

**INTERÈS PER LES PROTEÏNES:  
G. J. MULDER (1802-1880), E. FISHER (1852-1919),  
R. WILLSTÄTTER (1872-1942),  
J. B. SUMNER (1887-1955), F. SANGER (1918)**

**Santiago Garcia Vallvé; Miguel Angel Montero Simó; Antoni Rojas Pérez; Antoni Romeu Figuerola**

Grup d'Història de la Bioquímica. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona

Paraules clau: *proteïnes, enzims, enllaç peptídic, seqüència d'aminoàcids.*

Interest in proteins: G. J. MULDER (1802-1880), E. FISHER (1852-1919), R. WILLSTÄTTER (1872-1942), J. B. SUMNER (1887-1955), F. SANGER (1918)

Summary: *Elementary analyses were used by Mulder, from 1837 onwards, in a way that arose great attention. In 1837, Mulder concluded that fibrin, egg albumin, serum albumin and wheat albumin contained a substance (radical)  $C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$  (protein) and a few atoms of phosphorus. Mulder introduced the term «protein» to designate a radical common to all vegetable and animal ferments. While Fisher proposed that proteins were formed by polymerization of amino acids and that all proteins were polypeptides, Willst.,tter concluded that enzymes were not proteins. Sumner obtained the crystalline form of the enzyme urease and Fisher sequenced the first protein (the insuline).*

Key words: *proteins, enzymes, peptide bond, amino acid sequence.*

1. Gerardus Johannes Mulder (1802-1880). Químic holandès

Mulder fou un dels fundadors de la química agrícola, juntament amb Justus von Liebig (1826-1900). Mulder investigà el metabolisme animal, i en aquest context, el 1839 donà per a l'ovalbúmina, la seralbúmina i la fibrina la mateixa fórmula empírica:  $C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$ , que després feu extensiva per al gluten vegetal (Florkin i Stolz, 1979). D'acord amb les idees de Jöns Jakob Berzelius (1779-1848), per a Mulder la fórmula empírica representà un radical que es podia combinar amb un sofre i un fòsfor. Tot seguint els suggeriments de Berzelius, Mulder denominà proteïnes a aquest grup de productes naturals. Els químics de la primera meitat del segle XIX tendeixen a suposar que totes les proteïnes ofereixen el mateix anàlisi elemental i que poden ésser representades per l'esmentada fórmula empírica general. Prèviament, William Prout (1785-1850), que l'any 1815 formulà la teoria que el pes atòmic de qual-

sevol element químic és un múltiple exacte del pes atòmic de l'hidrogen, ja classificà les molècules dels aliments en sacarinoses, oleaginoses i albuminoses. L'abundància regular d'albuminoses en tot tipus de cèl·lules aviat feu imposar la idea que les proteïnes són les substàncies fonamentals per a la vida. En aquest sentit, Thomas Henry Huxley (1825-1895), biòleg anglès defensor de Darwin, popularitzà el 1868 la idea que el protoplasma, substància semifluida proteica, és la base física de la vida (Cordón, 1997).

La contribució de Mulder en l'estudi de les proteïnes fou rellevant, així com el suport de Berzelius, i polaritzà l'atenció de molts químics orgànics de l'època (Mulder, 1838). S'observaren certes divergències en els resultats de les fórmules empíriques, hom ha de trobar la raó principal en què la dificultat raïa en obtenir proteïnes pures a partir d'una mescla. Tot plegat feu que durant la segona meitat del segle XIX l'estudi químic de les proteïnes perdés interès. El curs de la química orgànica en aquest període feu, però, que hom centrés l'atenció en l'estudi dels alfa-aminoàcids, els productes d'hidròlisi de les proteïnes, del qual reeixí a començament del segle XX el coneixement molecular de les proteïnes. Tanmateix, però, l'interès biològic de les proteïnes es mantingué ben alt durant tot el segle XIX. Aleshores, les proteïnes objecte d'estudi eren els «ferments solubles» (ureasa, amilases, proteases, lipases) i la seva existència animaren la polèmica entre Pasteur i Liebig, Bernard i Berthelot, en quant al significat de les fermentacions (Pasteur, 1860). També, és remarcable la visió de Traube i posteriorment de Nägeli i Buchner. Els ferments solubles, d'alguna manera, qüestionaren la proposta de Pasteur sobre el reduccionisme de la vida al nivell cel·lular (Traube, 1878).

## 2. Emil Fisher (1852-1919). Químic alemany

Fisher estudià sistemàticament els sucres, algunes substàncies colorants artificials i els aminoàcids. El 1902 fou distingit amb el premi Nobel de química. Fisher posà una base important de la bioquímica: la natura química de les proteïnes. El 1906 obtingué polipèptids per condensació d'aminoàcids, i demostrà experimentalment que les proteïnes són polipèptids (Lehninger, 1988). Mitjançant una investigació completa i sistemàtica posà de manifest que: (i) les proteïnes estan constituïdes exclusivament per L- $\alpha$ -aminoàcids; (ii) que en les proteïnes aquests L- $\alpha$ -aminoàcids estan combinats entre si formant cadenes lineals per enllaços peptídics produïts per deshidratació del carboxil d'un aminoàcid i del grup amino d'un altre. Fisher aïllà de les proteïnes L- $\alpha$ -aminoàcids. D'altra banda, per la via de la síntesi obtingué mescles racèmiques d'aminoàcids, que seguint el mètode de Pasteur de separació d'estereoisòmers, obtingué els isòmers L (per conveni i en correspondència amb la L-alanina). D'aquesta manera els resultats de Fisher donaren suport al pensament biològic de Pasteur sobre la vinculació de l'estereoisomeria a la vida (Cordón, 1997).

Fisher arribà a obtenir sintèticament un polipèptid de 18 L- $\alpha$ -aminoàcids que donava les reaccions generals de les proteïnes (biuret, etc.) i era hidrolitzat per proteases. En quant a la funcionalitat de les proteïnes, Fisher els hi atribuï, també, encertadament, la funció enzimàtica i destacà l'especificitat dels enzims. Fisher fou de l'opinió que els enzims són proteïnes, per la seva condició d'ésser polímers constituïts per monòmers amb una determinada estereoisomeria. Així, els enzims estarien especialitzats en atacar substrats amb una determinada isomeria, ajustant-se els uns als altres «com el pany a la clau». Aquest concepte mecanístic d'interacció enzim-substrat persisteix avui dia i segueix essent citat en els textos de

bioquímica. Ara bé, Fisher considerava inverosímil que el pes molecular de les proteïnes fos més gran de 5000, i no els hi atribuï la naturalesa supramolecular (de macromolècula). En l'estudi de les proteïnes, els bioquímics hagueren de superar la dificultat del problema de la purificació de les proteïnes. Això portà a l'aclariment que: (i) les proteïnes tenen un pes molecular molt superior al inicialment previst; (ii) les proteïnes no són mers col·loids, i (iii) les proteïnes tenen una estructura clarament supramolecular.

### 3. James Batcheller Sumner (1887-1955). Bioquímic nord-americà

Gran part de la història de la bioquímica és la història dels enzims. El terme «ferment» fou gradualment reemplaçat pel nom d'enzim. Aquest fou proposat per Kühne el 1878, ve del grec i vol dir «en el llevat». La primera teoria general sobre catàlisi química, publicada per J. J. Berzelius (1835) incloïa un exemple d'un enzim, la diastasa de la malta, i senyalava que la hidròlisi del midó catalitzada pel la diastasa és més eficaç que la hidròlisi catalitzada per l'àcid sulfúric (Lehninger, 1988). Malgrat que L. Pasteur (1860) reconegué que la fermentació es catalitzada per enzims (ferments), postulà que aquests es troben lligats amb l'estructura i la vida de les cèl·lules de llevat. Fou un pas endavant molt important el descobriment de E. Büchner (1897) d'extreure els enzims que catalitzen la fermentació alcohòlica de les cèl·lules de llevat (Haldane, 1965).

No obstant això, el primer enzim en forma cristal·lina no fou aïllat fins uns anys després. Això ho aconseguí J. B. Sumner, el 1926, amb la ureasa, a partir de llavors de *Cana-valia Ensiformi* (Sumner, 1926). La importància dels seus treballs, no reconeguda fins molt més tard, rau sobretot en l'esclariment definitiu de la natura química dels enzims (ferments). Sumner demostrà que els cristalls eren constituïts per proteïna, i arribà a la conclusió, contrària a l'opinió que prevalia aleshores, que els enzims són proteïnes.

El 1946 li fou atorgat el Premi Nobel de Química. En la mateixa línia de treball de Sumner, el 1930 J. H. Northrop cristal·litzà l'enzim pepsina a partir de suc gàstric de porc (Northrop, 1930). L'estudi de cristalls de Sumner i Northrop obrí un debat en el món de la química orgànica, bàsicament encapçalat per R. Willstätter (Stent, 1973).

### 4. Richard Willstätter (1872-1942). Químic alemany

Willstätter estudià la constitució de diversos alcaloides i de la clorofil·la. Féu recerques sobre els enzims, les antocianines i els carotenoids. El 1915 li fou atorgat el Premi Nobel de Química pels seus estudis sobre els pigments vegetals. En la història de la bioquímica, des del començament del segle XX, agafa força la idea que la descomposició de la glucosa en la fermentació alcohòlica és el resultat d'un complex procés intracel·lular catalitzat per enzims. Willstätter proposà que els enzims havien d'ésser molècules senzilles i molt diverses entre si, i complementàries químicament a l'estructura del substrat (Waldschmidt-Leitz, 1933). En contra de la idea de Willstätter hi havia els treballs de Sumner sobre la ureasa i d'altres autors posteriors que també cristal·litzaren altres enzims extracel·lulars, tot demostrant que aquests enzims extracel·lulars (antigament, ferments solubles) són proteïnes pures (Sumner, 1933).

Des de finals del segle XIX fins a les primeres proteïnes cristal·litzades, hom consi-

derà que les proteïnes eren suports col·loïdals dels propis enzims, catalitzadors químics de les reaccions del metabolisme. Hi havia una confusió entre el concepte de suport col·loïdal de catalitzadors i el del propi catalitzador molecular (enzim) (Cordón, 1997).

Willstätter, pel seu pensament químic considerà els enzims com molècules no proteïques, la qual cosa fou errònia. Tanmateix, el portà a polemitzar fortament amb Sumner sobre la natura química dels enzims. L'opinió de Willstätter fou acceptada pels seus deixebles i per bona part de la comunitat científica. El contingut de ferro en la catalasa fou utilitzat a favor de la idea de Willstätter, que es feu extensiva a la ureasa. Per contra, Sumner defensà que la ureasa és una proteïna pura (Sumner J. 1933). Àdhuc, Sumner vacil·là de l'existència de grups de natura no aminoacídica a les proteïnes. Aquesta discussió no impedí que el 1925 Michaelis i Menten elaboressin la seva teoria d'activitat enzimàtica (Haldane, 1965). Malgrat tot, i des del coneixement actual, hom pot trobar atenuants per a la mala interpretació de Willstätter en: (i) el paper de cofactors i grups prostètics en l'activitat enzimàtica; (ii) la gran eficiència catalítica dels enzims; (iii) la limitada sensibilitat de les tècniques d'anàlisi de proteïnes. En definitiva, avui sabem que els enzims són proteïnes, però en molts casos, no únicament una cadena d'aminoàcids convenientment estructurada.

## 5. Frederick Sanger (1918). Bioquímic britànic

En base a la informació que Sanger coneixia sobre les propietats químiques dels pèptids senzills, ideà una estratègia general per a determinar la seqüència d'aminoàcids dels pèptids i de les proteïnes. El 1953, Sanger determinà l'estructura primària (seqüència d'aminoàcids) de les cadenes polipeptídiques de la insulina (Sanger, 1953). Això marcà un fita, atès que fou la primera de la qual s'arribà a conèixer la seva estructura covalent completa. El protocol contemplava la identificació dels aminoàcids terminals, la reducció de ponts disulfur, la hidròlisi mitjançant proteases específiques i l'anàlisi dels pèptids resultants. Tot plegat fa que si hom sotmet la proteïna objecte d'estudi a diferents tractament hidrolítics, hom obté una informació, que permet deduir la seqüència original, com si es tractés d'un trencaclosques.

El 1958 rebé, el Premi Nobel de Química, també el 1980. Sanger desenvolupà el mètode que porta el seu nom d'anàlisi d'aminoàcids. Aquest consisteix en fer-los reaccionar amb 1-fluoro-2,4-dinitrobenzè, amb la qual cosa hom obté un derivat dinitrofenilat del grup amina. En les proteïnes i pèptids, el reactiu només reacciona amb l'aminoàcid N-terminal i amb els grups amino de la cadena de lisina. Després d'una hidròlisi dels enllaços peptídics, hom identifica els dinitrofenilats dels aminoàcids per cromatografia (Sanger i Tuppy, 1961). Posteriorment el reactiu de Sanger fou substituït per altres més sensibles, com el clorur de dansil, o pel fenilisotiocianat, proposat per P. Edman (1967).

## Bibliografia

- CORDÓN, F. (1997). *Historia de la Bioquímica*, Madrid, Compañia Literaria.  
 EDMAN, P.; BEGG, G. (1967). «A protein sequenator», *Europ. J. Biochem.* 1, 80-91.  
 FLORKIN, M.; STOLZ, E.H. (1979). *Comprehensive Biochemistry* (part VI: a history of biochemistry), 30:123-126, Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company.

- HALDANE, J.B.S. (1965). *The Enzymes*, Cambridge, MIT Press.
- LEHNINGER, A.L. (1988). *Bioquímica*, Barcelona, Ediciones Omega, S.A.
- MULDER, G.J. (1838). *Ann. Pharm.*, 28, 73.
- NORTHROP, J.H. (1930). «Crystalline pepsin. (i) isolation and tests of purity», *J. Gen. Physiol.*, 13, 739-766.
- PASTEUR, L. (1860). «Mémoire sur la fermentation alcoolique», *Ann. Chim., 3è Sér.*, 58, 323-346.
- SANGER, F. (1959). «Chemistry of insulin», *Science*, 129, 1340-1344.
- SANGER, F.; TUPPT, H. (1961). «The amino acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin», *Biochem. J.*, 49, 463-490.
- STENT, G.S. (1973). *Genética Molecular*, Barcelona, Ed. Omega.
- SUMNER, J.B. (1926). «The crystallization of the enzyme urease», *J. Biol. Chem.*, 69, 435-441.
- SUMNER, J.B. (1933). «The chemical nature of enzymes», *Science*, 78, 335-336.
- TRAUBE M. (1878). «Die chemische theorie der fermentwirkungen und der chemismus der respiration», *Ber. Chem. Ges.*, 11, 1984-1992.
- WALDSCHMIDT-LEITZ, F. (1933), «The chemical nature of enzymes», *Science*, 78, 189-190.