

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS
EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

DISCURSO

LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN

POR EL

EXCMO. SR. D. JUAN MARCILLA ARRAZOLA

Y

CONTESTACION

DEL

EXCMO. SR. D. JOSÉ M.º ALBAREDA Y HERRERA

EL DÍA 16 DE MAYO DE 1945



MADRID
DOMICILIO DE LA CORPORACION, VALVERDE, 22
Teléfono 12529

1945

LA FERMENTACIÓN CÍTRICA

DISCURSO

DEL

EXCMO. SR. D. JUAN MARCILLA ARRAZOLA

EXCELENTISIMO SEÑOR,

SEÑORES ACADEMICOS, SEÑORAS Y SEÑORES:

Es costumbre, plenamente justificada, que los académicos electos, en el acto solemne de su recepción, inicien sus discursos con palabras de gratitud a la Academia que les honró al otorgarles una de sus preciadas medallas. En este caso, la costumbre es grata e inexcusable obligación y desearía que mis palabras de gratitud fueran pocas, pero que, sin artificios oratorios, os hicieran conocer la íntima sinceridad de mis sentimientos.

Ni siquiera en la época de juventud, en la que toda noble ambición es plausible, me permití forjarme la ilusión de que mis tareas científicas llegarían algún día a merecer ser premiadas con el máximo honor de figurar como académico de número entre vosotros. Mucho menos podía pensar en ello ahora, cuando los años y las penas han trabajado mi carácter, logrando que, en las cosas terrenas, mire más hacia el pasado que hacia el porvenir y conozca el escaso valor de lo conseguido en mi labor investigadora, en relación con lo que me propuse y con lo que emprendí. Vocación definida para los estudios bioquímicos y microbiológicos y perseverancia en esta vocación: he ahí los únicos méritos que, sin necia vanidad ni falsa modestia, puedo reconocerme.

Escasos méritos, ciertamente, y aun más si se considera que mi vocación halló apoyo al encontrar temas de aplicación a mis actividades profesionales, satisfacción en la acuciante aspiración de buscar la verdad, en la medida en que es posible a los humanos,

y confirmación diaria a mi fe, al proporcionarme ocasión de meditar en la complejidad de la vida de los más pequeños seres vivos, en la que se refleja el orden y la grandiosidad de la obra divina con evidencia sólo comparable a la que nos ofrece la inmensidad de los espacios estelares.

Es lógico que, como compensación a la escasez de mis méritos científicos, ofrezca a esta Real Academia la voluntad de proseguir con renovado afán mi modesta labor.

Acrescen la responsabilidad que hoy contraigo y, al mismo tiempo, hacen más estimable el alto honor recibido, el hecho de suceder en la medalla número 2 al R. P. Luis María Unamuno e Irigoyen, O. S. A. (q. s. g. h.), y el recuerdo de otro académico fallecido, compañero y maestro del que os habla, el ingeniero agrónomo D. Mariano Fernández Cortés, inolvidable para mí por tantos motivos científicos y afectivos.

La labor del R. P. Unamuno fué ingente y ejemplar. Labor callada, eficaz, alejada de vanidosas exhibiciones, plena de seriedad y de honradez científica, comenzada gracias a una voluntad y a una vocación decididas y continuada sin desmayos, en orientación rectilínea. El P. Unamuno consagró su vida al servicio de Dios y de España, y su actividad intelectual, al conocimiento de la Microflora micológica española, desde el primer trabajo que conocemos, «Contribución al estudio de la Flora micológica de la provincia de Oviedo» —Congreso de la Asociación para el Progreso de las Ciencias, Bilbao, 1919—, hasta los muy numerosos que vieron la luz en los años 1940 al 43.

Las dos obras del P. Unamuno, premiadas por esta Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, tituladas, «Enumeración y distribución geográfica de los esferopsidales de la Península Ibérica e Islas Baleares.—Familia esferioidáceos» (1933) y «Enumeración y distribución geográfica de los ascomicetos de la Península Ibérica e Islas Baleares» (1941), son los trabajos más conocidos por los no especialistas, por tratarse de obras de conjunto; pero son también valiosísimos los muy numerosos artículos publicados en el *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural* y en otras revistas científicas, integrando una magnífica aportación, continuadora de la del ilustre micólogo Dr. González Fragoso, que fué el que supo transmitir al P. Unamuno la entusiasta afición al estudio de los hongos.

Recientemente han sido publicados esbozos biográficos del Padre Unamuno, con notas bibliográficas de su labor científica y

no es ésta la ocasión de hacer un detenido examen crítico de esta labor, tarea, por otra parte, que excede en mucho a mi competencia en la sistemática micológica; pero no puedo dejar de recordar, como notas características de la vida de mi sabio antecesor en la medalla número 2 de esta Real Academia, las modalidades de su formación científica en el campo de la investigación, simultaneando con sacrificio la iniciación de sus trabajos de investigación con sus deberes religiosos y con las tareas de enseñanza en los Colegios Agustinos de Tapia y Llanes, la sencillez de su trato y el don de transmitir sus conocimientos a cuantos, honrándonos con su amistad, le consultábamos con frecuencia.

Decaído en sus fuerzas físicas por las penalidades sufridas durante los años de la dominación roja en Madrid, pero en plena integridad de voluntad y posibilidades, reanudó el P. Unamuno su labor en el año 1939, y nunca fué más fructífero su trabajo. Trabajando le encontró la muerte, que seguramente no le sorprendió, porque no suele sorprender a los hombres de vida tan ejemplar como la suya.

* * *

Antes de entrar en el tema de mi disertación —«La fermentación cítrica»— creo preciso explicar brevemente las razones que me llevaron a preferirlo a otros más amplios, que, por ello, pudieran parecer más adecuados para una sesión solemne y plenaria. El tema elegido es continuación del que desarrolló magistralmente el Reverendo P. Unamuno en el acto de su recepción en esta Real Academia; desglosa, para detallarla, una de las actividades bioquímicas de los hongos microscópicos susceptibles de aplicación práctica a la industria, y esta aplicación puede redundar en servicio de la economía española. La fermentación cítrica es, todavía, una de las más imperfectamente conocidas en su mecanismo íntimo, no obstante los numerosísimos trabajos de que ha sido y es objeto; ninguna de las hipótesis con que se pretende explicar la transformación de los azúcares en ácido cítrico ha logrado plena confirmación experimental; no se ha podido provocar esta fermentación en segura ausencia de células vivas, y las variaciones de rendimiento son enormes, no sólo en razón de la influencia de factores conocidos, relativos a la composición química y constitución físicoquímica de los medios de cultivo, sino también como consecuencia de variantes de raza o estirpe de los hongos y de las condiciones en

que anteriormente prosperaron. Así, la fermentación cítrica es un maravilloso ejemplo de facultad sólo en parte hereditaria, y, al parecer, no adquirible por habituación directa, sino por paso por medios de cultivo, cuyo modo de acción sobre las conidias, para activar la acumulación de ácido cítrico por los micelios que de ellas proceden, es hasta hoy desconocido.

No son pocos los autores que opinan que las dificultades para la interpretación química de los fenómenos que dan origen al ácido cítrico, por vía micológica, derivan del hecho de que el citado ácido no parece ser un producto normal de las actividades de ciertos hongos, sino, más bien, de la deformación de las mismas por ciertos estímulos desfavorables (escasez de nitrógeno, valores pequeños de pH, etc.). La hipótesis es verosímil, pero precisamente esa desviación de la normal fisiología celular aumenta el interés de su estudio, porque la ruptura, *provocada*, de la armonía de los fenómenos biológicos, constituye una magnífica técnica para intentar desentrañar la complicadísima trama de éstas.

Por último, el conocimiento profundo de la fermentación cítrica tendrá como consecuencia el más perfecto de la bioquímica de ciertas funciones fisiológicas de los seres superiores, porque sabemos que el ácido cítrico es producido por células de tejidos animales y vegetales de muy alta complejidad estructural. El hecho tiene precedentes: la fermentación alcohólica, de la que son agentes causales hongos unicelulares (las levaduras), ha servido de base para edificar buena parte de la Bioquímica, no sólo en lo que a fermentaciones se refiere, sino también en campos muy alejados de la Microbiología.

El tema que me atrevo a abordar ofrece, por tanto, un interés más general de lo que a primera vista pudiera creerse.

* * *

En 1893, Wehmer publica los primeros trabajos acerca de la producción de ácido cítrico (a partir de los azúcares) por algunos hongos filamentosos, muy análogos a los *Penicillium*, a los que, por esta propiedad, incluye en un género diferente, *Citromyces*, aunque poco más tarde la reconoce también en *Penicillium luteum* y *Mucor piriformis*, cuya actividad fermentativa cítrica es muy débil.

El mismo Wehmer, en el clásico «Handbuch der Technische Mikologie», de Lafar, insiste en estimar, como característica fun-

damental y distintiva de los hongos pertenecientes al género *Citromyces*, la de producir cantidades notables de ácido cítrico. Algunas especies de otros géneros producirían sólo trazas, y el *Aspergillus niger* sería típico agente de una fermentación oxálica. Esta definición bioquímica del género *Citromyces* perdura a través de los trabajos de Mazé y Perrier, de Buchner y Wustenfeld, en 1909, y en los de la misma época y posteriores del propio Wehmer, hasta que, en 1913, Zahorski halla mucho ácido cítrico en cultivos de *Aspergillus niger* y, más tarde, Thom y Currie publican trabajos que confirman plenamente la gran actividad de muchas razas de este último hongo para la fermentación cítrica.

Sucesivamente, Buktewischs, Falck y Van Beyma, Tamiya e Hida, Schaposchnikov y Manteufel, Sumiki y otros, demuestran las posibilidades de producción de cítrico por otras especies de *Aspergillus* y por ciertos *Penicillium*; pero se reconoce al grupo del *Aspergillus niger* como el que posee las razas en las que es posible encontrar los más enérgicos agentes de la producción del citado ácido. Pronto se dan cuenta los investigadores de que la fermentación cítrica no es propiedad fisiológica ligada a la especie, sino, dentro de ella, a la estirpe o raza, y que descendencias muy emparentadas botánicamente manifiestan grandes diferencias en esta actividad bioquímica, sin que tales diferencias se acusen con certeza en la intensidad de la coloración de las conidias, ni sean siempre estrictamente correlativas con otras características fisiológicas, tales como la tolerancia a las más altas acideces reales de los medios de cultivo, principales señales indiciarias propuestas para la elección de las especies y razas de *Aspergillus* más activos en la fermentación cítrica.

Muy pronto también, en los trabajos de Wehmer publicados en 1906, aparece la noción de la variabilidad del poder fermentativo en la descendencia de una raza de hongo, alguna vez unida a síntomas de degeneración morfológica, pero otras veces sin variantes acusadas ni en el micelio ni en las hifas fértiles. «Degeneraciones fisiológicas», origen de grandes dificultades para la experimentación comparativa y para las más recientes aplicaciones técnicas, industriales, del proceso. Degeneraciones de causa oscura, que no pueden ser consideradas como mutaciones, porque son casi siempre reproducibles en cultivos en serie sobre ciertos medios y regenerables por cultivos, también en serie, sobre otros substratos.

En la literatura relativamente antigua encontramos noticias de muchos tanteos de regeneración de hongos que perdieron o vieron

disminuída en gran proporción la facultad de producir ácido cítrico; pero los resultados son contradictorios, y sólo son relativamente eficaces el método de conservar los cultivos a baja temperatura después de la maduración de las conidias y el de separar éstas prontamente de los velos miceliars.

En 1940 comencé a realizar algunos trabajos sobre la fermentación cítrica, y en 1941 tuve la fortuna de poder continuarlos, en la Sección de Fermentaciones del Instituto Cajal, con mayores medios materiales y, lo que vale más, con la colaboración de los profesores y auxiliares de dicha Sección. A todos ellos, y en especial a los primeros, debe ser atribuída una gran parte de la labor realizada en éste y en otros temas de investigación, y así me complazco en reconocerlo.

Pronto logré una descendencia de *Aspergillus niger*, la número 3-Instituto Cajal, que a la característica de no producir ni trazas de ácidos oxálico y glucónico (en cultivos en líquidos fuertemente ácidos), une la de ser bastante activa para la fermentación cítrica. La tolerancia del *Aspergillus*, raza número 3, a las altas concentraciones de iones de hidrógeno es muy elevada, y crece bien, sin formar conidias, en medios con $\text{pH} = 1,7$.

Cuando se cultiva el *Aspergillus niger* número 3 sobre medios con pH igual o superior a 2,0, la formación de hifas fértiles va siendo progresivamente más rápida y lujuriente, y correlativamente disminuyen las proporciones de ácido cítrico acumulado. Cuando el pH del substrato es = 7,0, la formación de ácido oxálico predomina.

Hechos absolutamente análogos fueron muchas veces registrados (para otras razas de *Aspergillus*) por diversos investigadores, y de modo especial por Frey, en un conocido y fundamental trabajo publicado en *Archiv für Mikrobiologie* (Segundo tomo, página 272, 1931).

Pero también, pasados pocos meses, pudimos observar la degeneración fisiológica de nuestra estirpe de *Aspergillus*. Al principio lográbamos muchas veces rendimientos superiores a 40 gramos de ácido cítrico por cada 100 gramos de azúcar consumida; después, los rendimientos fueron descendiendo hasta rebasar por excepción el 10 por 100 del azúcar gastada.

En aquellas fechas (1940-1942), las dificultades de intercambio de documentación científica con países extranjeros, consecuencia de la sucesión de la guerra actual, inmediatamente después de la de nuestra liberación, fueron causa de que tuviéramos que atener-

nos a lo publicado hasta 1936 y, por tanto, a los métodos de regeneración que han sido citados anteriormente.

Fracasamos en cultivos sobre rajitas de limón, aciduladas o no con ácidos clorhídrico, sulfúrico y cítrico, sobre caldo de judías verdes, análogamente acidificado..., etc., y no bastaron a detener la degeneración las precauciones relativas a la técnica de recolección y conservación de las esporas.

En nuestros tanteos logramos, por el contrario, relativo éxito reiterando los cultivos sobre un medio solidificable; el agar de mosto de uva, peptonado al 1 ó al 2 por 1.000. En este medio no conseguimos más que una parcial regeneración de la facultad fermentativa, cítrica, del hongo, pero estabilizamos esta facultad de una manera que podemos considerar definitiva, ya que se ha confirmado sin excepción durante tres años en más de 30 series de ensayos. Cuando nos fué posible volver a establecer el intercambio científico con las naciones neutrales y con algunas de las beligerantes en el actual y tremendo conflicto bélico, nos informamos de técnicas para nosotros nuevas, y entre ellas nos ha dado excelente resultado la debida a Chrzaszcz y Zakomorny, fundada en la reiterada siembra de las conidias de *Aspergillus niger* en agua de malta, a la que se adiciona el 1 ó el 2 por 100 de peptona. Al tercer pase por este medio de cultivo advertimos una sensible regeneración de la facultad acumulativa de ácido cítrico en el líquido Starck, que aceptamos como medio de cultivo «standard» para la fermentación (1).

Continuando la regeneración del *Aspergillus niger* núm. 3 (en cultivos sobre malta peptonada) la estabilizamos conservando los

(1) Preparamos el líquido Starck, según la siguiente fórmula:

Sacarosa	10 a 20 gramos
Nitrato amónico	0,2 »
Fosfato monopotásico	0,1 »
Sulfato magnésico cristalizado	0,02 »
Agua destilada hasta completar 100 cc.	

Ajustamos el pH a valores comprendidos entre 1,7 y 1,8.

En alguna experiencia utilizamos el ácido clorhídrico en sustitución del sulfúrico para el ajuste de la concentración de hidrogeniones, sin sensible variación de los resultados. Para poder comparar éstos en series de ensayos, es indispensable utilizar en ellos vasos de la misma clase de vidrio. En muchas experiencias hemos usado matraces cónicos de vidrio Jena y, en otras, frascos cilíndricos de boca ancha, de vidrio nacional, tan neutro como nos fué posible hallarlo en el comercio. Las impurezas del agua destilada y de los productos químicos pueden jugar un papel importante y es aconsejable emplear los más puros y en todo caso siempre procedentes de la misma firma y de idéntica calidad.

cultivos, esporificados, sobre agar-malta o agar-mosto peptonado, a temperatura próxima a 0°. Con este proceso logramos, como Chrzaszcz y Zakomorny, resultados cada vez más halagüeños, y nos falta poco para restituir a nuestro *Aspergillus* las más altas actividades de acumulación de ácido cítrico que registramos en las experiencias iniciales con cultivo de la estirpe salvaje, recién aislada del medio natural (rajas de limón contaminadas por el aire). Pero, si para la técnica de la fermentación cítrica es importante lo conseguido, nadie, que sepamos, ha investigado acerca de la cuestión fundamental de hallar las causas íntimas de los desconcertantes fenómenos de degeneración y regeneración fisiológica que ocupan hoy nuestra atención y son objeto de nuestro estudio. En todo caso, las hipótesis de trabajo que nos atrevemos a formular en vista de algunos resultados de nuestras investigaciones, necesitan la exposición previa de aquellas con que se ha pretendido explicar el mecanismo de la fermentación cítrica. Sería fatigoso enumerarlas todas; pero es interesante examinar las que representan mejor las diversas tendencias y están más de acuerdo con hechos experimentales, entre los cuales pueden hoy considerarse como plenamente confirmados los siguientes:

1.º La fermentación cítrica es un fenómeno que se realiza sólo en oxibiosis. En cultivos en condiciones de anaerobiosis no hay formación de ácido cítrico y correlativamente al descenso de la presión de oxígeno por debajo de un cierto límite, disminuye hasta anularse la proporción de cítrico.

2.º Los preparados enzimáticos obtenidos por los métodos usuales, a partir de los micelios (deshidratación por la acetona y acetona-éter; desecación rápida, al vacío, a temperatura moderada; autolizados por xilol, toluol, etc.; jugos de maceración de los micelios secos; agua de lavado de micelios frescos, en ayuno, etc.) no se han mostrado capaces de producir la menor cantidad de ácido cítrico en líquidos azucarados. Simola y Alapeuso logran hacer producir ácido cítrico, en proporciones de décimas de miligramos, a micelios de *Aspergillus niger*, finamente molidos, macerándolos durante dos a veinticuatro horas en soluciones de sustancias ternarias (ácido málico, ácido pirúvico, mezcla de ambos ácidos, ácido acético y mezcla de ácidos acético y málico), con un 0.5 por 100 de bicarbonato sódico. El hecho es interesante; pero, a mi juicio, no permite conclusiones definitivamente favorables a la posibilidad de producir fermentaciones cítricas en ausencia de células vivas, por-

que ni es improbable que, después del molido, queden porciones íntegras de las hifas miceliales, ni los métodos de análisis son seguramente probantes para tan minúsculas concentraciones de ácido cítrico, en líquidos de composición tan compleja como los que resultan de las experiencias descritas. Claro es que de ningún modo puede deducirse de lo expuesto que la fermentación cítrica se realice sin intervención de enzimas, y sí sólo que algunos de ellos se hallan tan ligados a la estructura de la célula que no sabemos, hasta el día, separarlos sin destruirlos, lo que no es ciertamente excepcional en el campo de los enzimas oxidantes que podríamos llamar «respiratorios», y ocurre, por ejemplo, para los citocromos *a* y *b*, que aun no han podido ser extraídos de las células en las cuales el estudio espectroscópico demuestra su presencia.

3.° El ácido cítrico es consumido por el hongo, y la cantidad que encontramos, en cada momento, en los líquidos de cultivo es la que resulta como diferencia entre el ácido producido y el gastado. Por eso hemos hablado antes de la facultad de *acumular* ácido cítrico y no solamente de la de *producir* dicho ácido.

4.° En un gran número de investigaciones, comprobadas por nosotros con la estirpe número 3 de *Aspergillus niger*, se ha podido demostrar que el aumento de concentración de las sales nitrogenadas (casi siempre nitrato amónico) en los medios de cultivo, origina una notable disminución de la acumulación de ácido cítrico, hasta anularla, si la proporción de nitrato es elevada.

5.° Para los *Aspergillus niger*, las mayores cantidades de cítrico se hallan en cultivos sobre medios de *pH* bajo (1,7 - 2,0). Para cada especie y raza de hongo productor de cítrico la cifra de *pH* óptimo varía, pero es general la tendencia favorable a la acumulación de ácido cítrico en medios en los que es alta la concentración de iones de hidrógeno.

6.° Knoop y Martius logran sintetizar el ácido cítrico por vía química, no biológica, partiendo de los ácidos succínico y oxalacético; y

7.° Mediante síntesis bioquímicas, se ha llegado a obtener ácido cítrico en diversos productos y tejidos animales después de la adición simultánea de los ácidos succínico y oxalacético o málico, o del primero y ácido fumárico; en papilla de cerebro adicionada de ácido oxálico o de ácido succínico; en orina, a la que se añaden diversos ácidos orgánicos, y, finalmente, haciendo actuar micelios

integros de *Aspergillus niger* sobre medios en los que las sustancias carbonadas son; el ácido málico, el oxalacético y el pirúvico, aisladamente, o en mezclas binarias málico y pirúvico, pirúvico y oxalacético y málico y acético. (Investigaciones de Hallman, Simola y Alapeuso, Krusius y Kosunen.)

La producción de ácido cítrico por micelio de hongos filamentosos cultivados sobre líquidos con ácido acético, ácido málico o mezcla de ambos, en presencia o en ausencia de glucosa, ha sido especialmente estudiada por Chrzasz, Tiukow y Zakomorny. Los rendimientos son mayores en presencia de la glucosa y también cuando se utiliza el acetato de calcio, en lugar del potásico o el sódico, lo que introduce una nueva complicación en el problema, al demostrar influencia (posiblemente indirecta, pero efectiva) de ciertos cationes, algunos de ellos seguramente biogénicos.

En un cierto número de hipótesis, las más antiguas, acerca del mecanismo de la fermentación cítrica no se tiene en cuenta la posibilidad de la formación de cítrico por síntesis de productos ternarios con cadenas en C_2 y C_3 , que sólo fué demostrada en época posterior a aquella en que fueron formuladas las hipótesis a que nos referimos, pero como en ellas existen elementos de juicio que son todavía aprovechables, no debemos silenciarlas, en absoluto.

Mazé y Perrier creen que la fermentación cítrica se inicia con una fermentación alcohólica que llega a sus productos finales, gas carbónico y alcohol; el último sería oxidado, como alimento energético, e integrado en los plasmas, como alimento plástico, pero cuando en los medios de cultivo escasea o falta el nitrógeno necesario para la formación de los compuestos cuaternarios indispensables a las nuevas hifas, las más viejas son autolizadas y uno de los productos de esta autólisis sería el ácido cítrico.

Los trabajos de Buchner y Wustenfeld contradicen formalmente la anterior hipótesis, porque en ellos no se logró obtener ácido cítrico en cultivos de hongos sobre líquidos con alcohol; pero, más tarde, Chrasz, Tiukow y Zakomorny, operando con micelios ya formados (segundos cultivos) sobre líquidos de graduación alcohólica no demasiado elevada, demuestran para varias especies de *Penicillium* la facultad de transformar el alcohol en ácidos orgánicos, entre ellos el cítrico.

Por el contrario, los hechos experimentales siguen oponiéndose a la hipótesis de Mazé y Perrier en lo que se refiere al origen próximo, por autólisis, del ácido cítrico. En infinidad de investigaciones

(entre ellas las nuestras) se ha confirmado la posibilidad de hacer producir ácido cítrico a los micelios más jóvenes, en los que no cabe admitir la existencia de fenómenos autolíticos. Es más, con el hongo regenerado la producción de ácido cítrico es muy grande en las primeras horas, en relación con el azúcar consumido.

De los fracasos en trabajos con preparados enzimáticos deduce Amelung que la producción del ácido cítrico depende de procesos metabólicos, íntimamente ligados con la vida de los hongos y no es ilógico relacionar esta hipótesis con la Kostytschew, la del mismo autor y Tschesnokov y la de Schober.

El primero de los citados investigadores supone que el ácido cítrico es un producto secundario (no un producto intermedio) en los procesos de síntesis de las proteínas de los hongos; el ácido cítrico sería un elemento «fracasado» en la síntesis de las proteínas («misslungener Baustein der Eiweisstoffe»). El mismo autor, con Kostytschew, añade que, si bien no puede dudarse que el ácido cítrico procede de los azúcares que se ofrecen a los hongos, no deriva de los procesos respiratorios, sino de la participación de dichos azúcares en los de índole plástica de síntesis de proteínas.

Los razonamientos con que tratan de apoyar su hipótesis no están siempre de acuerdo con hechos experimentales, observados por nosotros, y menos justificada aún parece la hipótesis de Schober que cree podría buscarse el origen del ácido cítrico en las desaminaciones de ciertos aminoácidos, fenómenos de metabolismo regresivo, que aproximan esta hipótesis a la más antigua de Mazé y Perrier.

Las hipótesis que suponen, por el contrario, que el ácido cítrico es un producto de la oxidación de los azúcares, intermedio en los procesos respiratorios, tienen su más típica representación en la de Butkewitsch que admite que el azúcar sería oxidado para formar, primero, ácido glucónico o ácido 2-cetoglucónico y después (por condensación intramolecular y rotura de cadena cíclica, por oxidación) ácido cítrico. En cierto modo, esta hipótesis no es muy diferente de las que admiten los procesos siguientes:

a) Azúcar \rightarrow Acido sacárico \rightarrow Acido 2-4 dicetoadípico \rightarrow
 \rightarrow Acido acético + Acido oxalacético \rightarrow Acido cítrico.

b) Azúcar \rightarrow Acido sacárico \rightarrow Acido 3-4 dicetoadípico, del que procedería el ácido cítrico por rotura análoga de la cadena, en cuerpos con 2 y 4 átomos de carbono y posterior resíntesis de los mismos.

Los apoyos experimentales para todas estas hipótesis (que pudiéramos llamar de mecanismos puramente deshidráticos) son muy escasos y aleatorios, pero en alguna de ellas encontramos ya, como origen próximo del ácido cítrico, la síntesis final de productos con cadenas en C_2 y C_4 , síntesis confirmada por los trabajos modernos.

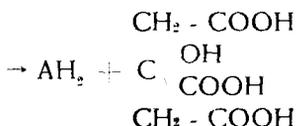
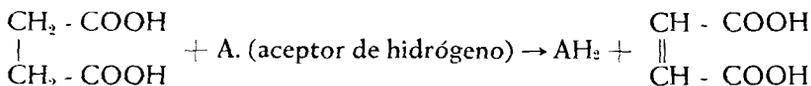
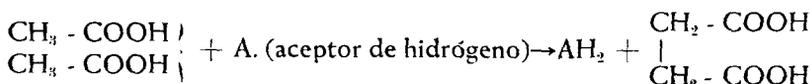
Son extraordinariamente interesantes las observaciones de Virtanen y de Chrasz y Tiukow acerca de la relación entre el metabolismo de los compuestos nitrogenados y la producción y demolición del ácido cítrico. Virtanen afirma que los ácidos fumárico y cítrico son piezas para la síntesis de los aminoácidos en la bioquímica de las plantas superiores y que precisamente en los tejidos en que se hace menos intensa (o cesa) la síntesis de las albúminas es en los que se acumulan los ácidos fumárico y succínico, málico y cítrico.

Del hecho de que la provisión de aminoácidos, lejos de hacer disminuir, favorezca la acumulación de ácido cítrico, deducen Chrasz y Tiukow que esta acumulación no depende del metabolismo sintetizante de las proteínas; en otra comunicación demuestran la posibilidad de obtener, por vía biológica, ácido cítrico partiendo de peptonas, y relacionan este proceso con la formación de ácido acético en la demolición de las mismas.

Los mismos autores, en fecha anterior a la de los trabajos a que acabo de referirme, formularon una hipótesis que, aunque nos parece incompleta, no está en desacuerdo con ninguna observación experimental ni con la fecunda teoría de uniformidad de los mecanismos de demolición de la molécula de azúcar en los comienzos de los procesos fermentativos, aunque falte todavía bastante para considerar como suficientemente comprobadas todas y cada una de las reacciones que integran la citada hipótesis. Según ella, el mecanismo de la producción de ácido cítrico por los hongos (trabajan con un *Penicillium* de especie no determinada, al que designan *Penicillium X*) sería el siguiente: la molécula de azúcar sufre primero la demolición conforme al proceso de fermentación alcohólica, es decir, que es transformada, sucesivamente y previa fosforilización, en ácido pirúvico y, después, en aldehído acético.

Este último sería oxidado y daría origen al ácido acético, el cual, por la acción de deshidrasas, se transformaría, a su vez, en ácido succínico y éste en ácido fumárico. El último, por adición de una molécula de agua, pasaría a ácido málico levogiro y este ácido, con parte del ácido acético restante, darían, por síntesis, origen al ácido cítrico. Las reacciones serían, en resumen:

$C_6 H_{12} O_6 \rightarrow$ Excisión en cuerpos en C_3 , fosforilados \rightarrow Desfosforilización $\rightarrow 2.CH_3.CO - COOH \rightarrow 2 CO_2 + 2 CH_3 - CHO$



Los aceptores de hidrógeno pueden ser los mismos o diferentes y como uno de ellos actúa el oxígeno molecular.

El rendimiento teórico máximo de ácido cítrico resulta ser, según el anterior esquema, de dos moléculas de ácido por cada tres moléculas de hexosa, es decir de 71,1 por 100 en ácido cítrico anhidro y de 77,8 por 100 en ácido cítrico cristalizado, con una molécula de agua.

Partiendo de la sacarosa el rendimiento en cítrico cristalizado podría llegar, como máximo, al 81,8 por 100 (lo que equivale al 75 por 100 en ácido anhidro).

La primera parte de este esquema no ha sido plenamente demostrada, pero no le faltan totalmente apoyos experimentales, puesto que muchos hongos son capaces de producir, en anoxibiosis, fermentaciones alcohólicas, si bien no figuran entre los más activos, en este aspecto, los *Citromyces*, *Penicillium* y *Aspergillus*, mayores productores de ácido cítrico. En todo caso, como acertadamente apuntan Chrzascz y Tiukow, no es preciso, para dar por válida su hipótesis, suponer que el mecanismo inicial de la fermentación cítrica sea idéntico al de la fermentación alcohólica por levaduras, con tal de que en una y otra se llegue al aldehído acético, pieza clave de un gran número de procesos fermentativos.

Para la producción de ácidos succínicos y fumárico existen más pruebas experimentales. Buktewisch y Fedoroff los obtienen en cultivos de *Mucor Stolonifer* a partir de acetato cálcico, y en la fermentación fumárica parece que son productos intermedios el alcohol, el ácido acético y el ácido succínico. En cultivos de algunos *Penicillium* ha podido ser demostrada la presencia de los ácidos succínico, fumárico y málico y en lo que se refiere a la síntesis del ácido cítrico, partiendo de ácidos con dos y cuatro átomos de carbono, las pruebas son concluyentes y numerosas.

Pretendiendo completar la hipótesis que acabo de comentar, en consonancia con los hechos que observamos en nuestras experiencias, seguimos un camino bastante penoso, pero que esperamos sea fecundo.

En numerosas series de cultivos, en variadas condiciones, venimos determinando *diariamente* las proporciones de azúcar consumido y de ácido cítrico acumulado (como diferencia entre producción y consumo). Obtenemos de este modo gráficos que sugieren más ideas que las simples cifras de acumulación de cítrico en un plazo dado o de aquellas otras de la máxima producción, a veces registrada con una sencilla acidimetría global, dato seguramente insuficiente. En los gráficos se hace patente el aspecto completo de la resultante del proceso sintetizante y del de demolición del ácido.

Así, pronto pudimos advertir dos fenómenos que creemos muy interesantes :

1.º Entre los factores que influyen decisivamente en la acumulación de ácido cítrico en los cultivos sobre Starck, figura el potencial redox del líquido de cultivo.

2.º La regeneración del hongo parece determinar una notable disminución de la intensidad de la demolición del ácido cítrico, hasta el punto de que es *probable* que la producción de ácido no sea mucho más intensa con *Aspergillus* regenerado, estribando las diferencias de acumulación principalmente en las de consumo del ácido cítrico por el hongo.

La base experimental de nuestra primera afirmación se halla en el resultado de investigaciones diversas de Xandri (J. M.^a) y del que os habla.

La adición, al medio de cultivo, de un 1 por 1000 de carbón vegetal («Carbo lignis pulvis», de Merck) provoca una activación de la producción de ácido cítrico, reflejada en la disminución del número de días precisos para alcanzar la concentración máxima de ácido y en un ligero aumento de la misma, sin que pueda atribuirse

esta acción a la influencia de la mínima proporción de materias minerales añadidas (impurezas del negro vegetal) ya que las experiencias se llevan comparativamente con cultivos a los que se añadieron las cenizas de la misma proporción de carbón, ni tampoco a incremento del peso de los micelios, que si es sensiblemente mayor en los primeros cultivos con carbón, no presenta diferencia notable en los segundos cultivos; debe tratarse, por tanto, o de la acción de microfactores orgánicos, activantes, o de aumento del potencial redox del medio, merced a la introducción en el mismo de una proporción considerable de oxígeno, adsorbida por el carbón. De estas dos posibilidades parece más probable la última.

En efecto, pretendiendo orientarnos, en primera aproximación, acerca del poder oxidante o reductor de los substratos separados del micelio en cada uno de los días que dura el cultivo, hemos procedido en bastantes series de experiencias a determinar el tiempo de decoloración del 2-6 diclorofenolindofenol en tubo Thunberg (a 32° de temperatura, en vacío): con líquidos de cultivo del *Aspergillus niger* núm. 3, sólo parcialmente regenerado por reiteradas siembras y conservación en agar-mosto-peptonado al 2 por 1000,

la razón $\frac{\text{Acido cítrico acumulado}}{\text{Azúcar consumido}}$ fué máxima siempre (en cultivos con o sin carbón, con distintas concentraciones de azúcar, etcétera) cuando el tiempo de decoloración fué aproximadamente de 56 minutos, y la misma razón disminuyó mucho cuando la reducción del indicador de potenciales redox se realizaba en tiempos que, en más o en menos, diferían sensiblemente del antes citado.

Es evidente que los anteriores resultados no permiten todavía conclusiones terminantes, porque en los tiempos de decoloración del 2-6 diclorofenolindofenol influyen muchos factores y, sobre todo, porque no operamos en presencia de los micelios, lo que elimina la intervención de los complejos enzimáticos íntimamente unidos al contenido de las células, entre los que seguramente figuran algunos de los causantes de la fermentación cítrica; pero de todos modos nos parece que no debe de estar exenta de significación la apuntada coincidencia, tanto más cuanto que, siguiendo igual técnica con los substratos de cultivos de hongos regenerados por el método de Chrzasz y Tiukow, los resultados varían totalmente; los potenciales redox son mucho mayores, la decoloración del 2-6 diclorofenolindofenol no es nunca completa y los tiempos para llegar a idénticas decoloraciones parciales varían muy poco en los distintos días de cultivo, sin que se acuse correlación entre tiempos y acumulación de ácido cítrico.

Un hecho más parece confirmar la citada correlación (quizás no de causa a efecto, pero muy lógica) entre potenciales redox de los substratos y acumulación de cítrico en cada fase del cultivo. Genaro Alas estudia, en el Instituto Cajal, la síntesis biológica del ácido cítrico por *Aspergillus niger* núm. 3, en medios de baja cifra de p H y partiendo del ácido acético, del ácido l.málico y de mezclas de ambos ácidos, como sustancias ternarias en ausencia de azúcares; los rendimientos son mínimos o nulos, pero en una experiencia añade un reductor orgánico no tóxico, la hidroquinona, y logra producción sensible de ácido cítrico. Aunque la experiencia ha de ser reiterada y completada con otras investigaciones, actualmente en curso, no parece que la hidroquinona deba influir de otro modo que como donador de hidrógeno.

No son, por el contrario, nada demostrativos nuestros ensayos de a.ición conjunta de diferentes proporciones de cloruro ferroso y férrico, conservando constante la concentración global de hierro. Durante el cultivo y desde las primeras horas (se trata de segundos cultivos bajo micelio anteriormente desarrollado) la casi totalidad de los iones férricos es reducida y sólo al cabo de 10 o 12 días una parte de iones ferrosos pasan a férricos, cuando casi todo el azúcar ha sido consumido; las concentraciones en ácido cítrico en los distintos días de cultivo dan cifras erráticas y curvas irregulares y sólo parece advertirse alguna mayor acumulación de este ácido en las series en las

que la relación $\frac{Fe^{+++}}{Fe^{++}}$ fué inicialmente próxima a 2. Es posible que los compuestos de hierro influyan en la fisiología del hongo de modo complejo y no sólo modificando los potenciales redox del medio de cultivo, lo que explicaría los desconcertantes resultados obtenidos.

Nuestra segunda deducción, relativa a la causa de la mayor acumulación de ácido cítrico en los cultivos con hongo «regenerado», se funda también en el examen comparativo de los gráficos de fermentación con hongo, antes y después de pases sucesivos (no menos de tres) por malta fuertemente peptonada.

Las diferencias son enormes. Con el hongo «degenerado» la concentración de ácido cítrico, por unidad de peso de azúcar consumido, es muy pequeña en los dos primeros días, crece luego hasta un máximo que se registra hacia el 6.º día para los cultivos sin carbón, y en el 4.º (aproximadamente) cuando se ha añadido el 1 por 1.000 de carbón vegetal, y después decrece muy aprisa, más rápidamente en los cultivos con carbón. Por el contrario, cultivando el hongo

«regenerado» y, de modo más acusado (hasta hoy) cuanto mayor ha sido el número de pases previos por agua de malta, la razón

$\frac{\text{Ácido cítrico}}{\text{Azúcar gastado}}$ es bastante grande después de 24 horas, disminuye más tarde para volver a crecer desde el 4.º-5.º día de cultivo; alcanza el máximo entre los días 7.º y 9.º (máximo muy superior al logrado con hongo no regenerado) y vuelve a decrecer en días sucesivos, pero de un modo muy lento e irregular, hasta el punto de que en alguna serie registramos cifras muy altas (en cultivos sin carbón vegetal) en los días 11.º y 12.º, en los cuales, con hongo no regenerado, apenas se llega a rendimientos del 3 ó del 4 de ácido por ciento de sacarosa utilizada.

Ante estos hechos no nos parece improbable que la activación de la facultad de acumular ácido cítrico se deba a modificaciones del complejo dehidrásico contenido en las conidias, según que sean obtenidas en medio «regenerante» o «degenerante» y en este orden de ideas comenzamos a investigar:

1.º La actividad de demolición del ácido cítrico, en ausencia de azúcar y otras sustancias ternarias, por los micelios de hongo «degenerado» y «regenerado»;

2.º La presencia o ausencia y las actividades de los enzimas dehidrásicos y oxidantes (citocromo, peroxidasa, etc.) que pudieran estar contenidos en las conidias de *Aspergillus*, antes y después de regeneración; y

3.º La caracterización de lípidos que, en forma cristalina, se separan abundantemente en ciertos cultivos de *Aspergillus* núm. 3 sobre líquido Starck, en condiciones de amplia oxibiosis, y sobre medios a base de ácidos orgánicos (acético o málico).

Resumiendo, la hipótesis de Chrzaszcz y Tiukow, las observaciones de Virtanen y nuestros propios trabajos nos hacen aceptar el siguiente esquema, al que, por el momento, no se opone ningún hecho experimental, aunque ello no quiere decir que deba considerarse como definitivamente establecido:

1.ª Fase. Azúcar \rightarrow Procesos análogos a los iniciales de la fermentación alcohólica \rightarrow Aldehído acético + Gas carbónico.

2.ª Fase. Aldehído acético (+ dehidrasa) \rightarrow Acido acético

Acido acético + Acido acético

(+ dehidrasa) \rightarrow Acido succínico

Acido fumárico (+ hidrolasa) \rightarrow Acido L. málico.

3.^a Fase. Acido acético + Acido l. málico → Acido cítrico + Agua.

4.^a Fase. Acido cítrico $\begin{cases} \nearrow (+ \text{ dehidrasas u oxidasas}) \rightarrow \text{Gas} \\ \searrow \text{NH}_3 \text{ (sintetasas)} \rightarrow \text{Aminoácidos} \\ \rightarrow \text{Proteínas.} \end{cases}$

Evidentemente el esquema de la 4.^a Fase está muy resumido y no incluye más que el término inicial (o mejor dicho uno de los términos iniciales) y los finales. El proceso de demolición, por oxidación, del ácido cítrico, se realizará en reacciones acopladas, con productos intermedios, tales como los ácidos acetondicarbónico y fórmico, o el ácido aconítico, o el oxálico, que quizá se acumule, en ciertas condiciones de cultivo..., etc.; pero el examen de estos fenómenos rebasa el tema de este discurso.

En la anulación o, al menos, en la disminución de los fenómenos que se resumen en el esquema de esta 4.^a Fase, parece que podrá influirse con mayor eficacia que en los que integran las tres primeras. El efecto favorable de las menores o nulas concentraciones de sales amoniacales y el de la regulación de oxibiosis y de los rH₂ del medio, quedan explicados... provisionalmente.

De propósito, y para no abusar de vuestra excesivamente benévola atención, no me ocuparé de los glúcidos preferibles como materias primas para la fermentación cítrica (la sacarosa en primer término), ni de las exigencias de los *Aspergillus* para su nutrición mineral, ni de las temperaturas adecuadas ni, finalmente, del efecto favorable de la agitación y de la disminución hasta cierto límite del cociente;

$$\frac{\text{Volumen del líquido de cultivo}}{\text{Superficie libre}}$$

cuestiones bien conocidas por haber sido objeto de muchas investigaciones, que han pasado al libro, después de ser publicadas en revistas científicas.

Pero no quisiera terminar mi disertación sin abordar, aunque sólo sea de pasada, el tema de las aplicaciones industriales de la fermentación cítrica.

Hace años funcionaban en el extranjero muchas fábricas (la de Tirlemont, en Bélgica, y otras en Estados Unidos, Rusia, etc.), que trabajaron o siguen trabajando conforme a patentes cuyo detalle es poco o nada conocido. A España le interesa producir el ácido cítrico que

precisa para sus industrias de estampados, enológica, farmacéutica, de refresco y jarabes, para finalidades médicas y de laboratorio, para futuras aplicaciones a las industrias de resinas sintéticas partiendo de los ácidos citracónico e itacónico, pero jamás, que yo sepa, lo ha producido nuestra patria en cantidad importante y, por muchas razones, no conviene basar la fabricación exclusivamente en la materia prima jugo de limón. Es urgente disponer de procesos y patentes españolas para la fabricación de ácido cítrico por fermentación de caldos azucarados de escaso valor y de producción nacional, y con esta orientación hemos comenzado algunas investigaciones. Como materias primas utilizables ensayamos, de momento, no sólo las melazas, sino también los jugos de tubérculos de patata y *Asphodelus*, los de higos y también mostos de uva, para los cuales las utilizaciones que los estiman en razón única de su riqueza azucarada pueden ser un recurso que absorba excedentes de producción en años de bajos precios. Parece que sólo dos obstáculos serios habrán de ser superados en el trabajo industrial con alguno de los caldos citados y con otros naturales: la proporción demasiado alta de coloides hidrófilos y la también excesiva de compuestos nitrogenados «nocivos», que no será para la fermentación cítrica el mismo que en azucarería es designado abreviadamente con este nombre.

En lo que se refiere a la influencia de ciertas sustancias en dispersión coloidal, sobre los rendimientos de la fermentación cítrica, los trabajos de Jacobi y Schwartz parecen demostrar la especificidad de acción y la decisiva de las concentraciones para los coloides de oro, agar, albúmina, sílice, metilcelulosa, azufre y aceite de ricino sulfonado, citados en orden de mayor a menor actividad favorable a la acumulación de ácido cítrico; la dosis óptima para el agar sería la del 1 por 1.000, y a partir de ella todo aumento de concentración deprimiría la cosecha de cítrico hasta anularla.

En franca contradicción con los anteriores resultados se hallan los obtenidos en nuestras experiencias de adición de agar al líquido Starck en segundos cultivos de *Aspergillus niger*, raza núm. 3, del Instituto Cajal. La acción de pequeñas dosis de agar sobre el crecimiento de los micelios es enorme y, hasta la de 1 gramo por litro, creciente con la concentración, pero al mismo tiempo tales dosis, aun la mínima ensayada de 0,25 gramos de agar por litro de sustrato, ejerce una indudable acción deprimiente en las acumulaciones de ácido cítrico, quizá explicable, en parte, por la relativa anaerobiosis en que se encuentran las capas de líquido, debajo de micelios tan gruesos y consistentes como los que se forman en presencia de dis-

persiones de agar y también por el mayor consumo de azúcar que supone el citado y lujuriente crecimiento del hongo sobre tales substratos.

En todo caso, la explicación es incompleta y la acción deprimente de la fermentación cítrica debe tener, además, causas más fundamentales y definitivas.

Se comprende, por lo expuesto, que cada materia prima exigirá un estudio especial, pero en ningún caso la presencia o el exceso de coloides constituirá obstáculo insuperable y los métodos de desespumado, de adición de taninos o de taninos y colas, de ferrocianuro y sales férricas, de fosfatos y cal, etc., son recursos preciosos fácilmente aplicables a la industria.

Con alguno de ellos hemos obtenido ya resultados parciales, alentadores, en el trabajo con melazas.

Más tarde, y en ensayos semi-industriales, habrán de realizarse investigaciones encaminadas a obviar el inconveniente que supone, para el trabajo en gran escala, el cultivo del *Aspergillus* sobre líquidos, con muy amplia superficie libre. Pero unos y otros ensayos habrán de fundarse en el conocimiento, tan perfecto como sea posible, del mecanismo de la fermentación, y los técnicos habrán de contar con la primordial labor de los investigadores de ciencia pura.

Con el esfuerzo de unos y otros, España puede aspirar a librarse de las carencias de ácido cítrico, como la que actualmente sufrimos, y del desembolso de divisas que suponía la importación anual de unos 60.000 quintales métricos del citado ácido, cantidad que debe estimarse como mínima necesaria y no como tope de producción nacional, porque nuestra industria se encuentra, felizmente, en fase de reconstrucción superadora del pasado y puede llegar a ser exportadora del importante producto que nos ocupa, derivado, por fermentación, de los azúcares, sintetizados a su vez gracias a la energía fotoquímica que Dios nos concedió superabundante bajo los cielos españoles.

H. dicho.

ALGUNAS NOTAS BIBLIOGRAFICAS ACERCA DE LA FERMENTACION CITRICA (1)

- Amelung*.—Chem. Ztg. 54. — 118 (1930).
- Bernhauer*.—«Die Oxydativen Gärungen» — J. Springer (1932).
- Bernhauer*.—En Nord und Weidenhagen — «Ergebnisse der Enzymforschung» III Band. págs. 185 a 226 — Ak. Verlagsgesellschaft. — Leipzig (1934).
- Bernhauer*.—Biochem. Z. 154, 177 (1924); 172, 324 (1926); 197, 309 (1928); 197, 324 (1928).
- Bernhauer, Iglauer und Knobloch*.—Bioch. Z. 307, 293 — (1941).
- Bernhauer, Iglauer und Knobloch*.—Bioch. Z. 309, 151 — (1941).
- Bernhauer und Schön*.—Bioch Z. 202, 164 — (1928).
- Bernhauer, Siebenäuger und Tschinkel*.—Bioch. Z. 230, 466 (1931).
- Boas, (F.)*.—Berichte Deutsch Bot. Gessellsch. XXXVII, 63 — (1919).
- Bolcato, (V.) e Tono, (P.)*.—Enzymologia.—VII, 146 (1939).
- Butkewitsch, (V. S.)*.—Bioch. Z. — 136, 224, (1923); 142, 195 (1923); 154, 177 (1924). Jahrb wiss Bot. 64. 637 (1925) y en Third. Int. Congr. Microbiology — New York.—(1939).
- Challenger, Subramanian, Klein and Walter*.—Nature 121, 244, (1928).
- Chrzaszcz, Tiukow und Zakomorny*.—Bioch. Z. 250, 254 (1932).
- Chrzaszcz und Zakomorny*.—Bioch. Z. 285, 340 y 348, (1936) y 291, 312, (1937).
- Currie*.—J. of biol Chem 31. 15. (1917.)
- Effront*.—Centralblatt. f. Baet. II Abt., 73, 117 (1928).
- Fernbach*.—Patentes francesas, 266414, 266415.
- Fernbach, Yuill and Reventres & C.* Patente francesa 23248 519815.
- Fiala, (A.)*.—Z. Untersch, Lebensm. 82, 121 (1941).
- Frey, (A.)*.—Arch. f. Mikr. 2, 272, (1931).
- Fulmer and Werkman*.—«Chemical Action of Microorganisms» — Ch. C. Thomas.—Springfield Ill. (1930).
- Hallman y Hallman y Simola*.—Acta chim fenn 11. 21 y 23 (1938), 12. 11 (1939), y Science 90, 594, (1933).
- Hallman y Krusius*.—Acta phys. Scand. 2. Suplementos III y IV.
- Jacobi und Schwartz*.—Arch. f. Mikr. 10. 226 (1939).
- Johnson, Knight and Walker*.—Biochem. J. 31. 903. (1937).
- Kiesel*.—Ann. Inst. Pasteur — 27. 391, (1913).

(1) Comprenden tan sólo algunos de los trabajos consultados, directamente o por extensa referencia, y distan mucho de formar una bibliografía completa.

- Knobloch*.—*Bioch. Z.* 307, 28 — 284 (1941).
Knobloch und Mayer.—*Bioch. Z.* 307, 285 (1941).
Knobloch und Miksch.—*Bioch. Z.* 309, 90 (1941).
Knobloch und Sellmann.—*Bioch. Z.* 309, 145, (1941).
Knoop und Martius.—*Hoppe-Seylers Z.* 242 I, 204 (1936).
Kometiani.—*Z. anal. Chem.* 86, 362, (1931).
Kostytschew.—*Jahrb. wis. Bot.* 60, 628, (1931).—*Bot. Zbl.* 5, 146, (1924).
Marcilla, Alas y Xandri.—*Trab. Inst. Cajal. I (Secciones de Fisiología, Fermentaciones, Virus y Química Biológica) I,* (1943).
Marcilla.—*Trab. Inst. Cajal.* XXXII, 269, (1940).
Marcilla y Xandri.—*Trab. Inst. Cajal.* (En prensa.)
May and Herrick.—*Ind. and Eng. Chem.* 22, 1148, (1930).
Mazé.—*Bioch. Z.* 136, 224, (1923).
Mazé et Perrier.—*Ann. Inst. Pasteur,* 18, 553, (1904); *C. r. Acad. Sci.* 139, 311 (1904).
Molliard.—*C. r. Acad. Sci.* 163, 570 (1916). — 168, 360, (1919). — 169, 990 (1919). 170, 949, (1920).
Muller.—*Enzymologia.*—10, 40, (1941).
Paley.—*Arch. f. Mikr.*—7, 206, (1936).
Pucher, Shermann und Vickery.—*J. of Biol. Chem.* 113, 235 (1936).
Reichard.—En «Handbuch d. Lebensmittel Chemie» VII., pág. 341. J. Springer, Berlín (1938).
Rippel und Behr.—*Arch. f. Mikr.*—7, 315, (1926) y 7, 584, (1936).
Rippel und Wiangke.—*Arch. f. Mikr.* 12, 124, (1941).
Sauton.—*Arm. Inst. Pasteur.* 27, 328, (1913).
Schopfer.—*Arch. f. Mikr.* 11, 264, (1940).
Schwartz und Lang.—*Arch. f. Mikr.* 5, 387 (1934).
Simola und Alapeuso.—*Enzymologia IX,* 241, (1941).
Simola, Hallman y Alapeuso.—*Acta Chem. Fenn.,* 12, 10, (1939).
Simola, Krusius, Kosunen y Alapeuso.—*Acta chem. fenn.* 11, 18, (1938) y 11, 18, (1938).—*Ckand Arch. Phys.* 80, 375, (1938). *Acta med. Skand. Supplem.* 90, 300 (1938) *Hoppe Seylers Z.* 261, 209, (1939).
Steinberg.—*J. Agr. Res. (U. S.)* 64, 615 (1942).
Suther and Walker.—*Biochem. J.* 2, 317, (1932).
Thom and Currie.—*J. Agr. Res.* 7, 1, (1916).
Thomas.—*Enzymologia VII,* 231, (1940).
Tomlinson.—*New Phytologist.* 36, 418, (1937).
Virtanen.—*Acta chem. fenn.* 101, (1928). *Arch. f. Mikr.* 7, 488 (1936).
Virtanen y Pulkki.—*Ann. Akad. Sc. fenn.* 23, A, (1930).
Wehmer.—*Beitrage z. Kenntniss einh. Pilze.* Nr 1. Hannover (1893).—*Chem. Ztg.* 21, 381 y 1022 (1897).—33, 1281, (1909).—37, (1913) y en *Lafar «Handbuch des technische Mykologie»*.—Jena, (varias ediciones).
Went.—*Chem. Abstracts.* XIII, 1483, (1919).
Zahorski.—*U. S. Paten.* 1.066.358.—(1913).

Para datos acerca del desarrollo de la industria del ácido cítrico en diferentes países, ver *Die Chemische Industrie* diversas páginas, 1938.

CONTESTACIÓN

DEL

EXCMO. SR. D. JOSÉ M.^a ALBAREDA Y HERRERA

EXCELENTISIMO SEÑOR,
SEÑORES ACADEMICOS, SEÑORAS, SEÑORES:

Al ingresar en la Real Academia de Ciencias D. Juan Marcilla Arrazola, son muchos los valores y representaciones con que se enriquece nuestra corporación: Ingeniero, profesor de ingenieros, maestro en los medios más varios—entre cuidadas selecciones de alumnos y en ambientes rurales—, organizador de enseñanzas superiores y medias, investigador ajustado y preciso, estudioso firmísimo, coherente e infatigable...

La personalidad de D. Juan Marcilla no necesita presentaciones que la destaquen ni memorial de méritos que traten de probar la clara evidencia del acierto y la justicia con que la Real Academia le llamó a su seno. Marcilla es muy conocido en muy diversas esferas, y conocido no como una fácil información superficial, sino con aquella callada admiración cordial, mezcla de entendimiento y corazón, que se produce cuando el conocer se hace afecto y el afecto refluye en un mejor conocer, y el paso repetido de las cualidades personales por nuestra atención, da ese *re-conocimiento*, ese *re-conocer*, que no se elabora por simple empuje del talento, por potencia de trabajo, por cualquier condición dilatada pero unilateral, sino que es síntesis de una comprensión pluridimensional, integrada por la variedad de aspectos y reflejos en que se manifiesta la personalidad.

Marcilla es muy conocido y muy estimado, y para valorar la valía y pureza de esa estimación, podemos acudir a un reactivo múlt-

tiple y singular, simple para evitar que los períodos de su fabricación lo impurifiquen de convencionalismos difícilmente separables: podemos acudir al juicio de los escolares.

Para los alumnos actuales y antiguos, para todo el ya largo caudal—21 años—de las promociones adoctrinadas en su cátedra, Marcilla ya no profesor, sino compañero, es siempre D. Juan Cordial admiración ajena a exteriores acuñamientos y a convenidas exaltaciones, fluir estimativo a cuya hondura hay que buscar raíz.

La figura persistente, imborrable, de D. Juan, aparece ante sus alumnos, primero, con un fuerte pedestal de justicia. El cumplimiento de sus deberes de juez le ha llevado a producir muchas bajas, pero en la extensión de los desaprobados nunca se oyó a un quejoso. Prestigio de una rectitud sin quiebras desviantes ni vacilaciones ondulantes. Bondad serena, sostenida, sin refracciones al variar de medio. Exigencia firme y respetada que hace trabajar y valora el trabajo y lo muestra no sólo como camino de éxito a todos accesible, sino como deber social y profesional a todos requerido. La justicia tiene así no sólo inquebrantable diafanidad de teorema, sino calor de humanidad y de servicio, pasión y rectitud.

La justicia tiene que ser para todos y, desde luego, para sí mismo. Y así Marcilla es siempre ese profesor ejemplar, entregado, con la mente puesta en la enseñanza y en los alumnos; ese profesor que se pone al nivel de los alumnos para conducirles siendo el primero de la clase; el primero no sólo en el rango y en los conocimientos firmes, sino en la preocupación cotidiana de la labor de cada uno, en el trabajo, en la dedicación, en el cuidado diario, en el detalle pedagógico, en el estudio fuerte. Justicia para todos, comenzando por sí mismo. Pero en Marcilla más que la exigencia del profesor ejemplar, del estudioso que hace estudiar, se da el optimismo del trabajo que se propaga, que induce al trabajo, que anima y promueve la penetración con los alumnos, no por abundosa expansión verbal, por temperamentales galas dicharacheras, sino por la fuerza misma del trabajo, que es entretenimiento y vocación, fermentación que se propaga e incorpora a su dirección plasmadora.

«Somos más cultos que especializados», lamentaba, hace ya algunos años, Bermúdez Cañete, una víctima del furor rojo. Y cuando los alumnos de ingeniería agronómica han atravesado la amplitud de la enseñanza media, y la extensa preparación del ingreso y los primeros años generales de ingeniería, cuando al tercer año de carrera—más los de ingreso—llegan a Microbiología, Marcilla es el potente encaje biológico, el primer encauzamiento bioquímico de un caudal de estudioso desparramado sin prisa por áreas de generali-

zación. Y esta fuerza orientadora de Marcilla se debe no sólo a la naturaleza de la disciplina que enseña, sino a cómo la enseña, a su práctica de la docencia. La Ciencia en Marcilla Profesor no es una irrupción ni un asomo, es un cauce; no es un brillante «aquí estoy yo», sino una grata invitación a un «por aquí debéis transitar».

La obra docente de Marcilla no está confinada en los límites de la enseñanza superior, en la que ha forjado una dirección de trabajo, ha establecido una disciplina, sin que hasta nuestros días otros centros comenzasen a preocuparse en desarrollar esa inmensa zona de la Microbiología industrial, no patológica. (Han sido los recientes decretos de ordenación de las Facultades universitarias los que han creado cátedras de Microbiología en las Facultades de Farmacia y Ciencias.) Marcilla ha sido también el realizador de las enseñanzas de capataces enológicos, con un éxito paralelo a la sencillez, a la vital y callada eficacia, a la ausencia de burocráticas titulaciones con que estos cursos ejemplares y fecundos se han desarrollado.

Queramos o no, en este mundo de limitaciones estamos obligados a optar y a elegir, que es tomar esto renunciando a aquello. Y existe una dualidad entre la honda estrechez del trabajo y la abierta amplitud de la cultura. En esa dualidad, Marcilla, docente, prefiere el trabajo; le importa mucho menos que falle la memoria; le interesa hacer más que decir. Naturalmente, Marcilla profesor es un valiosísimo hombre de Laboratorio—¿qué puede ser, en Ciencias experimentales, un hombre no de Laboratorio?—pero esto no quiere decir nada que signifique compensación de una deficiencia del profesor expositor. Por el contrario, Marcilla explica con elegancia de expresión y precisión dialéctica, con jugosa amenidad, con naturalidad impresionante, cualidades que son fruto natural de la familiaridad científica. Explica muy bien porque esas materias que enseña han absorbido largamente su trabajo y su estudio. Vive lo que sabe y enseña lo que vive. Por eso enseña deleitando. Y esa es la raíz de su potencia docente, de su fuerza encauzadora, del afecto mismo de sus alumnos.

De esta plenitud del Profesor es fácil derivar otra zona de actividades académicas de Marcilla. Buscan los que enseñan idiomas despertar el interés psicológico, y ponen en la monotonía de los ejercicios, incentivos de amenidad o de utilidad próxima. También el laboratorio resultaría árido, como continua repetición de ejercicios y operaciones sin atisbar, al menos, en ellos una inmediata aplicación práctica o una alineación experimental capaz de franquear la entrada en el campo de la investigación.

El laboratorio puede enseñar una serie de análisis o elaboraciones sin hilación intencional, o puede recibir, aun en la inicial docencia, el requerimiento de una finalidad que trascienda hacia la investigación. Se forjan así unas clases prácticas, hilvanadas unas con otras, y también con el trabajo de los demás, a través de la bibliografía. El profesor que da estas clases es investigador. Marcilla es un investigador concienzudo. Sus trabajos tienen una solidez científica estricta, penetrante, que ensarta sobre las variedades sistemáticas las diferencias de funcionalismo, las variaciones fisiológicas, la diversidad de producciones y rendimientos en el proceso fermentativo. La ciencia pura le debe la contribución al esclarecimiento de complicados procesos bioquímicos, y esta misma ciencia es la que ha llevado a Marcilla a salvar cosechas que representaban la principal riqueza de nuestros pueblos rurales.

Ante hombres de esta solidez se difuminan las vallas artificiales que a veces se quieren crear entre ciencia y técnica; vallas que tienen el valor de esos problemas resueltos a partir del resultado, al que siguen el desarrollo y el planteamiento.

El científico y el técnico, el docente y el investigador viven entrelazados, mejor, fundidos en las actividades y trabajos de don Juan Marcilla. Tras una carrera alcanzada con matrícula de honor todos los años y con título final de honor, fué destinado a la Estación Enológica de Villafranca del Panadés, dirigida entonces—año 1910—por el ilustre ingeniero agrónomo don Cristóbal Mestre. Allí completó su formación vitícola y enológica e inició su formación microbiológica.

En esa época—1911—siguió un curso de análisis electroquímico en la Universidad de Lausanne y realizó un viaje de estudios para conocer el funcionamiento de Centros científicos de la especialidad a la que se dedicaba, en Francia y Suiza.

Siguió la estricta dirección técnica al pasar a la Estación Ampelográfica Central, dirigida por el eminente ampelógrafo don Nicolás García de los Salmones, desde donde desarrolló trabajos profesionales en Navarra y en Madrid. Y esa orientación aplicada alcanzó la culminación de la cátedra de Viticultura y Enología de la Escuela de Ingenieros Agrónomos, obtenida por concurso de méritos en 1925. Pero, al mismo tiempo, a su impulso estrictamente científico se debe la creación de la cátedra de Microbiología agrícola en la Escuela, enseñanza que profesa juntamente con las de Viticultura y Enología. Desde el año 1912 al 1933 visitó varias veces Holanda, Italia y Suiza, para conocer el Centraalbureau voor Schimmel-

cultures, de Baarn; las Estaciones de Química Agrícola, en Roma; de Enología, en Asti, R. Escuela Superior de Agricultura de Perugia y diversos centros científicos helvéticos. Centros científicos e instalaciones industriales de la zona renana tuvo ocasión de conocerlos en 1939, con ocasión del V Congreso Internacional de la Vid y el Vino, en Kreuznach.

No perturba la Técnica el empuje del científico; del mismo modo que en el Marcilla delicado perito en el arte de catar y escudriñar y analizar sabores de vinos y de sus mezclas y edades, viven aquellas aptitudes de fina percepción que le llevaron, en la entrada de la juventud, a los estudios musicales: solfeo, violín, piano, armonía.

Marcilla reúne las más diáfanas cualidades del investigador: laboriosidad, penetración, perseverancia y, además, sencillez. Sencillez que es facilidad de comunicación, pronta vinculación de colaboradores. Y aun más, acogida alentadora. Sencillez que es estímulo de laboriosidad, porque ve en el trabajo continuado la razón de los éxitos grandes y pequeños que trae, como fruto natural, el curso de los días. El cristianismo profundo de Marcilla produce esa sencillez que está en lo íntimo de su personalidad, y no ya sólo como una consecuencia virtuosa de la modestia, sino además como posición de una inteligencia religiosa abierta, que no concibe que la marcha del mundo vaya a pender del descubrimiento de una modalidad fermentativa, de una nueva representación del mecanismo atómico, o de cualquiera de esas obras culminantes del entendimiento, esfuerzo prócer de la razón humana, cuyo feliz resultado es como un parpadeo estelar en la inmensidad celeste.

En 1933 Marcilla fué nombrado Director del Centro de Investigaciones Vinícolas de la Fundación de Investigaciones Científicas y Ensayos de Reformas, y allí, con sus colaboradores los ingenieros señores Alas y Feduchy, desarrolló el estudio de las levaduras de flor de los vinos de Jerez, cuya sistemática y fisiología eran entonces casi por completo desconocidas. Como había surgido la cátedra de Microbiología Agrícola por el empuje de su dedicación a esta disciplina, se forjó una escuela investigadora por la laboriosidad inteligente, orientada y orientadora, del profesor Marcilla, una Sección de Fermentaciones. En dicha Sección se siguieron investigaciones acerca de cuestiones tan importantes como levadura-pienso, fermentación cítrica, fermentación butílica e isopropilbutílica, fijación del nitrógeno gaseoso por los microorganismos, etc. El Instituto Cajal vió así dilatarse sus actividades por la amplia extensión que concibió don Santiago y que exigía el título de Instituto de Inves-

tigaciones Biológicas. La actividad de esta Sección y de otras que han venido a rebasar el cauce de los «Trabajos del Instituto Cajal» de carácter histológico, ha producido una nueva revista, que constituye otra serie de los trabajos del Instituto, la serie designada con el subtítulo «Secciones de Fisiología, Fermentaciones, Virus y Química Biológica».

Vocal, desde el primer día, del Consejo Ejecutivo en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, es actualmente su Vicepresidente 2.º Y es que Marcilla, además de un profesor destacado, de un investigador profundo, de un estudioso incansable, es un colaborador eficaz en la tarea general que incumbe a todo español. No construyó con sus dotes un compartimento de inhibición; no polarizó su especialización para desviarse de los grandes deberes comunes. Y cuando fué liberado Madrid, cuando acabó el régimen de checas que también hubo de sufrir Marcilla—fué llevado a la de Fomento—, el Ministerio de Agricultura le designó inmediatamente Delegado, en la capital, del Director General de Agricultura, hasta el traslado del Ministerio de Burgos a Madrid. También fué nombrado Director de la Escuela Especial de Ingenieros Agrónomos y Profesional de Peritos Agrícolas, inmediatamente con carácter interino y luego con carácter definitivo, por el Ministro de Educación Nacional, quien le nombró, asimismo, miembro del Consejo de Nacional de Educación y Presidente de su Sección cuarta. En ambos Ministerios, de Agricultura y de Educación Nacional, la labor de Marcilla ha sido valorada con las más altas distinciones y le ha sido otorgada la gran Cruz del Mérito Agrícola y la gran Cruz de Alfonso el Sabio.

También ha tenido el Profesor Marcilla actividades profesionales privadas, desde la enseñanza de matemáticas en Academias preparatorias de ingreso en Escuelas especiales, que comenzó al matricularse del primer año en la carrera de ingeniero agrónomo, para atender al sostenimiento de su familia, hasta trabajos de organización, construcción y dirección de bodegas cooperativas en Cintruénigo, Peñafiel, La Seca, Alcázar de San Juan, Leiro, Santa María de los Llanos, etc. Su orientación vinícola no le ha enemistado con la hidráulica, y es también autor de pequeñas obras de regadío y construcciones agrícolas en Brunete, San Martín de la Vega, Simancas, Alcalá de Henares, etc.

Ha colaborado don Juan Marcilla en diversos Congresos internacionales de la vid y del vino, de plantas tropicales; en reuniones de expertos, etc., celebrados en Roma, Lausana, Amberes, S.-

villa, Madrid, etc. Ha proyectado su prestigio en la vida científica agronómica de Portugal, y ha contribuído así a dar fijeza y solidez intelectual a la creciente cordialidad lusoespañola.

Podemos considerar de un modo muy sumario algunos de los trabajos científicos del Profesor Marcilla.

Cuando leemos su *Contribución al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcohólico* advertimos que somos bastante simplistas si dividimos la investigación en las ramas pura y aplicada, porque lo que suele hacerse en la investigación es un anillo con eslabones puros y aplicados, hasta el punto de que, cuando el ciclo está terminado, no se sabe si la primera pieza fué de tipo puro o bien fué la aplicada la que dió lugar a los trabajos puros, para, luego, mejorar los siguientes eslabones de aplicación.

Este proceso se observa fácilmente en el trabajo que nos ocupa, y que afecta a una de las riquezas más singulares de España, importante por su cantidad y más importante por su calidad, que nos permite un interesante comercio exterior, con el consiguiente logro de las divisas que contribuyen a salvar los momentos económicamente difíciles de nuestra Patria : los vinos andaluces de los tipos Jerez y Montilla, que se vienen elaborando con un alarde de facultades naturales que acreditan la buena dotación sensitiva e inteligencia de nuestros bodegueros, pero que no debían apenas a los conocimientos científicos. Ya no puede decirse lo mismo hoy, pues la obra de Marcilla ha aclarado la verdadera naturaleza de los velos, ha caracterizado una nueva levadura, hasta hoy única en el mundo, y ha estudiado su acción en los caldos jerezanos, con lo que el anillo de lo puro y lo útil se ha cerrado de nuevo, acreditando el enlace con la prueba de la fecundidad.

Sigue en importancia al estudio anterior el de la fermentación cítrica, producida por el «*Aspergillus niger*». Este tema, de gran repercusión industrial, requiere una detallada investigación de laboratorio, ya que las condiciones de trabajo remuneradoras son objeto de celoso secreto en los países que han logrado por esta vía independizarse del tributo económico pagado a las tibias tierras mediterráneas, cultivadoras del limonero. Dos comunicaciones tiene presentadas, plenas de absoluta e indiscutible originalidad.

Y ampliando el campo de su trabajo al ámbito de la economía nacional publica su *Contribución al estudio de las materias primas españolas para la síntesis microbiana de las proteínas*, con lo que nos introduce en el camino que siguen los países con superpobla-

ción o que aspiran a tenerla, ya que hoy se va convenciendo la humanidad de que la mayor riqueza es la humanidad misma, y contra las voces, recientes, que ya nos suenan remotas, abogando la limitación de la natalidad impuesta por el tope alimenticio, se alza hoy la solución más humana, por inteligente, de romper los moldes clásicos alimenticios y procurar sustento por medios nuevos a los seres que vengan en nuestra ayuda para dominar la naturaleza. Una guía de soluciones posibles en España para este incremento alimenticio, de uso directo o con el intermedio de la ganadería, nos la da Marcilla en su discurso sobre las «Posibilidades españolas para la síntesis biológica de las proteínas», leído en la Sesión Plenaria del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Su constante laborar sigue reflejándose en otras publicaciones investigadoras: «Contribución al estudio de una especie de *Saccharomycodes* resistente a la acción tóxica del SO_2 », «La fijación del nitrógeno atmosférico en los suelos», «Las bacterias de las nudo­sidades de las leguminosas» y «Una mezcla de indicadores de pH especialmente adecuada para la industria enológica».

A estas publicaciones que definen sobradamente su faceta de investigador, hay que añadir las que le acreditan como Profesor y divulgador. Su gran lección de experiencia y criterio está plasmada en el «Tratado práctico de viticultura y enología», lo mejor y más español que hay entre nosotros. Tiene como antecedente remoto la obra de «Química, Vinicultura y Enología», que escribió con García de los Salmones. Como profesor directo, de alumnos conocidos, sus «Apuntes de Enología», «Apuntes de Viticultura» y «Apuntes de Microbiología agrícola», son modelos de razonamiento y comentario de los fundamentos científicos de los fenómenos. Así como el profesor de nuestras Universidades clásicas, comentaba el trozo leído en un texto determinado, así, también, hemos de considerar al moderno profesor que diseña, analiza, razona y propone la reconstitución encauzada del fenómeno acotado en el gran libro de la Naturaleza; y este proceso es el que sigue Marcilla en sus obras didácticas.

A la divulgación, mediante el libro y la prensa, tiene dedicadas muchas horas de su pluma fértil. De la lista, que cualquier viticultor o enólogo podría recitarnos de memoria, citaremos las siguientes: «Vinificación en los países cálidos», «Industrias agrícolas», «Vinagres de vino», «La limpieza de la bodega», «La clorosis de la vid» y «Defectos, alteraciones y enfermedades de los vinos».

Cientos de artículos periodísticos, ponencias y conferencias, han hecho útil para los demás el extraordinario conocimiento que Marcilla tiene de las cosas de la vid y del vino.

* * *

Don Juan Marcilla es un Ingeniero Agrónomo destacadísimo, y quien recibe en todo momento de sus compañeros el homenaje de una sentidísima afectuosa admiración, con la intensidad y la extensión máxima en que lo recibe Marcilla, bien puede decirse que representa a su profesión, la cual está tan cordialmente ligada a don Juan, que seguramente recibe su ingreso en la Real Academia como homenaje propio.

Pertenece al Cuerpo de Ingenieros Agrónomos, pero, sobre todo, Marcilla pertenece al cuerpo y al espíritu de España. La Patria vive por el pensamiento y el trabajo y el afán solidario de sus hombres. Cuando cada uno sigue su órbita determinada por atracciones parciales—egoísmos, localismos, profesionalismos absorbentes y exclusivistas—, la Patria se dislacera y corroe. Marcilla está abierto a todos; al cuidado familiar, al cauce docente, a la solicitud de cuantos quieren trabajar; a la orientación de compañeros y colaboradores, en el grado que sea, desde la profesión que sea; a los requerimientos del Poder, servicio de la Patria. La Patria se engrandece con figuras que así impulsan, estimulan, encauzan el trabajo de los demás; tejen, en la dispersión de aspiraciones vacilantes, una estructura solidaria, y clavan en el vaivén de los deseos imprecisos el vector que dirige, la figura del objetivo que se alcanza. La Patria se unifica cuando sus hombres se amplifican, no en esponjosa vacuidad, sino en trabajosa proyección, en preocupación propia para la ocupación ajena, en generosas perspectivas.

En el polimorfismo vital del mundo microbiano, la forma variable representa menos que el proceso funcional fijo en determinadas condiciones, móvil con variedad de desplazamientos, con variedad de posibilidades y rendimientos. Es la acción más que el aspecto lo que caracteriza la presencia. La vida se compone de procesos mucho más que de figuras; tiene más de tránsito que de morfosis; existe en ella una constancia dinámica, un desnivel orientado, que es más firme que la constancia estática y el equilibrio fijo. Se arrasa más fácilmente que se extirpa; cae la arquitectura que se pensó estable más fácilmente que ese burbujeo del vivir que se pensó efímero. Entre ruinas y escombros sigue el fluir de la corriente viva, amputada.

sangrante, pero viva. El verbo, la palabra de la acción, es la palabra centradora de la oración, la palabra que la caracteriza. Triunfa de la roca la gota de agua, de la forma el impulso. Marcilla ha plantado su tienda de observación junto a esos hilillos del vivir microbioano, y diríase que asomándose a ellos ha forjado su personalidad llena de eficacia, de trabajo, de continuidad, sin activismos alborotados ni presunciones ruidosas. Aprendió a ser levadura potente que cala y levanta.

Junto a su obra científica sobresaliente, convenía mostrar este aspecto de ejemplaridad, este carácter dinámico y firme de un hombre que sabe y sirve, que sabe para servir, que consume su vivir intelectual en ofrenda ascensional y en entregamiento generoso, frente a todas las bengalas luciferianas de la egolatría.