Measuring and Scientific Equipments, Ltd., Gran Bretaña), la Martin Christ (Alemania), la Metrimpex (Hungría), la Hitachi (Japón), etc., cada una con su propio tipo de impulsión y sistema óptico. Una excelente descripción de estos modelos se encuentra en el manual de T.J. Bowen.

Los objetivos de una teoría detallada para ambos casos, el de equilibrio de sedimentación y el de transporte o de la velocidad de sedimentación, son, a la vez, claros y diversos. Pues se trata de la descripción de métodos para la planificación y realización de experimentos de cuya interpretación de datos se van a deducir: los pesos moleculares y los coeficientes de sedimentación y difusión de toda clase de macromoléculas, sus separaciones e interacciones, el análisis cuantitativo de su mezcla, etc.

Naturalmente, que aquí únicamente vamos a reseñar la trayectoria que ha seguido el desarrollo de una apropiada teoría de la ultracentrífuga analítica, haciendo referencia a algunos de los más destacados casos de la bibliografía. Es un hecho evidente el lento desarrollo teórico de esta técnica, puesto que de la larga lista de publicaciones reseñadas en la monografía de Svedberg y Pedersen hasta el año 1934, no más de una docena se dedican a exposiciones teóricas. De las cuales tres proponen soluciones a la ecuación diferencial parcial de Lamm de la ultracentrífuga, una solución aproximada de Faxen y otra exacta de Archibald.

La solución de Faxen, práctica pero con limitaciones, constituye la manera más adecuada para la interpretación de los primeros experimentos de Uppsala con las proteínas. Estos experimentos, realmente, fueron llevados a cabo en sistemas de tres componentes: agua, proteínas y electrolito soporte para suprimir los efectos de carga. Pero como en tales soluciones se excluyen, por pequeños, los efectos de volumen, las ecuaciones de Faxen —aplicables únicamente a un sistema incompresible de dos componentes— sirven bastante bien para la determinación cuantitativa de ciertas características moleculares de cada proteína. Esta teoría se sigue aplicando con frecuencia aunque la solución posterior de Fujita es más realista, si bien no está tan generalizada, posiblemente porque hace uso de un complejo cálculo matemático.

Con raras excepciones, la exposición y generalización de las ecuaciones esenciales de trabajo no empezaron a conocerse hasta principios de los años cincuenta, y realmente fue en esta década, cuando los avances de la teoría hicieron que la ultracentrífuga llegara a ser un instrumento de aplicación ge-

neral. Los enriquecimientos teóricos vinieron rápidamente cuando se reconoció que la fuerza impulsora de las macromoléculas en el campo centrífugo era el gradiente de potencial total. De este modo el análisis termodinámico más moderno de ambos casos de equilibrio y de transporte, son los más satisfactorios. En los últimos años Lamm ha desarrollado con éxito una generalización de la teoría de sedimentación—difusión para incluir a los polidispersos, sistemas no ideales, utilizando los principios de la dinámica clásica, en otras palabras el concepto tradicional de fuerza de fricción. Obtuvo ecuaciones que por su forma se corresponden con las derivadas de los procesos termodinámicos irreversibles y fue más tarde cuando se demostró que ambos resultados eran equivalentes. Según Willians el uso de los principios generales de termodinámica es el análisis más consistente y correcto, tanto para el caso del equilibrio como para el de transporte.

En el caso del *equilibrio de sedimentación*, su primera y simple descripción teórica se basaba en el análisis desde el punto de vista de la teoría cinética. En ella se describía el equilibrio como un estado en el que el movimiento del soluto hacia adelante, debido a la sedimentación, es compensado exactamente por el flujo de difusión que, en sentido contrario, se manifiesta en todos los puntos de la célula. Estaba referida a los dos componentes de un sistema ideal de moléculas neutras. Pero con la experiencia de los años, se ha llegado a demostrar que tal aproximación teórica a duras penas tiene valor práctico para el desarrollo de una teoría rigurosa y generalizada, de aquí que haya sido abandonada.

Primero fue demostrado por Goldberg en 1953, y ahora es perfectamente conocido, que los sistemas de Gibbs de la termodinámica conducen directamente a una útil serie de ecuaciones para contestar a esta finalidad. Pues con ellos se pueden deducir las formas analíticas específicas de aplicaciones a técnicas especiales de laboratorio, establecidas para sistemas de dos, o más, componentes, ideales y no ideales, sistemas de reaccionantes químicos; casos de equilibrio de isodensidad, etc., etc.

Estas ecuaciones se deducen a partir de la premisa de que el potencial (químico, centrífugo y eléctrico) de cualquier componente en la solución está constantemente en equilibrio, para cada distancia radial en la célula, incluso aunque haya una continua variación de fase en la dirección del campo. La descripción apropiada de esta condición para el equilibrio de sedimentación, establecida por Gibbs hace más de un siglo, constituye el punto de partida de la teoría. En la bibliografía actual existen varios casos en los que se describe la teoría de los experimentos de equilibrio de sedimentación, y como bien señalan J.M. Creeth y R.H. Pain, en un artículo de revisión, son diversas las formas matemáticas aplicadas en la evaluación de los experimentos establecidos.

En el método de *transporte de sedimentación*, modalidad de *sedimentación de la linde*, la velocidad de sedimentación de un soluto es función del campo centrífugo aplicado, de su masa flotante y de su movilidad; y como la velocidad de difusión es función del gradiente de potencial químico y de la movilidad, la combinación de las ecuaciones de ambas velocidades proporcionará la forma de determinar el peso molecular.

Aquí también existen dos procedimientos de análisis. En uno, la fuerza de rozamiento o concepto hidrodinámico, imagen mecanicista, sirvió inicial-

mente para llegar a la fórmula de Svedberg del peso molecular. Se trata de una ley ideal para dos componentes, en un sistema incompresible de dos componentes neutros.

Sin embargo, en el sistema real de dos, o más componentes, que no cumplan rigurosamente las leyes de la hidrodinámica microscópica, de nuevo se ha tenido que recurrir otra vez a la termodinámica para lograr un tratamiento más generalizado y exacto.

En una más reciente publicación monográfica, J. M. Willians ha realizado un intento para proporcionar un simple tratamiento de los casos necesarios para obtener las expresiones de los coeficientes de sedimentación y de difunción, así como de los pesos moleculares prescindiendo del número de componentes del sistema. Los dos coeficientes son deducidos a partir del conjunto de ecuaciones de flujo, mejor que la ecuación del flujo de Lamm para un sistema de dos componentes. De cualquier forma; la combinación de los datos de los coeficientes de sedimentación y de difusión ya no es el procedimiento más generalizado en la determinación de un peso molecular.

Cuando este método se lleva a cabo en la modalidad de *sedimentación de zona o banda* los objetivos de una teoría para el desplazamiento de bandas de sedimentación, esencialmente, son los mismos que aquellos empleados en el caso de la clásica ultracentrífuga de lindes. (La distinción, algunas veces, consiste en que el término "banda" se usa para los procesos que tienen lugar en una ultracentrífuga analítica). También son casi idénticos los métodos de aproximación de la teoría a aquellos del caso del desplazamiento de la linde. Pues las ecuaciones de transporte de masa, de nuevo, requieren librarse de la convección durante el proceso, ya que precisan que el transporte sea originado únicamente por sedimentación y difusión. Estas ecuaciones permiten la determinación del coeficiente de sedimentación a partir de la observación de la velocidad de desplazamiento descendente de la banda que contiene las macromoléculas dentro del campo centrífugo.

Para las células en forma de sector, la velocidad de migración del centro de sedimentación, definido por el valor del logaritmo del radio correspondiente de la masa media, fue demostrado por V. N. Schumaker y J. Rosenbloom que es una función simple del coeficiente de sedimentación. En otro tratamiento teórico del experimento en esta misma célula de sector, J. Vinograd, R. Bruner y colaboradores han considerado el desplazamiento, con el tiempo, de varios de los más bajos momentos de masa dentro de la banda. En ambos casos las ecuaciones finales del coeficiente de sedimentación son substancialmente similares y además están totalmente de acuerdo con la fórmula tradicional de Svedberg, y todas son leyes límites. También estos autores han descrito métodos, y sus correspondientes teorías, para la determinación de los coeficientes de sedimentación de los pesos medios en sistemas de multicomponentes, así como para la determinación de la distribución diferencial e integral de los coeficientes de sedimentación de las macromoléculas cuando puede desprejarse el efecto del ensanchamiento debido a la difusión. Y, finalmente, también consideran con detalle las condiciones requeridas para la sedimentación de las bandas exentas de convección.

EL HABER Y EL FUTURO CIENTIFICO DE LA ULTRACENTRIFUGA

La ultracentrifugación, realmente ha constituido el primer éxito de los experimentos de transporte por sedimentación al haber contribuido a la caracterización de las proteínas. Los primitivos experimentos realizados en Uppsala demostraron de forma irrefutable que las proteínas naturales solubles son sistemas monodispersos, o con muy pocas especies moleculares, de masa perfectamente definida. Este sensacional descubrimiento motivó el que, a partir de la año 1932, una gran mayoría de los científicos bioquímicos empezaran a hablar de una nueva rama de las ciencias de la naturaleza viva a la que denominaron Biología Molecular. En la actualidad la ultracentrífuga está considerada como un instrumento de gran utilidad e incluso imprescindible para la caracterización y separación de otros muchos tipos de macromoléculas biológicas.

También este instrumento ha sido utilizado para demostrar la existencia de los ribosomas de bacterias, varios años antes de que estas partículas hayan recibido su denominación y sugerido su función en el metabolismo. En 1951, H. K. Schachman, A. B. Pardee, y R. Y. Stainer encontraron que extractos exentos de células, procedentes de varias especies bacterianas, todos contenían componentes de la proteína ribonucleica que sedimentaban a aproximadamente 40 s y 19 s (no corregidos); éstos eran los ribosomas 50 s y 30 s, que rebieron el nombre actual en el primer simposio de la Sociedad de Biofísica celebrado en Boston en 1958. En estas mismas investigaciones también se descubrieron y nominaron las bacterias cromatóforas y fotosintéticas.

Hasta ahora se han utilizado diversos procedimientos, basados en el equilibrio de sedimentación, para la determinación de los pesos moleculares de proteínas globulares y la literatura científica está repleta de ejemplos de esta naturaleza.

El experimento de la velocidad de sedimentación posee la singular particularidad de que su utilización, en condiciones apropiadas, permite evaluar la heterogeneidad de un soluto macromolecular polidisperso. Ya que no debe perderse de vista que, según puntualiza Williams, el propósito original de Svedberg al construir la ultracentrífuga, era el conseguir un procedimiento que permitiera medir cuantitativamente la citada heterogeneidad de los sistemas dispersos.

Los métodos ahora establecidos están ampliamente cimentados en bases matemáticas, cuyas expresiones fueron muy posteriormente elaboradas por W. B. Bridgman y después por R. L. Baldwin, L. J. Gosting, J. W. Williams y R. A. Alberty. Las cuales han sido aplicadas con éxito para la caracterización de los productos de digestión enzimática de las sero- γ -globulinas, de la gelatina, dextrano y polivinil-pirrolidona en soluciones de extensores del plasma artificial, de las lipoproteínas plasmáticas, y de muchos otros sistemas.

Las lipoproteínas poseen herogeneidad en el tamaño, densidad y peso molecular, no obstante, a pesar de la complejidad de sus soluciones, J. L. Oncley, mediante el experimento de transporte, ha hecho substanciales progresos para describir su polidispersidad.

Aunque con resultados no tan favorables, excepto en casos especiales, estos métodos se ha aplicado extensamente a los altos polímeros orgánicos disueltos en medios de esta misma naturaleza. Aquí la transformación de las curvas de gradiente de la linde observada, para dar la descripción de la verdadera heterogeneidad del soluto con respecto al coeficiente de sedimentación, ordinariamente, requiere correcciones, bien por métodos gráficos o bien analíticos, para los tres factores siguientes: efectos de difusión, presión y concentración del soluto. Existen algunas aproximaciones matemáticas con las cuales los ajustes para las dependencias de la presión y concentración pueden llevarse a cabo apropiadamente.

El propósito eventual de encontrar la función de distribución de los coeficientes de sedimentación para convertirlos y obtener la distribución de los pesos moleculares, requiere una única y exacta correspondencia entre la velocidad de sedimentación y el peso molecular. De aquí que, de nuevo, pueda ser conveniente encontrar métodos por los que la distribución de pesos moleculares pueda ser obtenida directamente a partir de los datos de equilibrio de sedimentación.

Precisamente sobre este área de la ultracentrifugación de las macromoléculas orgánicas, versó la actividad investigadora de nuestra estancia, como becario del C.S.I.C. durante el curso 1951-52, en el Instituto de Físico-Química de Uppsala. Bajo la supervisión del Prof. Svedberg y la dirección del Prof. Claeson, estudiamos el tamaño y estructura molecular de los copolímeros de acrilato de metilo-estireno y sus poliácidos mediante ultracentrifugación y medidas viscosimétricas de sus soluciones. Deduciéndose una sola especie molecular, ya que los diagramas del método de velocidad de sedimentación mostraban muy reducida polidispersidad, con un peso molecular del orden de 180.000 y 160.000 para los ésteres y sus poliácidos respectivamente. Los resultados de este grato y eficaz período de trabajo en Uppsala constituirían el tema de Tesis Doctoral en Ciencias Químicas.

Como ejemplo significativo de la utilidad y del uso actual del método de transporte, caben señalar los estudios de la estructura de ribosoma, partícula submicroscópica que está constituida por tres moléculas de RNA y de unas 55 proteínas. En ella se ha demostrado la existencia de dos subunidades separables: en una, la más pequeña, el coeficiente de sedimentación es de 30 s y en la otra de 50 s. La primera contiene una molécula de RNA combinada con 21 proteínas y la unidad más grande consta de dos moléculas de RNA y 34 proteínas. Las proteínas han sido liberadas y separadas con columna cromatográfica y además descritas en función de sus coeficientes de sedimentación y pesos moleculares, estos últimos evaluados por los métodos de equilibrio de sedimentación.

En los último años el campo de la flamante Biología Molecular ha sido eficazmente atendido por los procedimientos de sedimentación de zona o banda. Así en la literatura biológica, con frecuencia, se pueden leer publicaciones sobre el fraccionamiento y caracterización de núcleos celulares, mitocondrias, microsomas, virus y ácidos nucleicos, mediante los métodos de sedimentación.

Una clásica demostración de lo que puede lograrse, gracias a una modificación introducida en el procedimiento tradicional, es el experimento del equilibrio de sedimentación del autogenerado y flotante gradiente de densi-

dad. Las bases teóricas en que se funda este experimento muestran el método poderosamente eficaz para poder distinguir macromoléculas con muy ligeras diferencias en sus volúmenes parciales específicos. Con él se puede probar que preparaciones de DNA de diferentes bacterias tienen densidades efectivas diferentes y que estas diversas densidades pueden correlacionarse con las diferencias existentes en el contenido básico de DNA en las moléculas. También esta técnica ha sido adaptada para el estudio de la heterogeneidad de las lipoproteínas humanas de baja densidad.

De especial relevancia pueden mencionarse las aplicaciones del experimento de M. Meselson y F. W. Stahl a la genética. En esta prueba, el enrollamiento de doble hélice del DNA se desenrolla y se separa durante la división celular, sin que ocurra degradación alguna. Así, la *Escherichia coli*, a la que previamente se habrá incorporado ^{15}N en su DNA y otros materiales celulares se dejaba dividir en un medio fresco que contenía ^{14}N , y como consecuencia el DNA de las bacterias decrecía en densidad. Descenso que fue seguido a través de varias generaciones, al observar las tres bandas separadas de DNA que se formaban en la solución de cloruro de cesio cuando el equilibrio de sedimentación estaba muy próximo a 140.000 g en la ultracentrífuga analítica. De esta forma, el proceso de réplica está enteramente de acuerdo con el modelo helicoidal doble del DNA de Watson y Crick.

En Nature 13 de mayo de 1961, se exponen las aportaciones de dos grupos de trabajo que demostraron ser de singular importancia para el presente modo de interpretar los procesos de biosíntesis de las proteínas. En ambas investigaciones se empleaba la ultracentrífuga preparativa; en una de ellas los constituyentes de los extractos exentos de células se separaron parcialmente por gradientes formados con la centrifugación en soluciones de cloruro de cesio, y en la otra se utilizaron los gradientes de densidad en las soluciones de sucrosa. En la primera comunicación S.F. Brenner, F. Jacob y M. Meselson, muestran que cuando la *Escherichia coli* estaba infectada por el bacteriófago, los ribosomas "viejos" de las células huésped se utilizaban durante la síntesis de las nuevas proteínas. En la segunda serie de experimentos, F. Gros y colaboradores usaban células no-infectadas marcadas con impulsos para demostrar la existencia de un mensajero transitorio RNA que aparecía enganchado a ribosomas de 70 s. Al mismo tiempo, estos trabajos mantenían la sugerencia de F. Jacob y J. Monod, hecha más recientemente, según la cual los ribosomas son estructuras no-especializadas que reciben información genética del RNA mensajero. El último trabajo con la ultracentrífuga, cuya evidencia ha sido confirmada con el microscopio electrónico, señala que un número de ribosomas 70 s, pueden unirse a un enrollamiento del RNA mensajero para formar un polisoma. El que tales enrollamientos permanezcan intactos cuando las células se dividen, se puede observar si las lides sedimentan a las velocidades previstas para estructuras que contienen varios ribosomas.

En consecuencia, consideramos que la ultracentrífuga, actualmente, se utiliza ininterrumpidamente en un gran número de laboratorios cuyo interés se ha centrado en la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Siendo indispensable en la, cada vez más amplia, área de actividad investigadora relacionada con el estudio de los mecanismos que regulan las reacciones enzimáticas.

Las velocidades de las secuencias de reacciones son ajustadas para satisfacer los requerimientos metabólicos de las células, principalmente mediante la respuesta hecha por las enzimas alostéricas a las variaciones en la concentración de los metabolitos individuales. Tales respuestas, no obstante, dependen de los cambios en la conformación que estos metabolitos pueden causar y que aparentemente son transmitidos a través de interacciones entre la subunidades que constituyen la molécula completa de la enzima. Los fructíferos ensayos para la caracterización de la enzima alostérica aspartato transcarbamilasa ilustra el valor de los estudios con ultracentrífuga, especialmente cuando se complementa con otros métodos de análisis.

Así por ejemplo, J. C. Gerhart y H.K. Schachman mostraron que esta enzima, una proteína globular de peso molecular 3×10^5 , se desdoblaba en dos subunidades de dos tipos diferentes cuando se trataba con compuestos mercuriales. Uno de ellos catalizaba la reacción y el otro, el que no catalizaba mantenía el lugar de fijación mediante el trifosfato de citidina; en efecto, el trifosfato de 5-bromocotidina, sedimentó con esta subunidad no catalítica, o reguladora. Posteriormente, K. Weber (1968) determinaba en estos dos tipos la composición en aminoácidos y en grupos amino terminales y mostraba que una molécula de la enzima contenía cuatro cadenas polipépticas reguladoras y cuatro catalíticas. El primer trabajo había indicado solamente dos partículas catalíticas por moléculas, así que presumiblemente las subunidades catalíticas sedimentaban como dímeros. Evidenciándose, esta vez, que la ultracentrífuga ha mostrado la existencia de tipos diferentes de subunidades en una enzima compleja, requiriéndose otras técnicas, como la de difracción de rayos-X, para revelar su distribución en el espacio. Una limitación adicional del alcance de la ultracentrífuga en este área reside en la presencia de ciertas incertidumbres, tales como los valores de los volúmenes específicos de las proteínas en los disolventes utilizados para disociar las complejas moléculas en subunidades.

Siempre constituye una gran satisfacción para el bioquímico conseguir cristalizar la enzima con la que se está investigando, pero debe tenerse presente que el placer de este éxito no conlleva la garantía de una gran pureza. W. B. Jackoley (1968), en cuyo laboratorio se llevó a cabo, en unos tres años, la cristalización de 50 proteínas, ha realizado también la cristalización de preparaciones con un 30% de pureza, y precisamente él enfatiza la necesidad de aplicar también criterios de homogeneidad, tales como los proporcionados por la ultracentrífuga y la electroforesis. En contrapartida, también una mezcla heterogénea puede mostrar un solo pico en la ultracentrífuga si el experimento no ha sido realizado de una manera determinada. La velocidad de las partículas, cuando se sedimentan en un campo centrífugo, y las características de los picos a los que ellas da lugar, están influenciadas por muchos factores que no es conveniente ignorar. Por esta razón, además del potencial de esta técnica en las áreas antes mencionadas, es frecuente encontrar que las normas de muchos laboratorios restringen el uso de la ultracentrífuga a personal que ha sido convenientemente instruido, tanto en el uso del instrumento como en la interpretación de los datos alcanzados.

Un más reciente e importante éxito de la aplicación del análisis ultracentrífugo es el centrado en las investigaciones de la autoasociación de las pro-

teínas y de otras moléculas más pequeñas. En este momento la investigación experimental está rezagada respecto a la teoría, aunque se ha hecho considerables progresos. Como así lo atestiguan la publicación "Advances in Ultracentrifugation Analysis" del Simposio de 1968 celebrado en Nueva York.

Sin lugar a duda el método más usual es el del equilibrio de sedimentación; pero es preciso no olvidar la gran utilidad de los procesos de transporte. En dos monografías más recientes, "Migration of Interacting Systems" de L. W. Nichol y D.J. Winsor y "Interacting Macromolecules" de J. R. Cann, se recopilan muchos de los nuevos avances.

En unos de los primeros artículos aparecidos en aquella interesante serie, "Advances in Enzymology", H.B. Bull describía a la ultracentrífuga como "el más importante instrumento de todos los inventados para el estudio físico de las proteínas". Ha transcurrido casi medio siglo, desde que fueron escritas estas palabras, sin que las nuevas importantes técnicas descubiertas durante este período hayan podido desplazar a la ultracentrifugación de su posición central y prominente, entre los métodos idóneos para la investigación de las macromoléculas biológicas. No obstante, es preciso reconocer que los formidables triunfos de la ultracentrífuga no han sido tan ampliamente comentados como el éxito de las medidas de difracción de rayos-X, hechas por M.H.F. Wilkins con el ácido desoxirribonucleico, y su posterior interpretación de J. D. Watson y F. H. C. Crick en 1953. Los cuales supusieron una auténtica revolución en la forma de pensar en las ciencias biológicas al especificar una estructura completamente tridimensional a las proteínas. Pero indudablemente el ingente crecimiento de nuestros conocimientos sobre las propias macromoléculas y de su formación cuando las proteínas son sintetizadas en las células, también se deben, en gran manera, a muchas de las ingeniosas aplicaciones de la ultracentrífuga utilizada por numeroso investigadores.

Así, según comenta Williams, para la comparación de las formas de las proteínas en solución, ciertamente sería ventajoso el que el sistema estuviese arropado con una más exacta descripción, quizás haciendo uso de datos hidrodinámicos como los coeficientes de sedimentación. De nuevo, se trata de un problema que va acompañado de elementos matemáticos y experimentales, con la finalidad de calcular el volumen actual hidrodinámico de la proteína disuelta. Lo cual no quiere decir que el experimento de la velocidad de sedimentación no sea de utilidad en la detección de los cambios en la forma molecular, sino que realmente la cuestión estriba en conocer cual era la configuración de la molécula antes y después de la perturbación experimentada. Para Williams a pesar de lo mucho escrito sobre este tema, la mayoría de las publicaciones se consideran poco afortunadas, pues el denominado "número de asimetría", aun citado en la literatura actual, tiene bajo valor real.

Otra área de mucho interés es el desarrollo de teorías satisfactorias que nos permitiesen interpretar apropiadamente los datos de los experimentos de sedimentación con polielectrolitos en solución. Considerando, por ejemplo, polímeros de lisina, polímeros inorgánicos, etc., las unidades moleculares cinéticas se disocian dando un poli-ión y numerosos iones opuestos. Por esta razón, las propiedades termodinámicas de sus soluciones están más influencia-

das por la propiedad de estos iones de signo contrario, como es el caso de los comportamientos de transporte.

Cuando los polielectrolitos son de determinados tipos, y bajo ciertas condiciones, los efectos de carga pueden ser ampliamente suprimidos. Pero cuando se necesita competir con las dificultades de interpretación que surgen por causa de los efectos de polidispersidad, la no idealidad de la solución y las cargas eléctricas, deberá resolverse un problema teórico bastante más difícil. La cuestión es encontrar métodos, que separen, uno a uno, los efectos de cada complejidad. Debe tenerse presente que fueron necesarias dos décadas hasta lograr un "modus vivendi", en el que los efectos de carga estuvieran ausentes, para conseguir soluciones no-ideales polidispersas de moléculas neutras.

En este reducido extracto del devenir histórico de la ultracentrifugación, hemos intentado resaltar que, en sus diversas modalidades y sus correspondientes teorías, ha desempeñado un importante papel en el despliegue de los nuevos temas de la Biología Molecular. Incluso se han mencionado varias de las actuales limitaciones, pero esto no quiere decir que el tema haya alcanzado, ni incluso se ha aproximado, el estado de saturación. Pues es indudable que esta técnica le queda todavía por delante un futuro prometedor, en éste y otros campos de la investigación científica. Así, ciñéndose a los problemas biológicos y más concretamente al área de la química de las proteínas y ácidos nucleicos, la ultracentrifuga sigue cubriendo satisfactoriamente aspectos de gran importancia, tales como: los criterios de pureza de las proteínas, la sedimentación de partículas altamente asimétricas, la detección de los cambios de conformaciones en macromoléculas, y la determinación de los pesos de las cadenas moleculares además del peso molecular total de las grandes moléculas proteicas.

Para terminar, podemos resaltar a modo de corolario, en primer término, que la introducción de la ultracentrifuga de Svedberg, constituyó un hecho de la mayor transcendencia en el proceso creativo de las ciencias de la vida, puesto que con ella se pudo descubrir que las proteínas eran unas sustancias químicas bien definidas con un determinado peso molecular. La ultracentrifuga de velocidad de sedimentación y, más tarde, la técnica electroforética de Tiselius, pudieron pronosticar la posibilidad de alcanzar con éxito el aislamiento y la purificación de una determinada proteína. A partir de este momento los químicos y físico comprobaban que las proteínas pasaban de ser consideradas unos sistemas coloidales liofílicos mal precisados a unas sustancias perfectamente definidas, cuyo estudio era de un excepcional interés e importancia. En definitiva, puede afirmarse que este descubrimiento constituyó *un punto de partida de una nueva ciencia: la Biología Molecular*, en la que la humanidad tiene depositadas sus más alentadoras esperanzas, no solo de orden científico, sino también socio-económico y esencialmente de la sanidad mundial.

Finalmente, también con esta conferencia, creo modestamente haber cooperado, en nombre de esta Real Academia, al justo homenaje que merece la memoria de un hombre de la talla y circunstancias humana y científicas que concurren en el Prof. Svedberg. Pues su vida repleta de doctas inquietudes, no se limitaría a las relevantes aportaciones y descubri-

mientos antes comentados, sino que abarcaría otras áreas, entonces en plena revolución científica, como la de las interacciones entre las radiaciones ionizantes y la materia, llegándose a crear y construir con esta finalidad el nuevo Instituto "Gustaf Werner" equipado con el primer sincrociclotrón sueco de 200 MeV, y del cual, aun después de su jubilación, sería su primer Director. Al mismo tiempo, dado que, sin lugar a duda, llegó a ser el científico de más influencia de los países escandinavos, formó parte de los principales Consejos directivos de la investigación en Suecia, como el Consejo de Investigaciones Tecnológicas, y el de Investigaciones Atómicas.

Los años pasaban sin que el interés de Svedberg por la investigación decayera un solo momento, pues continuaba dirigiendo trabajos de investigación y aconsejando a sus estudiantes y colaboradores. Siendo digno de resaltar el meritorio hecho de que en la ceremonia de la graduación de doctores del año 1958 en la que, al cumplirse los 50 años de la defensa de su Tesis Doctoral, recibía el nombramiento de Doctor Jubilar (antigua tradición sueca), nada menos que cuatro discípulos suyos obtenían también el grado de Doctor.

La última publicación que lleva su nombre, data del año 1965, a sus 81 años de edad, y dos años más tarde presentaba su dimisión del cargo de Director del Instituto "Gustaf Werner", en el que por excepcional disposición de la administración sueca se le permitió permanecer todo el tiempo que deseara. Entonces abandonó Uppsala definitivamente, trasladándose a una antigua granja en Sundet, Kopparberg, no lejos de donde había pasado su infancia, y en el que pudo seguir practicando, ahora con plenitud, sus innatas y apasionantes aficiones botánicas, hasta su fallecimiento el 25 de febrero de 1971.

Por su mente despierta y llena de curiosidad mostró siempre un gran interés por todas las actividades culturales, con la única excepción de la música, pero incluso llegó a practicar la pintura de paisajes a la acuarela. Tenía y usaba una extensa biblioteca literaria y científica y en sus numerosos viajes por todo el mundo nunca desperdiciaba la oportunidad de visitar los grandes museos.

Svedberg fue un hombre excepcional en muchos aspectos, y un genio para vislumbrar nuevas y amplias posibilidades en sus diversas actividades. Fue admirado y querido por todos aquellos que tuvieron el privilegio de conocerle, ganándose siempre el respeto y la admiración de todos. Por este acúmulo y riqueza de cualidades positivas, resulta difícil definir su personalidad más característica, y como bien dicen sus más directos colaboradores, quizás ésta vaya implícita en uno de sus cometarios, de los pocos discursos que pronunció en sus banquetes de homenaje, "como científico y como botánico, yo he elegido la tundra abierta".

De acertadas estimamos las palabras de su discípulo el profesor Bengt Ranby, Presidente del Reciente Simposio del Centenario de Svedberg, al perfilar que las características de la actividad investigadora de Svedberg pueden quedar descritas por dos célebres sentencias chinas que rezan en un gran cartel en la Universidad de Canton, para el estímulo de la juventud en el estudio de la ciencia, "La Ciencia siempre es joven" y "La Ciencia es una planta siempre en flor".

Svedberg supo siempre compaginar su vida científica plétórica de inquietudes e iniciativas, con una, no menos activa y excepcional, vida familiar, pues contrajo matrimonio cuatro veces, fruto de las cuales fueron 12 hijos de descendencia familiar.

He dicho, muchas gracias.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BOWEN, T. J. : "An. Introduction to Ultracentrifugation", Nueva York, Wiley-Intersc., 1970.
- (2) CANN, I. R. : "Interacting Macromolecules". Nueva York, Acad. Press. 1970.
- (3) CLAEISSON, S. y PEDERSEN, K. O. : "The Svedberg, 1884-1971, Elected For Mem. Royal Society 1944". Biographical Memoirs of Fellows of Royal Society. Vol. 18, Nov. 1972.
- (4) NICHOL, L. W. y WIZOR, D. J. : "Migration of Interacting Systems", Oxford, Clarendon Press, (1972).
- (5) PEDERSEN, K. O. : "Svedberg and the Early Experiment". (Commemoration of fiftieth Anniversary of the Ultracentrifuge). Fractions, n^o 1, 1-8 (1974).
- (6) PEDERSEN, K. O. : "The development of Svedberg Ultracentrifuge" Proceedings of the Conference Fifty Years of the Ultracentrifuge, Ed. M. S. Lewis y G. H. Weiss, North-Holland Publ. Co. Amsterdam, 1976. Biophysical Chemistry, 5, 3-18, (1976).
- (7) RANBY, B. : Opening Address of the Svedberg Symposium. (100th Anniversary of Prof. The Svedberg born). Uppsala University, Aug. 22-44, (1984).
- (8) SVEDBERG, TH. y PEDERSEN, K. O. : "The Ultracentrifuge". Oxford, 1940. The Clarendon Press. 1940 (Reimpresión en 1959, Nueva York, The Johnson Reprint Corporation).
- (9) TISELIUS, A. y CLAEISSON, S. : "The Svedberg and fifty years of Physical Chemistry in Sweden". Ann. Review Phys. Chem. Vol. 18, p. 1-8 (1976).
- (10) WILLIAMS, J. W. : "From the Colloid Experiment to DNA"; (Commemoration of the fiftieth anniversary of the Ultracentrifuge). Fractions, n^o 2, 1-10 (1974).