

MicroAli rinde homenaje a Louis Pasteur

JUAN A. ORDÓÑEZ¹, GONZALO D. GARCÍA DE FERNANDO MINGUILLÓN²

¹Catedrático de Tecnología de los Alimentos de la UCM (jubilado), Académico de número de la RACVE, Presidente de MicroAli 1992-2000.

²Catedrático de Tecnología de los Alimentos de la UCM, Presidente de MicroAli 2016-continúa).

✉ ordonezpereda@hotmail.com | mingui@ucm.es

La science est l'âme de la prospérité des peuples et la source vive de tout progrès.

Louis Pasteur
En *Journal du Jura* (1876)

I. Introducción

El 22 de diciembre de 2021 se cumplieron dos siglos del nacimiento de Louis Pasteur (1822-1895)¹ y muchas revistas científicas y de divulgación, periódicos, sociedades científicas (entre ellas la SEM²) y otros organismos han conmemorado el bicentenario e incluso se ha creado una web³ y se ha publicado un libro⁴ con tal motivo. Además, mucho se ha escrito de la vida y obra del científico desde su muerte en 1895. Su biografía se ha recogido en enciclopedias, diccionarios, libros, monografías y en otras muchas publicaciones, incluida la divulgación en la Wikipedia, recomendándose la versión en lengua francesa. (https://fr.wikipedia.org/wiki/Louis_Pasteur). Con el presente artículo, no se pretende, pues, insistir sobre la figura humana y la obra de Pasteur. Sin embargo, dada la trascendencia que muchas investigaciones de Pasteur han tenido en el desarrollo de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos, el grupo de

Microbiología de los Alimentos (MicroAli) no puede ser ajeno al bicentenario; sería algo impropio e imperdonable. Por ello, los autores de este artículo, aprovechando el número extraordinario de SEM@foro dedicado a nuestro grupo, han redactado unas líneas narrando los trabajos del científico que más trascendencia han tenido en materia alimentaria, con el objetivo de rendir un homenaje al insigne científico en su bicentenario.

Aunque el presente artículo se refiera únicamente al ámbito alimentario, los autores desean, ante todo, dejar testimonio de los grandes avances que el gran químico y microbiólogo aportó al conocimiento científico de la época en otras ramas de la Ciencia; entre ellos, el destierro definitivo de la teoría de la generación espontánea (recuérdese los experimentos en los célebres matracas de cuello de cisne), la resolución del mal que sufrían los gusanos de seda, pebrina (agente etiológico *Nosema bombycis*) que le condujo a abordar trabajos sobre otras enfermedades que afectaban a los animales y humanos (cólera aviar, carbunco, tuberculosis, rabia, etc.) que culminaron con la emisión de la teoría germinal de las enfermedades infecciosas (la etiología de toda enfermedad infecciosa es un ente vivo microscópico) y finalmente, no se puede dejar de mencionar su trabajo en el desarrollo de vacunas (p. ej. frente al cólera aviar y la rabia).



Pasteur en 1885. Adaptación del óleo de A. Edelfelt (1854-1905). <https://es.dreamstime.com/louis-pasteur-un-retrato-de-dinero-clausura-image264954267> (consultado el 16/02/2023).

II. Descubrimiento de la quilaridad

El primer trabajo que dio a conocer el nombre de Pasteur estaba relacionado con un producto alimentario, el vino. Estudió los cristales del ácido tartárico, un componente bien conocido desde hacía siglos por los vitivinicultores, porque formaba un

¹ Nació el 27 de diciembre de 1822 en Dole, una ciudad del departamento de Jura (región Bourgogne-Franche-Comté) de 9.647 habitantes en 1821 (https://en.wikipedia.org/wiki/Dole,_Jura) (consultado el 05/02/2023).

² Villalobo Polo, E. 2022. *Pasteur, el padre de la Microbiología moderna*. SEM@foro, **74**, 8-12.

³ <https://n9.cl/f9t2b> (consultado el 22-01-2023)

⁴ Perrot, A. y Schwartz, M. 2022. *Pasteur: L'homme et le savant*. Ed. Editions Tallandier. París.

precipitado en los vinos. No obstante, su caracterización química no comenzó hasta 1818, cuando el farmacéutico sueco Scheele (1742-1786)⁵ aisló la forma libre del ácido a partir de unas lías de vino y Kestner, un fabricante de ácido tartárico, separó, en 1819, un compuesto de los precipitados vínicos que creyó era ácido oxálico⁶, pero más tarde se demostró que no lo era, sino un compuesto que tenía la misma composición que el tartárico, pero no se comportaba de la misma manera. Gay-Lussac (1778-1850)⁷ le denominó en 1828 ácido racémico (del latín *racemus*, de “racimo” de uvas)⁸ y Berzelius (1779-1848) en 1830 llamó a ambos “*isomeriska kropar*” (cuerpos isómeros) al tener la misma composición química⁹. Biot (1774-1862) describió en 1838 la actividad óptica dextrógira del ácido tartárico en solución, observando que, por el contrario, el racémico (llamado también paratartrato en aquella época), también disuelto, era ópticamente inactivo¹⁰.

En la década de 1840 el ilustre Dumas (1800-1884), quien fuera más tarde mentor de Pasteur, enseñaba Química en la prestigiosa *École Normale Supérieure* (ENS); sus clases despertaron un gran interés en el joven Pasteur que, entusiasmado, pasaba las horas en la biblioteca y en el laboratorio de Balard (1802-1876). Conoció allí a Delafosse (1796-1879), alumno y antiguo colaborador del que se le considera padre de la cristalografía Haüy (1745-1822), quien adoctrinó al joven Pasteur de los preceptos de su maestro acerca de la disposición de los átomos y su relación con las formas cristalinas. En aquellos años, el distinguido mineralogista alemán Mitscherlich (1794-1863) envió una nota a la *Académie des*

Sciences (AdS), en la que exponía el enigma así: “*El paratartrato y el tartrato de sodio y amoníaco tienen la misma composición química, la misma forma cristalina con los mismos ángulos, el mismo peso específico, la misma doble refracción y, por lo tanto, el mismo ángulo de los ejes ópticos. Disueltos en agua, su refracción es la misma. Pero el tartrato desvía el plano de la luz polarizada y el paratartrato es (ópticamente) indiferente, como Monsieur Biot ha observado en toda la serie de estos dos tipos de sales; pero la naturaleza y el número de los átomos, su disposición y sus distancias, son los mismos en los dos cuerpos que se comparan*”¹¹.

Esta nota causó mucho asombro en Pasteur porque, basándose en los conocimientos de cristalografía que había adquirido de los trabajos de Haüy y Delafosse, no alcanzaba a comprender cómo dos sustancias idénticas podían tener efectos tan diferentes sobre la luz. Decidió estudiar meticulosamente los cristales y sabía, refiriéndose a la nota de Mitscherlich, que M. Biot había realizado el experimento del científico de Berlín con una muestra de ácido racémico con los mismos resultados. Sin embargo, al repetir Pasteur el trabajo del Mitscherlich advirtió un pequeño detalle que se les había escapado, tanto al químico alemán como a Biot. Después de un examen microscópico de cristales, observó que superficies faciales menores de los cristales de ácido tartárico y sus sales estaban orientadas en el mismo sentido, hacia la derecha, y en solución desviaban la luz polarizada hacia la derecha (dextrógiros). Pasteur pensó que el ácido racémico (paratartrato), al no tener acción sobre la luz, debía proporcionar cristales simétricos. Se apresuró a examinar sus cristales y se llevó una gran sorpresa al encontrar que el racémico ópticamente inactivo, preparado según las indicaciones de Mitscherlich, contenía dos tipos de cristales, unos idénticos a los del ácido activo y otros que presentaban caras asimétricas (disimétricas en los escritos de Pasteur) en sentido opuesto. Pasteur separó manual y escrupulosamente las dos variedades de cristales para estudiar la acción de sus soluciones sobre la luz polarizada, que ya sospechaba que estaba relacionada con la asimetría molecular observada en los cristales. Las predicciones del joven científico se cumplieron con claridad manifiesta. Una

solución desviaba la luz polarizada hacia la derecha y la otra en sentido contrario y ambas con el mismo valor absoluto de su rotación específica. En una disolución conjunta de ambos tipos, en cantidades iguales, se anulaban los dos efectos. Había descubierto la quiralidad de las moléculas orgánicas. Sus estudios sobre la disimetría fueron anunciados en varias sesiones de la AdS, y publicados en 1848¹²

Sin embargo, su descubrimiento no fue fácilmente asimilado por los científicos contemporáneos. Así, Mitscherlich, a quien le fue presentado Pasteur, le dijo: «*Vous avez été guidé par une idée préconçue*”¹³. Biot fue más allá; le pidió a Pasteur que demostrara su hallazgo entregándole cristales de paratartrato de sodio y amoníaco que él mismo había preparado y había observado que eran ópticamente inactivos, rogándole que los separara, como ya lo había hecho anteriormente. Permítasenos que el propio Pasteur narre el desenlace del suceso: “*Biot preparó las soluciones en las proporciones adecuadas y, cuando llegó el momento de observarlas en el aparato de polarización, me invitó a su despacho; primero colocó en el aparato la solución más interesante, la que debía desviarse hacia la izquierda. Sin ni siquiera tomar una lectura, solo por el color de las dos imágenes del campo, vio que había una fuerte desviación hacia la izquierda. Entonces, muy visiblemente emocionado, el ilustre anciano me cogió la mano y me dijo: “Mi querido joven, he amado tanto la ciencia en mi vida que esto me hace latir el corazón*”¹⁴

Pasteur continuó durante un tiempo investigando la asimetría de un buen número de compuestos, observando que la mayoría de las sustancias orgánicas eran asimétricas, mientras que las del mundo inorgánico tenían una imagen superponible incluso, generalizando, dijo: “*El universo es un todo asimétrico. Me inclino a creer que la vida, tal como se nos manifiesta, debe ser función de la asimetría del universo, o de las consecuencias de la misma*”¹⁵

⁵ Kauffman, G.B. y Myers, R.D. 1998. Pasteur's Resolution of Racemic Acid: A Sesquicentennial Retrospect and a New Translation. *The Chemical Educator*, **3**, 1-4.

⁶ Viquipèdia (en francés). https://ca.wikipedia.org/wiki/%C3%80cid_rac%C3%A8mic (consultado el 29-01-2023).

⁷ Su nombre está grabado en la Torre Eiffel junto a dos científicos que se citan más adelante: Dumas y Haüy.

⁸ Racemic acid. 1854. Anónimo. *Pharmaceutical Journal*. Pharmaceutical Society of G.B. **XIII**, 110-113.

⁹ Berzelius, J. J. 1830. Om sammansattningen... egenskaper. *Kongl. Svenska Vetensk. Akad. Handl.* **49**, 49-80.

¹⁰ Biot, J.B. 1838. Sur l'emploi de la lumière polarisée pour manifester les différences des combinaisons isomériques. *Annales de Chimie et Physique*, **T 69**, 22-32.

¹¹ Mitscherlich, M. (note de). 1844. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences* (en adelante CRsAS). **T 19**, pág. 720. (Traducción propia del original).

¹² Pasteur M.L. 1848. Sur les relations qui peuvent exister entre la forme cristalline, la composition chimique et le sens de la polarisation rotatoire. *Annales de Chimie et de Physique*, 3^e série, **T 24**, 442-454.

¹³ Cochin, D. 1884, Les travaux de M. Pasteur. *Revue des Deux Mondes* 3er période, **66**, 841-871. *Ibidem*. (Traducción propia del original).

¹⁵ Marchal, E., D., 1897. Louis Pasteur 1822-1895. *Annales de la Société Belge de Microscopie*. **T 21**, 159-188. (Traducción propia del original).

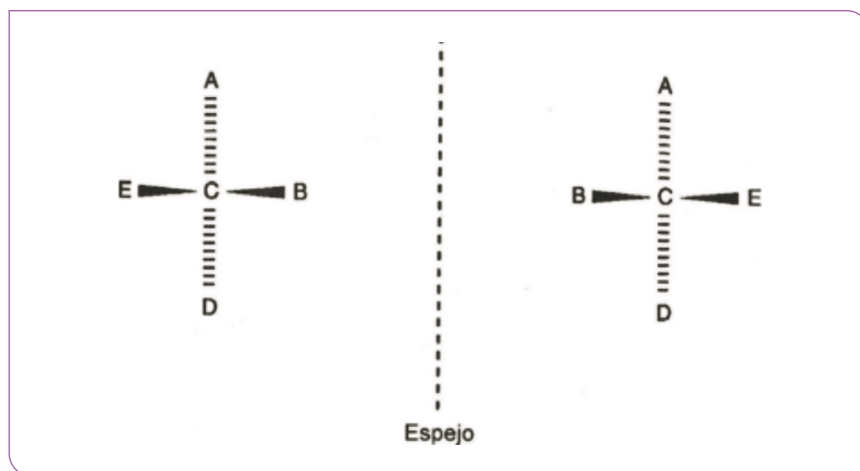


Figura 1. Átomo de carbono quiral. A, B, D y E representan distintos átomos o grupos funcionales ligados al carbono C. Los triángulos alargados indican enlaces químicos que se proyectan hacia fuera del plano y las líneas discontinuas son enlaces que se localizan en el plano de la página o hacia abajo del mismo.

La relevancia de la quiralidad en el ámbito alimentario es de una importancia extraordinaria porque todo compuesto que contenga un átomo de carbono asimétrico (ACA) (Figura 1)¹⁶ presenta actividad óptica pudiendo tener, teóricamente, 2ⁿ estereoisómeros donde *n* es el número de ACAs. Por ejemplo, todos los aminoácidos, excepto la glicina (no tiene ACA), tienen un ACA y la treonina e isoleucina poseen dos. Los aminoácidos de las proteínas tienen conformación L-. Similares consideraciones pueden hacerse para los azúcares. Por ejemplo, la glucosa tiene 4 ACAs y la fructosa 3. En la naturaleza, la forma habitual de la glucosa es dextrorrotatoria mientras que la de la fructosa es levorrotatoria. La isomería tiene una gran trascendencia en los procesos bioquímicos porque muchas de las enzimas tienen una actividad específica muy rígida. Estos comentarios pueden aplicarse también a los microorganismos, incluidos los de interés tecnológico. Por ejemplo, el isómero del ácido láctico producido por las bacterias lácticas (BAL) depende de la naturaleza de la lactato-deshidrogenasa (LDH) presente en el microorganismo. A modo de ejemplo se podría mencionar que se ha propuesto¹⁷ la determinación de ácido

D(-)láctico enzimáticamente, usando D(-)LDH, como indicador de la alteración de la carne y productos cárnicos envasados a vacío, en los que predominan las BAL claramente por encima de los microorganismos aerobios. Este método se basa en que el enantiómero D(-)LDH no existe en la carne fresca [sí hay, en cambio, el isómero (L-) derivado del metabolismo anaeróbico *post-mortem*], y su tasa aumenta con el tiempo de almacenamiento.

III. Fermentaciones¹⁸

➤ III.1. Fermentación láctica

Siguiendo sus estudios sobre los compuestos quirales, Pasteur dejó olvidada una solución diluida de paratartrato amónico con algunas sales; vio que se cubría de mohos, en particular de *Penicillium* (género descrito por JHP Link en 1809). Al mismo tiempo, notó que la solución, al principio inactiva, desviaba cada vez más la luz

polarizada hacia la izquierda. Con sagacidad (recuérdese su célebre frase “*dans les champs de l’observation le hasard ne favorise que les esprits préparés*”¹⁹) concluyó que el hongo consumía la forma dextrógira del ácido, dejando inalterado el levógiro. Así, por primera vez, el principio de asimetría molecular irrumpió en el campo biológico. Pasteur, al pensar cómo un ser microscópico, el moho, podía ejercer una acción tan destacada sobre la disimetría molecular, le hizo vislumbrar nuevos horizontes y derivó su carrera científica al estudio de las fermentaciones, cuyos fenómenos intrínsecos estaban entonces muy oscuros. Se dijo a sí mismo que la acción de un ente infinitamente pequeño no podía ser un caso aislado, único, y debería ajustarse a alguna ley general insospechada. Acorde con su máxima “*Si je ne sais pas quelque chose, je vais enquêter*” se puso a investigar el mecanismo íntimo del fenómeno que de forma espontánea o dirigida venía produciéndose y aprovechándose desde el Paleolítico.

En aquella época dominaba la teoría catalítica de Liebig (1803-1873); parecía la única que podía explicar las acciones ininteligibles que se adjudicaban a los “fermentos”²⁰ (descomposición de cadáveres de animales y vegetales, el agriado de la leche, el burbujeo del zumo de uva en las cubas, la panificación). Para este científico el oxígeno era la primera causa de descomposición de los materiales nitrogenados, cuya modificación molecular se transmitía después a la masa en fermentación rindiendo nuevos productos. Hacia 1836, Schwann (1810-1882), convencido de que la generación espontánea era falsa, llevo a cabo un experimento hirviendo caldo, y después de algún tiempo fue incapaz de detectar microorganismos ni tampoco cambios químicos (alteración) del caldo. También observó que las levaduras que se depositaban en el fondo de las cubas de vino se multiplicaban por gemación y bien podrían intervenir en la descomposición de los azú-

¹⁶ Damodaran, S. y Parkin, K.L. 2019. Fennema Química de los Alimentos 4ª ed. Pág. 95. Ed. Acrobía. Zaragoza.

¹⁷ De Pablo, B., Asensio, M.A., Sanz, B., Ordóñez, J.A. 1989. The D(-)lactic acid and acetoin/diacetyl as potential indicators of the microbial quality of vacuum-packed pork and meat products. *Journal of Applied Bacteriology*, **66**, 185-190.

¹⁸ Los autores desean expresar su reconocimiento a los científicos del siglo XIX que se mencionan en este artículo, incluidos los químicos que criticaron los trabajos de Pasteur (Mitscherlich, Berzelius, Liebig, Wholer entre otros). Las referencias a éstos se han realizado solamente para manifestar la discrepancia, a veces en términos agrios, de los defensores de la corriente catalítica (oxidación) frente a la fermentativa (agentes biológicos). Desgraciadamente, no hubo sinergia entre químicos y biólogos. Si hubiera existido, se habría adelantado el nacimiento oficial de la Bioquímica.

¹⁹ Frase pronunciada en 1854 en el discurso de la inauguración de las Facultades de Letras de Douai y Ciencias de Lille.

²⁰ La palabra “fermentación” deriva del verbo latino *fervere* (hervir, espumar) y del sufijo *-mentum* (medio) más el sufijo *-cion* (acción y efecto). Aparece en francés en 1539 (<https://diccioned.usal.es/palabra/fermentacion> (consultado el 09/02/2023)). Se cree que se utilizó por primera vez por los alquimista del siglo XIV aunque no en sentido científico sino de forma general (<https://en.wikipedia.org/wiki/Fermentation> (consultado el 09/02/2023)).

cares, pero estas observaciones, limitadas a un caso particular, no lograron socavar las ideas reinantes²¹. Fue el estudio de la fermentación láctica lo que le permitió a Pasteur objetar la teoría catalítica de Liebig. Pasteur había observado en el coágulo de leche el depósito de un material grisáceo y, bajo el microscopio, vio que contenía, además de restos lácteos, innumerables células dispuestas en cadenas²², mucho más pequeñas que las levaduras de la cerveza. Cabe suponer que recordó su propia frase “*Si je ne sais pas quelque chose, je vais enquêter*” y decidió estudiar el fenómeno. Para ello, formuló un medio químicamente definido consistente en un extracto soluble de levadura de cerveza que sometió a ebullición, luego le añadió azúcar y tiza²³ y lo sembró con una pizca del material grisáceo y al día siguiente observó lo sucedido. Así comunicó su hallazgo a la AdS: “*Al día siguiente, la fermentación era vigorosa y regular. El líquido netamente claro en origen se tornó turbio, la tiza fue desapareciendo poco a poco y, al mismo tiempo, se originó un depósito que fue creciendo continua y progresivamente a medida que desaparecía la tiza. Además, se observaron todas las características típicas y todos los sucesos bien conocidos de la fermentación láctica*”²⁴. No había duda alguna. Pasteur había encontrado el agente de acidificación: el fermento láctico.

Sin embargo, los defensores de la teoría catalítica seguían obcecados en que la fermentación se debía, no al depósito del fermento vivo, sino a las células muertas en vías de descomposición o a la materia nitrogenada surgida durante la ebullición. Para disipar dudas, Pasteur llevó a cabo un experimento concluyente: añadió pequeñas cantidades de fosfatos alcalino-terreos y una sal amoniacal a una solución de azúcar desprovista de materia orgánica nitrogenada y sembró este licor con una alícuota de fermento láctico vivo. La fermentación se produjo de forma normal. Aún más, remató su teoría de forma no menos concluyente al lograr una fermentación alcohólica típica inoculando una

porción ínfima de levadura en una solución azucarada añadida de sales nutritivas²⁵. La hipótesis de que la fermentación era un fenómeno catalítico quedó definitivamente abandonada.

Nació así una línea de investigación sobre las BAL. Microbiólogos, bioquímicos, higienistas y tecnólogos de los alimentos desarrollaron proyectos destinados al estudio de estas bacterias. Sería un olvido no mencionar al microbiólogo sueco S. Orla-Jensen (1870-1949), el primer científico que las estudió a fondo y puso orden en la clasificación; sus investigaciones culminaron con la publicación de libro “*The Lactic Acid Bacteria*”²⁶. Poco a poco fue descubriéndose la naturaleza de estos microorganismos y sus importantes funciones, bien deletéreas (descomposición de las plantas, “agriado” de la leche, alteración de vinos, alteración de alimentos proteicos envasados a vacío) y bien tecnológicas [fermentaciones tanto de productos de origen vegetal (p.ej., col ácida, aceitunas, ensilado) como de origen animal (leches fermentadas, quesos, embutidos, etc.)]. Desde Pasteur, se ha publicado una infinidad de artículos sobre las BAL donde se han ido anunciando los avances de su estatus taxonómico, hábitat, genética, fisiología, metabolismo, aplicaciones, etc. Se recomienda el libro de Vinderola y col. (2019)²⁷, un compendio de 42 capítulos del estado actual de las propiedades y funciones de las BAL.

➤ III.2. Fermentación butírica

Durante los estudios de la fermentación láctica, Pasteur había notado que cuando en la leche, después de la acidificación y precipitación de la caseína, se producía una fermentación butírica, aparecía un “vibrión” muy “ágil” redondeado en los extremos. Decidió estudiar el suceso y el resultado lo comunicó en 1861 a la AdS mediante un informe²⁸ en el que, tras manifestar que se

sabe bien que la fermentación láctica conduce a la generación de ácido láctico, una sustancia gomosa, manita [probablemente se refería a la manosa, (epímero de la glucosa en el C-2)], ácido butírico, alcohol, ácido carbónico e hidrógeno y que, textualmente, “*el fermento que transforma el azúcar en ácido láctico es diferente al que determina la formación del material gomoso...*”, hipotetiza “*...que los diversos fermentos vegetales no pueden en ningún caso, aún siendo puros, generar ácido butírico. Por tanto, debe existir un fermento butírico propio...*” Después, notifica que ha realizado múltiples experimentos llegando a la conclusión de que, ciertamente, la transformación del ácido láctico en butírico se debe a un verdadero fermento butírico que lo identifica como un “infusorio”. Más tarde describe este agente: “*Son bastoncitos cilíndricos redondeados en sus extremos, generalmente rectos, aislados o asociados en cadenas de dos, tres, cuatro o a veces más unidades...*”, ofreciendo más datos del “animáculo”, sus medidas, cómo se multiplican, cómo avanza con movimientos ondulatorios, etc. y luego indica que “*... estos infusorios viven y pululan en miríadas en medios absolutamente exentos de oxígeno y no solamente viven sin aire, sino que el aire les mata*” Concluye el informe con las siguientes propuestas:

“1° El fermento butírico es un infusorio”

“2° Este infusorio vive sin gas oxígeno libre”

“Este es, creo, el primer ejemplo conocido de fermentos animales, y también de animales que viven sin gas oxígeno libre”

Dos años más tarde, en 1863, Pasteur, en una sesión de la AdS propuso “*... ces mots nouveaux aérobies et anaérobies...*” para indicar la existencia de dos clases de entes inferiores, unos incapaces de vivir sin la presencia de oxígeno y los otros que pueden multiplicarse sin este gas. Al tiempo, a los anaerobios “les llamó “*zymiques* (ζύμη, levain, ferment), *c'est-à-dire des ferments*”²⁹. Con ello, había intuido la existencia de las enzimas que, más tarde, en 1878, el fisiólogo alemán Kühne usaría este término para acuñar la palabra “enzima”. Los términos *aérobies* y *anaérobies* se incluyeron en 1875 en el *Dictionnaire de la langue française* de Émile Littré (1801-1881).

Hoy se sabe que el “vibrión” descubierto por Pasteur corresponde a la especie *Clostridium*

²¹ Marchal, E., D., 1897. Louis Pasteur 1822-1895. *Annales de la Société Belge de Microscopie*. T 21, 159-188.

²² Más tarde se identificarían como bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus*.

²³ La tiza era fuente de calcio y, al tiempo, se comportaba como agente amortiguador del pH.

²⁴ Pasteur, L. 1857 Memoire sur la fermentation appelée lactique. (1857) *CRsAS* T 45, pág. 914. (Traducción propia del original).

²⁵ Marchal, E., D., 1897. Louis Pasteur 1822-1895. *Annales de la Société Belge de Microscopie*. T 21, 159-188.

²⁶ Orla-Jensen, S. 1919. *The Lactic Acid Bacteria*. Ed. Andr. Fred. Høst and Son, Copenhagen.

²⁷ Vinderola, G., Ouwehand, A., Salminen, S. y von Wright, A. 2019. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 5th ed. CRC Press. Boca Raton.

²⁸ Pasteur, L. 1861. *Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygène libre et déterminant des fermentations*. *CRsAS*, T 52, 344-347. (El texto en cursiva, traducción propia del original).

²⁹ Pasteur, L. 1863. *Recherches sur la putréfaction*. *CRsAS*, T 56, 344-1189-1194.

tridium butyricum, una bacteria gram-positiva formadora de esporas que habita en los suelos donde juega un papel esencial en la descomposición del material vegetal y es muy común en leches ácidas y quesos, fuentes que utilizó Pasteur para su aislamiento y estudio. En Asia, particularmente en Japón, Corea y China se utiliza como probiótico³⁰.

► III.3. Fermentación alcohólica

Los humanos vienen utilizando la fermentación alcohólica desde tiempos inmemoriales para producir vino y cerveza. Un registro en Armenia de hace 5.500 años contiene restos de la primera bodega de la historia³¹ y en el “Himno a Ninkasi” (~1500 a.e.c.) se describe cómo fabricar cerveza. Obviamente, la producción era artesanal y hubo que esperar al desarrollo del microscopio (Van Leeuwenhoek, 1674) y, sobre todo, a los estudios preliminares de Cagniard de Latour (1777-1859), Schwann y Kützing (1807-1892) y definitivos de Pasteur para comprender las fermentaciones. Antes de que Pasteur iniciara sus investigaciones sobre las fermentaciones, los tres científicos anteriores indicaron en 1837, separada, pero simultáneamente, que las levaduras eran organismos vivos, de forma esférica, que se multiplicaban por gemación y podían observarse con el microscopio, sugiriendo que podían ejercer un importante papel en la fermentación alcohólica. Schwann incluso las llamó “hongo del azúcar” y Kützing apostilló que la levadura no era un compuesto, sino un ente organizado³². Estos resultados, confirmados por el botánico francés Turpin (1775-1840), deberían haber preparado el escenario para que los químicos se unieran a la exploración de la actividad celular y unieran sus recursos con las aportacio-



Figura 2. Estudios de Pasteur sobre el vino y la cerveza.

nes de los biólogos. Desafortunadamente, se desaprovechó esta oportunidad e incluso fue obstaculizada por algunos de los químicos más destacados de la época³³. Entre ellos, Berzelius, acuñador del término “catálisis”. Este gigante de la Química no aplicó el nuevo concepto de la fermentación para explicar la actividad de la levadura, y en 1839 censuró tan dura como injustamente los resultados de los biólogos celulares sin ofrecer ninguna explicación alternativa plausible al fenómeno fermentador (ref.32). Del mismo modo, Liebig (un líder de la Química Orgánica) y Wöhler (1800-1882) (acreditado por haber sintetizado la urea), se opusieron frontalmente a los cuatro biólogos mencionados, expresándolo Schlenk de esta forma “*had no experimental evidence to disprove the cellular basis of fermentation; instead, they resorted to polemic mockery of the worst kind*” (ref. 33). Se recomienda al lector la lectura del artículo de Schlenk (ref. 33) donde percibirá la obstinación y la agria crítica de los químicos opositores a los biólogos.

Pasteur entró en la disputa a partir de 1854 y, tras demostrar el origen bacteriano de la fermentación láctica, puso de manifiesto que la levadura tenía la capacidad de originar un proceso fermentativo en un medio sintético, demostrando también que la masa de levadura procedía mayoritariamente de la depleción de azúcar. Estos hallazgos invalidaban la teoría de sus

competidores, quienes mantenían que los productos de la fermentación surgían por la acción del oxígeno sobre las partículas nitrogenadas del líquido fermentable. Pasteur comunicó en 1857 a la AdS el resultado de sus investigaciones, ofreciendo detalles pormenorizados de sus experimentos que rebatían la teoría de sus adversarios químicos, citando expresamente a Liebig, y concluyendo al final de la memoria lo siguiente: “*El desdoblamiento del azúcar en alcohol y ácido carbónico es una acción correlativa de un fenómeno vital y de una organización de glóbulos (levaduras) en la que el azúcar participa directamente, proporcionando una parte de los elementos de la materia de dichos glóbulos*”³⁴. Tras esta comunicación a la AdS, fue sucesivamente aportando nuevos datos sobre esta fermentación, como la presencia también de ácido succínico³⁵ y glicerol³⁶ en el medio fermentado. Igualmente comunicó que, al contrario de la opinión de Liebig, no se formaba amoniaco durante la fermentación, sino que aparecía accidentalmente procedente de los licores del medio y las pequeñas porciones originadas desaparecían durante el proceso³⁷. Los estudios sobre la fermentación alcohólica y su correlación con el vino y cerveza los plasmó Pasteur en dos libros publicados en 1866 y 1867, respectivamente (figura 2).

³⁰ Seki, H., Shiohara, M., Matsumura, T. Miyagawa, N. Tanaka, M. Komiya, A. Kurata, S. 2003. Prevention of antibiotic associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. *Pediatrics International*. doi:10.1046/j.1442-200x.2003.01671.x.

³¹ Owen, J. (2011). Earliest known winery found in Armenian cave. National Geographic. <https://www.nationalgeographic.com/culture/article/110111-oldest-wine-pressmaking-winery-armenia-science-ucla> (consultado 12/03/2023).

³² Manchester, K.L. 1995. Louis Pasteur (1822-1895) — Chance and the prepared mind. *Trends in Biotechnology*, **13**, 511-515.

³³ Schlenk, F. 1985. Early research on fermentation — a story of missed opportunities. *Trends in Biochemical Sciences*, **10**, 252-254.

³⁴ Pasteur, L. 1857. Mémoire sur la fermentation alcoolique. *CRAS*, **T 45**, 1032-1035. (El texto en cursiva, traducción propia del original).

³⁵ *Ibidem* 1958. **T 45**, 179-181.

³⁶ *Ibidem* 1958. **T 46**, 857.

³⁷ *Ibidem* 1958. **T 47**, 1011-1013.

No se va a discutir la trascendencia de los estudios de Pasteur sobre la fermentación alcohólica, son obvios: la fabricación de cerveza y vino y otras bebidas alcohólicas que se venía practicando desde el Neolítico pasó de la artesanía y el empirismo a una fabricación apoyada por la ciencia, con el consiguiente impacto, sin precedentes, en las industrias correspondientes.

➤ III.4. Fermentación (oxidación) acética

Parece obvio que el origen del vinagre esté directamente relacionado con las bebidas alcohólicas, particularmente con el vino, ya que el alcohol se oxida espontáneamente en presencia de aire merced a las bacterias acéticas que fortuitamente alcanzan el producto. De hecho, los primeros datos que se tienen del vinagre proceden de los babilonios y de los egipcios, habiéndose utilizado como conservante (acidificación), en medicina (p. ej., limpiar/desinfectar heridas) y en cocina (ingrediente culinario). Los primeros registros escritos que han llegado a nuestros días proceden de los romanos; Apicio (25 a.e.c.-37 d.e.c.) ofrece una serie de recetas con vinagre en su tratado *De re coquinaria* y Columella (4 a.e.c.-70 d.e.c.) describe en su obra *Res Rustica* los ingredientes y el proceso para la preparación de varios tipos de vinagre. Durante siglos, sin apenas mejoras, se fue fabricando vinagre al albur de la naturaleza hasta finales del siglo XVI, cuando se introdujeron diferentes técnicas, todas empíricas, siendo el procedimiento de Orléans el que alcanzó más fama, debido a la normalización de los procesos de fermentación y envejecimiento.

Los primeros avances científicos se produjeron en la segunda mitad del siglo XVII cuando el holandés Boerhaave (1669-1738) descubrió la necesidad de la presencia de aire para la fabricación de vinagre e ideó la adición de virutas de madera (*madre del vinagre* o *flor del vinagre*) para ensanchar la superficie de oxidación³⁸, el micólogo sudafricano (afincado en Francia) Persoon (1761-1836) acuñó el nombre de *Mycoderma* (*myco*: hongo; *derma*: piel) para añadir a la lista fúngica de Linneo asumiendo que la película que se formaba en la superficie

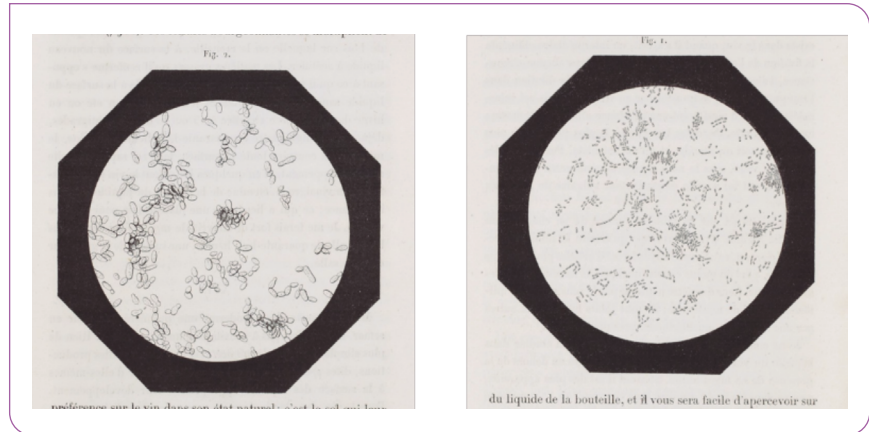


Figura 3. *Mycoderma* de la "flor del vino" (izquierda) y de la "flor del vinagre" (derecha). Ref 42. Obsérvese la diferencia del tamaño: levadura y bacteria, respectivamente.

del vinagre era un moho³⁹ y Döbereiner (1780-1849), quien, según Pasteur, escribió la ecuación $C_2H_5OH + O_2 = CH_3COOH + H_2O$ ⁴⁰.

Pasteur, partiendo de estos conocimientos, se dispuso a estudiar la "flor del vinagre" y en 1861 anunció a la AdS que se producía merced a la acción de un diminuto "vegetal" que pertenecía al grupo *Mycoderma*, Explicó así su investigación en la AdS⁴¹ al referirse a los métodos químicos existentes para fabricar vinagre "no hay nada más oscuro, nada más misterioso, que este antiguo proceso de elaboración del vinagre, que se deja enteramente en manos del empirismo y la rutina" y a continuación hipotetiza que había dos tipos de micodermos, el de la "flor del vino" (*Mycoderma vini* o *cerevisiae*) y el de la "flor del vinagre" (figura 3)⁴² al que le puso el "apellido" de *aceti*. Después, tras mencionar varios experimentos con resultados inconsistentes decía: "Al cultivar esta nueva especie, pura y sin mezclar, en la superficie de diver-

sos líquidos alcohólicos, identifiqué, esta vez, la presencia de la flor del vinagre...el alcohol se acetificaba siempre, con la formación de pequeñas cantidades de aldehído". Luego, para demostrar que eran especies distintas decía: "...repetamos las pruebas precedentes relativas a nuestros dos micodermos en dos vasos cerrados donde podamos depositar, además de líquido (líquido alcohólico) y la semilla de las plantas... un volumen determinado de aire...el micoderma del vinagre capta el oxígeno del aire y lo fija en el alcohol para rendir ácido acético mientras que el micoderma del vino toma igualmente el oxígeno del aire y lo fija igualmente en el alcohol pero para rendir vapor de agua y ácido carbónico"⁴³ Anuncia también que la flor del vinagre no actúa si se sumerge, y necesita ubicarse en la superficie del líquido.

Liebig seguía en sus treces y no aceptó, como ocurrió con las otras fermentaciones, los resultados de Pasteur, y en 1870 publicó una memoria sobre las fermentaciones en los *Annales de Chimie et de Physique* abundando en su teoría, criticando al tiempo los estudios de Pasteur. A raíz de dicho artículo, Pasteur se dirigió a la AdS y después de relatar sus descubrimientos intentó acabar con la polémica invitando a Liebig a realizar un experimento bajo la supervisión de los miembros de la AdS que él eligiera⁴⁴. Liebig no se dignó responder y en un viaje de Pasteur a Munich, Liebig

⁴³ Pasteur, 1862. Études sur les mycodermes. Rôle de ces plantes dans la fermentation acétique. *CRsAS*, 54, 265-270. (El texto en cursiva, traducción propia del original).

⁴⁴ Pasteur, L. 1857. *CRsAS* Note sur une Mémoire de M. Liebig, relatif aux fermentations *CRsAS*, T 73, 1419-1428.

³⁸ Bourgeois, J.F. y Barja, F. 2009. The history of vinegar and its acetification systems. *Archives des Sciences*, 62, 147-160.

³⁹ *Ibidem*.

⁴⁰ Pasteur L. 1868. Études sur le vinaigre, sa fabrication, ses maladies, moyens de les prévenir; nouvelles observations sur la conservation des vins par la chaleur, pág. 45. Gauthier-Villars & Victor Masson et fils, Paris.

⁴¹ Pasteur, 1862. Études sur les mycodermes. Rôle de ces plantes dans la fermentation acétique. *CRsAS*, 54, 265-270. (El texto en cursiva, traducción propia del original).

⁴² Pasteur L. 1868. Études sur le vinaigre, sa fabrication, ses maladies, moyens de les prévenir; nouvelles observations sur la conservation des vins par la chaleur, págs. 12 y 17. Gauthier-Villars & Victor Masson et fils, Paris.

le recibió de pie, no le ofreció asiento a su visitante y se negó a cualquier discusión alegando que no se encontraba bien.⁴⁵ En cualquier caso, Pasteur lo dejó muy claro en el apartado II de la 2ª parte de su libro publicado en 1868 *“Études sur le vinaigre”* que tituló *“Pas de mycoderme, pas d’acétification”*.

IV. Unas notas sobre la Pasteurización

Aunque el calor se ha utilizado desde los tiempos más remotos para cocinar y ampliar la vida útil de los alimentos, fue el clérigo italiano Spallanzani (1729-1799) quien intencionadamente estudió en 1768 la acción letal del calor al someter a ebullición un caldo de carne durante 60 minutos y sellar después el envase, observando que no se alteraba⁴⁶. Unos años después, hacia 1796, el confitero francés Appert (1749-1841) comenzó a ensayar la forma de conservar los alimentos y tuvo éxito al calentar en agua hirviendo durante varias horas productos (sopas, hortalizas, mermeladas, lácteos, carnes, etc.) incluidos en botellas de vidrio de boca ancha cerrados herméticamente y publicó un libro describiendo el proceso⁴⁷.

Pasteur debió conocer estos avances y los aplicó al vino, aunque a temperaturas menos agresivas. La tercera parte de su libro *Étude sur le vin*⁴⁸, titulada *“Nouveau procédé de conservation des vins”*, explica su trabajo. Comienza diciendo que *“las enfermedades del vino son correlativas de la multiplicación de vegetaciones parásitas...y que en su ausencia... el vino envejece sin alteración, si se somete lenta y progresivamente a la acción del oxígeno del aire”*. Tras hacer luego un breve recorrido histórico de la alteración y mencionar los métodos empíricos ideados para controlar la

alteración y afirmar su falta de eficacia, manifiesta *“Todo el problema se reduce a evitar el desarrollo de los parásitos”* Indica que ha ensayado varias sustancias sin mucho éxito y finalmente dice *“Para destruir la vitalidad de los gérmenes del vino basta con someterlo durante unos instantes a la temperatura de 50 o 60 (grados) y he observado, además, que el vino no se altera nunca aplicando esta operación previa”*. La AdS organizó una comisión para comprobar la eficacia del tratamiento térmico que aplicaron a dos docenas de vinos a temperaturas comprendidas entre 50 y 75 grados. La Comisión concluyó: *“... esta operación previene sobre todo las enfermedades que causan la alteración de los vinos e incluso pueden atajarla”*. No obstante, apunta alguna crítica sobre las notas de la degustación. Finalmente, la AdS remató: *“(el método) parece práctico para su aplicación a vinos embotellados, ya que no es muy costoso, y lo sería aún más si se aplicara a cantidades mayores”*. Realmente, el método no fue muy utilizado en la práctica, probablemente porque se aplicaría a vinos en estado avanzado de alteración o, quizás, debido a la “nebulosa” y “secretismo” que siempre ha existido en el entorno vitivinícola. Sin embargo, había nacido lo que más tarde, en honor a Pasteur, se denominó “pasteurización”.

Este apartado quedaría incompleto si no se hiciera alguna referencia al autoclave, ya que su invención corrió a cargo de Chamberland (1851-1908), discípulo y colaborador de Pasteur. Chamberland ingresó en la ENS, como asistente de Pasteur pero con el tiempo se convirtió en uno de sus más cercanos colaboradores. En 1879 defendió su tesis doctoral titulada *“Recherches sur l’origine et le développement des organismes microscopiques”*; esta investigación fue el punto de partida de sus trabajos sobre la esterilización, que le llevaron a diseñar una estufa a presión para esterilizar medios de cultivo, el autoclave. Repárese la importancia del autoclave en laboratorios, clínicas, hospitales etc. y en el sector alimentario en la industria conservera.

IV. Corolario

Pasteur, el científico que de químico transmutó en microbiólogo. Difícilmente pueden unos pocos párrafos relatar los múltiples avances que Pasteur aportó a la Ciencia. Puede decirse que fue un científico que estudió fenómenos que se creía se conocían perfectamente en su época, pero

sus perspicaces investigaciones demostraron que eran erróneos. Así, además de descubrir la quiralidad de sustancias químicas, demostró que la fermentación es un fenómeno químico esencialmente subordinado a unos entes microscópicos vitales, en sus palabras *“infusoires”* y varias especies de *“mycodermas”*. *“Voilà comment le savant que s’est occupé de cristallographie, de physique et de chimie entre dans le domaine de la physiologie. Voilà comment il aborde aujourd’hui la question si controversée de générations spontanées avec le concours de sciences mathématiques, physiques et chimiques, et comment des expériences précises jettent déjà une si vive lumière sur différents points de l’histoire des corps vivants.”* Es así como se expresaba el portavoz Chvereul (1786-1889) en su informe sobre Pasteur, cuando ante los comisarios de la AdS le otorgaron en 1861 el premio Jecker⁴⁹

Sirvan estas páginas para honrar la memoria de un Científico, con mayúscula, quien, movido por su curiosidad, una virtud que cualquier investigador debería cultivar con mimo, ponía en duda certezas consuetudinarias, diseñaba experimentos para demostrar sus hipótesis y, finalmente, obtuvo resultados que sentaron las bases de la microbiología moderna. Gracias, Pasteur.

⁴⁵ Zarka, Y. Une fermentation en cache une autre <https://www.meer.com/fr/66089-une-fermentation-en-cache-une-autre> (consultado 14/03/2023).

⁴⁶ Pasteurization. <https://en.wikipedia.org/wiki/Pasteurization#History> (consultado 20/03/2023).

⁴⁷ Appert, N. 1810. L’art de conserver, pendant plusieurs années, toutes les substances animales et végétales. Chez Patris et Cie. Paris.

⁴⁸ Pasteur, L. 1866, Étude sur le vin. Ses maladies, causes que les provoquent. Procédés nouveaux pour le conserver et pour le vieillir, 3ª parte. Victor Masson et Fils. Paris. (El texto en cursiva, traducción propia del original).

⁴⁹ Rapport sur le Prix Jecker, année 1861. La Section de Chimie, à l’unanimité, décerne le prix Jecker, pour l’année 1861, à M. Pasteur. CRsAS, T 73, 1419-1428.