REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA
R. esp. Fisiol., 25, n.º 1, págs. 41-54. 1969

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Producción de alanina por fermentación con *Citrobacter intermedium* C_3

por

R. Clotet, J. Guinea y R. Parés-Farrás

(Recibido para publicar el 7 de julio de 1968)

Citrobacter intermedium C_3 es una cepa bacteriana que acumula aminoácidos extracelularmente durante su crecimiento en un medio mineral con glucosa (7).

En el presente trabajo se estudian las condiciones de cultivo que pueden resultar más favorables para la segregación de aminoácidos, así como la naturaleza de los mismos. Como sea que la alanina constituye el componente mayoritario, todo el proceso se considera como producción directa de este aminoácido por fermentación a escala de tubo.

Material y métodos

ORGANISMO Y MEDIOS DE CULTIVO. La cepa *C. intermedium* utilizada fue aislada de aguas coladas de papelera y conservada en el laboratorio por propagación vegetativa (C.C.B.* n.° 362) (7). El medio de aislamiento y cultivo está constituido por glucosa (20 g/l), NH_4Cl (7 g/l), KH_2PO_4 (1 g/l), $MgSO_4$ (0,5 g/l) (7). Se utilizan también medios muy parecidos en los que varía la concentración de algunos de los componentes o se adicionan otros. Cuando se adiciona carbonato cálcico para estabilizar el pH del medio, se esteriliza separadamente.

MEDIDA DEL CRECIMIENTO. Se lleva a cabo por peso seco del residuo celular a 105° C. Cuando se añade carbonato cálcico, se trata el centrifugado con 10 ml de agua destilada a la que se ha añadido 1 ml de ácido acético glacial al 25 %. Se agita con una varilla hasta la total solubilización del carbonato, que se nota por la desaparición de las burbujas de anhídrido carbónico. Se centrifuga de nuevo a 4.000 r.p.m. durante 15 minutos y se procede a continuación como en ausencia de carbonato (7). Previamente se ha comprobado que una suspensión al 0,5 % del carbonato cálcico utilizado no deja residuo insoluble después de tratarse con ácido acético al 25 % en la forma señalada. Por otra parte se considera despreciable la hidrólisis proteica que pueda

* C.C.B. Colección del Dto. de Microbiología de la Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona.

haber condicionado el exceso de ácido acético, en frío y durante el tiempo que duran las operaciones.

MEDIDA DE LA PROTEÍNA SOLUBLE. Se lleva a cabo como se ha consignado previamente (7).

MEDIDA DEL NITRÓGENO AMÍNICO SOLUBLE. Se utiliza el método espectrofotométrico de SPIES y CHAMBERS (20) con las modificaciones en la obtención de la curva de calibrado introducidas previamente (7).

Como que son utilizadas concentraciones de cloruro amónico en el medio distintas de las utilizadas en el trabajo citado (7), se realiza la determinación de la curva de calibrado para varias concentraciones de cloruro amónico (tabla I).

La curva de calibrado para cada concentración de cloruro amónico en el medio se obtiene de la tabla I, previa sustracción en cada caso de la extinción basal. Sin embargo, una vez realizada la sustracción las curvas correspondientes a 14 y 28 g de cloruro amónico son coincidentes. Es probable que el desplazamiento de la curva de calibrado sea debido a los equilibrios entre los distintos complejos de cobre (de amonio, de aminoácidos producidos y de alanina) y se hace constante a partir del momento en que uno de ellos está en exceso y fija el sentido del equilibrio.

Teniendo en cuenta los factores anteriores que no se consideran en el trabajo original de SPIES (20), se ha comprobado la independencia de la extinción final de la naturaleza de los aminoácidos presentes y de los otros componentes del medio (6). En sentido estricto en cada caso debería determinarse el ion amónico presente en el medio y tomar la curva de calibrado correspondiente, pero la disminución de cloruro amónico es pequeña frente al total de sal presente y asimismo lo son los desplazamientos de la curva.

VOLUMEN DEL CULTIVO Y SU CORRECCIÓN. Para tiempos de incubación muy prolongados se corrige la reducción del volumen utilizando los datos consignados en (7). Para las experiencias llevadas a cabo a 37° C, esta corrección se lleva a cabo con los valores consignados en la tabla II.

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA. La glucosa residual se determina por el método FOLIN-WU (9).

Una vez centrifugado el sedimento no

TABLA I

Extinciones a 620 mμ de distintas soluciones de aminoácidos con diversas cantidades de cloruro amónico presente

Aminoácidos (como alanina) mM	CLORURO AMONICO, g/l				
	—	3,5	7,0	14,0	28,0
0	0,000	0,008	0,022	0,089	0,230
1	—	0,023	0,038	0,112	0,259
2	—	0,043	0,068	0,136	0,278
3	—	0,060	0,082	0,160	0,298
4	—	0,077	0,104	0,184	0,320
5	0,058	0,095	0,132	0,204	0,342
15	0,203	0,254	0,309	0,409	0,553
25	0,340	0,406	0,459	0,560	0,728
40	0,554	0,605	0,640	0,713	— (*)

* El $(PO_4)_2Cu_3$ se encuentra ya en defecto.

TABLA II

Reducción del volumen por evaporación a 37° C. Relación superficie-volumen: tubos 20 × 200 mm. Volumen inicial: 10 ml.

Horas	Factor de corrección (volumen de 1 ml)
24	0,988
48	0,973
96	0,946
168	0,905
240	0,865

es necesario efectuar la defecación, ya que la cantidad de proteína es despreciable y no existen otros productos complejos en el medio. Se utiliza el medio de cultivo sin inocular como blanco y las diluciones necesarias se llevan a cabo en el mismo medio sin glucosa, en lugar de agua destilada.

NITRÓGENO AMONIACAL. La determinación del cloruro amónico residual se lleva a cabo por microkjendhal (3).

COEFICIENTE DE TRANSPORTE DE OXÍGENO. Se determina por el método del sulfito según ANGULO y col. (2).

PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINOÁCIDOS. El medio de cultivo centrifugado, previa precipitación de la proteína soluble con alcohol y filtración posterior, se evapora a bañomaría. Este residuo se purifica siguiendo la técnica de purificación y recuperación total descrita por BLOCK (5), con las modificaciones de utilizar resinas catiónicas Lewattit, S. 100 (Bayer) y redisolver el producto final en ClH 2N (6).

Se realiza una cromatografía ascendente sobre papel a 20° C, siguiendo las técnicas generales descritas (16, 17, 21). El líquido de desarrollo es el de PARTRIDGE (15): n-butanol 40 % v/v, ácido acético 10 % v/v, agua 50 % v/v. El papel utilizado: SCHLEICHER 2.043a, y como revelador ninhidrina al 0,2 % en acetona (16).

En las determinaciones cromatográficas cuantitativas se han seguido las técnicas descritas por AMBANELLI (1) y HEFTMANN (10). El revelado se efectúa con una solución al 0,2 % de ninhidrina en n-butanol saturado con tampón fosfato (pH 7,0), secado a 90° C durante 10 minutos y posterior tratamiento con vapor de agua. La mancha se extrae con acetona/agua 50/50 y se determina su extinción a 570 mμ. Se toma como cero el líquido de extracción de un área igual del mismo papel fijada por pesada.

FUENTES DE CARBONO Y DE NITRÓGENO UTILIZABLES PARA EL CRECIMIENTO. En la descripción taxonómica de *C. intermedium* C_3 (C.C.B. n.° 362) (7, 8) se describen los sustratos que pueden sustituir a la glucosa como única fuente de carbono y energía. Para el estudio de las fuentes de nitrógeno se sigue una técnica análoga: 2,5 ml de una suspensión en Ringer 1/4 de un asa de crecimiento de 24 horas se diluye en 14 ml de agar M_1 sin cloruro amónico, fundido a 45° C; se agita cuidadosamente y se vierten en una placa. Una vez solidificado el agar se coloca en el centro de la placa un cilindro de acero estéril, en el interior del cual se introducen 0,1 ml de una solución al 2 % de la fuente de nitrógeno objeto de ensayo. Un resultado positivo se manifiesta por un amplio halo de colonias de diámetro decreciente hacia la periferia, después de incubación a 30° C.

Resultados

DESARROLLO A pH CONSTANTE POR ADICIÓN DE CARBONATO CÁLCICO. En la tabla III se consignan los resultados obtenidos con el desarrollo de *C. intermedium* C_3 manteniendo el pH a 7 por adición de carbonato cálcico.

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA. Se han realizado ensayos en M_1,

TABLA III

Desarrollo de *C. Intermedium* C_3 manteniendo el pH a 7,0 por adición de carbonato cálcico

Horas	N. amínico mM	Peso seco g/l	Prot. sol. (N × 6,25) g/l
24	1,42	0,350	0,027
72	4,10	0,680	0,022
144	4,08	0,780	≤0,010
240	3,14	0,840	0,018
360	2,86	—	0,018

pH final del medio centrifugado a las 360 horas: 7,08.

con concentraciones de glucosa de 40, 20, 10 y 5 g/l respectivamente. El cultivo se ha verificado a 30°, utilizando como inóculo 0,1 ml de un cultivo previo de 48 horas en M_1, en presencia de carbonato cálcico (5 g/l), agitando cada 24 horas hasta resuspender lo más perfectamente posible el carbonato residual. En la tabla IV se consignan los resultados obtenidos.

De acuerdo con los ensayos verificados variando la concentración de NH_4Cl, en la tabla V se exponen los resultados obtenidos con 40 y 20 g/l de glucosa y 14 g/l de NH_4Cl. La agitación se llevó a cabo en estas experiencias cada 12 horas.

En la tabla VI se encuentran los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo en M_1 con distintas concentraciones iniciales de glucosa y agitación cada 12 horas. En ellos se determina periódicamente la glucosa residual, el peso seco del material celular y el nitrógeno amínico libre en el medio.

SUSTITUCIÓN DE LA GLUCOSA POR OTRAS FUENTES DE CARBONO. Se han verificado ensayos de crecimiento de *C. intermedium* C_3, en M_1, sustituyendo la glucosa por glicerina (tabla VII), de sorbitol (tabla VIII) y xilosa (tabla IX).

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORURO AMÓNICO. En la tabla X se encuentran los valores de la proteína soluble, peso seco del material y nitrógeno amínico libre del medio, correspondientes al crecimiento de *C. intermedium* C_3 en M_1 con distintas cantidades de cloruro amónico. En todos los casos el desarrollo bacteriano se ha realizado en presencia de carbonato cálcico (5 g/l), con un inóculo de 0,1 ml de cultivo de 48 horas, y agitando cada 12 horas.

INFLUENCIA DE OTRAS FUENTES DE NITRÓGENO DISTINTAS DEL CLORURO AMÓNICO. Se ha encontrado que *C. intermedium* C_3 puede crecer en un medio basal como el repetidamente indicado, en el que

TABLA IV

Desarrollo de *C. Intermedium* C_3 a distintas concentraciones de glucosa, en medio M_1

	GLUCOSA INICIAL EN EL MEDIO, g/l											
	5 g/l			10 g/l			20 g/l			40 g/l		
Horas	N. amínico mM	Prot. sol. g/l	Peso seco g/l	N. amínico mM	Prot. sol. g/l	Peso seco g/l	N. amínico mM	Prot. sol. g/l	Peso seco g/l	N. amínico mM	Prot. sol. g/l	Peso seco g/l
24	0,55	≤0,010	0,410	0,64	≤0,010	0,380	0,32	0,018	0,400	0,25	0,020	0,430
48	0,67	0,013	0,400	0,84	0,013	0,450	0,84	0,016	0,580	0,37	≤0,010	0,600
96	0,60	0,013	0,380	0,77	0,013	0,480	1,48	0,014	0,580	1,22	0,014	0,760
168	0,28	0,014	0,370	0,46	≤0,010	0,480	1,06	0,011	0,585	2,20	—	0,670

TABLA V

Desarrollo de *Citrobacter intermedium* C_3 en medio $M_1/14$, a distintas concentraciones de glucosa *

Horas	Fracción	EXPERIENCIA I [Iniciador (48 h. a 30° C): $1{,}53 \times 10^{-3}$ g/l] (a)		EXPERIENCIA II [Iniciador (48 h. a 30° C): $1{,}04 \times 10^{-3}$ g/l] (a)	
		M1-14 20 g glucosa	M1-14 40 g glucosa	M1-14 20 g glucosa	M1-14 40 g glucosa
24	N. amínico (mM/l)	1,35	1,15	1,0	0,85
	Prot. soluble (g/l)	0,026	—	0,014	0,014
	Peso seco (g/l)	0,300	0,250	—	—
48	N. amínico (mM/l)	1,55	0,95	2,15	1,45
	Prot. soluble (g/l)	0,025	0,022	0,012	—
	Peso seco (g/l)	0,400	0,265	0,410	0,310
120	N. amínico (mM/l)	3,45	—	6,50	2,92
	Prot. soluble (g/l)	0,028	—	0,022	—
	Peso seco (g/l)	0,560	—	0,500	0,460

* Las casillas en blanco corresponden a valores que se desestimaron porque, de acuerdo con la técnica establecida, los sobrenadantes del centrifugado aparecieron turbios.

(a) El inóculo se expresa en gramos de peso seco por litro de medio de desarrollo.

TABLA VI

Utilización de la glucosa, crecimiento y producción de aminoácidos por *C. intermedium* C_3, en medio M_1 con distinta glucosa inicial

Horas	Glucosa inicial en el medio g/l								
	10	20	40	10	20	40	10	20	40
	Glucosa residual, g/l			Peso seco, g/l			N. amínico, mM/l		
24	4,70	16,70	38,40	—	—	—	1,4	1,5	0,5
48	1,98	3,20	36,05	0,180	0,400	0,190	1,7	3,3	0,7
96	0,—	0,—	16,02	0,260	0,590	0,580	3,0	4,8	4,1
168	0,—	0,—	0,—	0,300	0,590	0,680	1,7	4,3	4,0
264	0,—	0,—	0,—	0,260	0,550	0,620	1,1	2,4	3,5

la única fuente de nitrógeno disponible sea extracto de levadura (extracto blando de 4,5 % de N medida por Kjeldhal), glutamato monosódico (99,9 %), α-alanina (Schuchardt), glicocola o urea (reactivo exento de biuret).

En la tabla XI se expresa el resultado de una comparación opacimétrica del crecimiento en M_1-extracto de levadura con respecto a M_1-cloruro amónico; 0,5 g/l de extracto de levadura dan un crecimiento total a las 24, 48 y 72 horas idéntico

TABLA VII

Concentración de N-amínico en el medio durante el crecimiento de *C. intermedium* C_3 utilizando glicerina como fuente de carbono.

Horas	Mat. celular µ/6	Prot. soluble g/l	Nitr. amínico (mM)
0	—	0,029	0,9
6	—	0,045	0,8
16	—	0,010	0,2
24	—	0,027	0,4
48	0,25	0,029	0,4
96	0,45	0,032	1,3
168	0,50	0,035	2,1
264	0,57	0,035	2,4

TABLA VIII

Concentración de N-amínico en el medio durante el crecimiento de *C. intermedium* C_3 utilizando sorbitol como fuente de carbono

Horas	Mat. celular g/l	Prot. soluble g/l	Nitr. amínico (mM)
0	—	0,010	0,1
6	—	0,009	0,2
16	—	0,029	0,1
24	—	0,010	0,1
48	0,12	0,037	0,1
96	0,21	0,037	0,9
168	0,19	0,037	1,0
264	0,30	0,037	1,8

TABLA IX

Concentración de N-amínico en el medio durante el crecimiento de *C. intermedium* C_3, utilizando d-xilosa como fuente de carbono

Horas	Mat. celular g/l	Prot. soluble g/l	Nitr. amínico (mM)
0	—	0,022	0,4
6	—	0,040	0,3
16	—	0,029	0,1
24	—	0,029	0,1
48	0,115	0,028	0,1
96	0,14	0,028	1,3
168	0,19	0,028	2,0
264	0,21	0,031	2,25

al obtenido con 7 g/l de cloruro amónico.

En la tabla XII se consignan los resultados del crecimiento en M_1-extracto de levadura (1 g/l), en relación al peso seco celular, a la proteína soluble y al nitrógeno amínico libre.

EFECTO DE LA BIOTINA. En relación con el efecto de la biotina sobre la producción de ácido l-glutámico por *M. glutamicus*, encontrado por KINOSHITA (11) se ha ensayado el efecto sobre *C. intermedium* C_3 a varias concentraciones (tabla XIII). Se ha utilizado como medio de crecimiento $M_{1,4}$ (14 g/l de NH_4Cl) con carbonato cálcico (5 g/l). El inóculo se ha obtenido en M_1 (48 horas a 30° C) y está constituido por $0,3 \times 10^{-3}$ g/l. Se agita cada 12 horas de incubación, a 30 grados centígrados.

EFECTO DEL TWEEN 60. La adición de un detergente no iónico ha sido citada como un factor que facilita la excreción bacteriana de aminoácidos (13, 14, 18, 19). Tomando como base los datos de SHIIO (19), se ha llevado a cabo un experimento con *C. intermedium* C_3 en el que se ensava el efecto del Tween 60 (Atlas Chem. Ind.). Se ha utilizado $M_{1,4}$ con carbonato cálcico (5 g/l) incubado a 30° C y agitado cada 12 horas. El inóculo se ha obtenido en M_1 (48 horas a 30° C) y es de $1,1 \times \times 10^{-3}$ g/l. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla XIV.

EFECTO DE LA TEMPERATURA. *C. intermedium* C_3 crece en M_1 entre 10° y 37°. A cualquiera de estas temperaturas el crecimiento total en tubo se consigue en varios días, en tanto que a 30° C se alcanza la fase estacionaria en 48 horas.

En las tablas XV y XVI se encuentran los resultados obtenidos en experimentos de crecimiento a 17°, 30° y 37° C. El medio de crecimiento contenía 14 g/l de NH_4Cl y en presencia de carbonato.

TABLA X

Desarrollo de *C. intermedium* C_3 a distintas concentraciones de cloruro amónico Influencia sobre la producción de aminoácidos

Horas	CLORURO AMONICO EN EL MEDIO											
	3,5 g/l			7 g/l			14 g/l			28 g/l		
	N. amínico mM	Prot. sol. g/l	Peso seco g/l	N. amínico g/l	Prot. sol. mM	Peso seco g/l	N. amínico mM	Prot. sol. g/l	Peso seco g/l	N. amínico mM	Prot. sol. g/l	Peso seco g/l
24	0,42	0,020	0,450	1,18	0,025	0,430	0,42	0,034	0,290	0,00	0,014	0,010
48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,15	0,027	0,120
72	2,15	0,014	0,680	6,50	0,014	—	4,82	0,014	0,405	—	—	—
96	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6,00	0,029	0,395
168	1,55	0,018	0,755	4,60	0,014	0,640	12,50	0,025	0,490	13,25	0,038	0,570
336	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11,25	0,041	0,570

TABLA XI

Crecimiento de *C. intermedium* C_3 en M_1 a distintas concentraciones de extracto de levadura en sustitución del NH_4Cl. Estimación opacimétrica.

Fuente de nitrógeno	Crecimiento a 30°		
	24 h.	48 h.	72 h.
NH_4Cl.	+++	+++	+++
E. lev 0,05 g/l . .	+	++	++
E. lev 0,1 g/l. . .	+	++	++
E. lev 0,5 g/l. . .	+++	+++	+++

TABLA XII

Concentración de nitrógeno amínico en el medio durante el crecimiento de *C. intermedium* C_3 en M_1 con 1 g/l de extracto de levadura (30° C).

Horas	Mat. celular g/l	Prot. soluble g/l	Nitr. amínico (mM)
0	—	0,018	4,1
6	—	0,028	3,4
24	0,37	0,027	2,4
48	0,36	0,022	2,4
96	0,40	0,014	2,5

EFECTO DE LA AIREACIÓN-AGITACIÓN. C_3 es un microorganismo facultativo. Su crecimiento en condiciones anaeróbicas se ha llevado a cabo en tubos de Buchner con pirogalato alcalino como absorbente del oxígeno del aire. El crecimiento se lleva a cabo en presencia de carbonato, que se dispersa periódicamente por agitación como en los casos anteriores. La producción de aminoácidos en estas condiciones de crecimiento viene consignada en la tabla XVII.

En otras experiencias se ha llevado a cabo una incubación anaeróbica sólo a partir de las 48 horas, después de haber sembrado el inóculo. Paralelamente se ha seguido la producción de aminoácidos en las mismas condiciones, aeróbicamente (tabla XVIII).

A pesar que las experiencias anteriores revelan que cierta tensión de oxígeno es necesaria para la producción de aminoácidos, el crecimiento en frascos de Roux, donde la relación superficie/volumen presupone una aireación máxima, es también claramente desfavorable (tabla XIX). Se llevaron a cabo otros experimentos en los que los tubos de cultivo se agitaban con frecuencias distintas. De este modo se concluyó que las condiciones más favorables para la producción de

TABLA XIII

Efecto de la presencia de biotina en el crecimiento y excreción de aminoácidos por *C. intermedium* C_3, en las condiciones dadas en el texto

Horas	Fracción	Biotina en el medio en µg/g			
		0,0 (control)	0,5	2,5	5
48	N. amínico (mM/l) .	0,40	0,56	0,30	0,50
	Prot. sol. (g/l) . . .	0,028	≤0,010	≤0,010	0,018
	Peso seco (g/l) . . .	0,450	0,500	0,480	0,540
120	N. amínico (mM/l) .	1,65	2,05	2,30	2,20
	Prot. sol. (g/l) . . .	0,018	≤0,010	≤0,010	0,014
	Peso seco (g/l) . . .	0,590	0,635	0,680	0,670
168	N. amínico (mM/l) .	2,68	2,57	2,57	2,20
	Prot. sol. (g/l) . . .	0,027	0,027	0,022	0,018
	Peso seco (g/l) . . .	0,580	0,595	0,600	0,650

TABLA XIV

Efecto de la presencia de un detergente no iónico (Tween 60) en el crecimiento y excreción de aminoácidos de *C. intermedium* C_3, en las condiciones dadas en el texto

Horas	Aminoácidos mM/l		Prot. soluble (N × 6,25) g/l		Peso seco g/l	
	Control	Tween 60 1 %	Control	Tween 60 1 %	Control	Tween 60 1 %
48	3,10	3,55	0,027	0,027	0,460	0,420
96	10,00	5,10	0,014	0,014	0,535	0,435
168 (*)	9,50	9,80	0,014	0,038	0,640	0,620
240	10,75	6,50	0,031	0,048	0,610	0,630

* A partir de este punto no se produce espuma al agitar la serie con Tween 60 inicial.

TABLA XV

Desarrollo y excreción de aminoácidos por *C. intermedium* C_3, a 17° C y 30° C, con dos iniciadores distintos

Horas	Nitrógeno amínico mM		Proteína soluble (N × 6,25) g/l		Peso seco g/l	
	17° C	30° C	17° C	30° C	17° C	30° C
Iniciador: $1{,}53 \times 10^{-3}$						
24	0,85	1,35	0,030	0,026	0,010	0,300
48	1,05	1,55	0,028	0,025	0,190	0,400
120	—	3,45	—	0,028	—	0,560
Iniciador: $0{,}82 \times 10^{-3}$						
24	0,00	0,15	≤0,010	≤0,010	0,030	—
48	0,30	0,91	≤0,010	0,018	0,200	—
96	0,72	2,20	0,015	≤0,010	0,440	0,580
168	0.60	1,60	—	—	0,600	0,690

TABLA XVI

Desarrollo y excreción de aminoácidos por *C. intermedium* C_3 a 30° C y 37° C

Horas	Nitrógeno amínico mM		Proteína soluble (N × 6,25) g/l		Peso seco g/l	
	30° C	37° C	30° C	37° C	30° C	37° C
48	3,10	1,80	0,027	0,030	0,460	0,210
96	10,00	5,00	0,014	0,034	0,535	0,240
168	9,50	11,25	0,014	0,039	0,640	0,360
240	10,75	6,70	0,031	0,040	0,610	0,550

TABLA XVII

Desarrollo de *C. intermedium* C_3 en anaerobiosis total.

Horas	N amínico mM	Prot. sol. (N × 6,25) g/l	Peso seco g/l
24	0,51	0,018	0,280
48	1,35	≤0,010	0,595
96	2,75	0,020	—
144	2,42	0,029	0,440
264	2,15	0,013	0,275

aminoácidos en tubo se hallaban próximas a las obtenidas con una agitación de ½ minuto cada 12 horas. En estas condiciones se determinó el coeficiente de transporte de oxígeno encontrándose un valor de 0,070 $mMO_2/l/minuto$ (6).

AMINOÁCIDOS OBTENIDOS. La cantidad máxima de aminoácidos acumulados en el medio durante el crecimiento de *C. intermedium* C_3, presentaba variaciones dependientes de las condiciones de crecimiento.

La cromatografía de aminoácidos sobre papel de un medio con un valor máximo de 3,6 mM/l, mostró la existencia de cinco manchas (fig. 1). Por comparación de los R_f de cada una de ellas con los valores de aminoácidos puros disueltos en ClH 2N a una concentración 5 mM se identificaron con: alanina ($R_f = 0,382$), ácido glutámico ($R_f = 0,272$), ácido aspártico ($R_f = 230$) y aminoácidos básicos no identificados ($R_f = 0,170$ y 0,095). Los R_f correspondientes a los patrones fueron: alanina (Schuchardt) 0,388, ácido glutámico (Ajimoto) 0,270, y ácido aspártico (Bios-Lab) 0,236. En la figura 1 se muestra la evolución de las manchas a lo largo del tiempo de cultivo.

Se ha llevado a cabo una cromatografía análoga sobre medio con una concentración de aminoácidos de 10 mM/l, (figura 2), en la cual las manchas debidas al ácido glutámico (2) y aminoácidos básicos (5) no aparecen hasta las 192 horas.

La proporción molar de alanina con

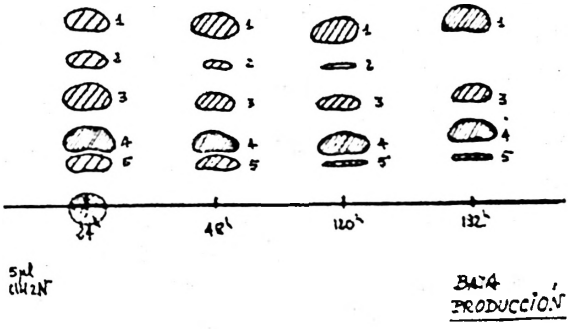

FIG. 1. Cromatografía de aminoácidos, sobre papel, a lo largo del tiempo en un proceso de baja producción: 1, Alanina; 2, Glutámico; 3, Aspártico; 4 y 5, Aminoácidos básicos

TABLA XVIII

Desarrollo comparativo de *C. intermedium* C_3 en aerobiosis (tubo) y anaerobiosis al final de la etapa logarítmica

Horas	Nitrógeno amínico mM		Proteína soluble (N × 6,25) g/l		Peso seco g/l	
	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis
24	0,70	—	0,014	—	0,245	—
48	1,22	—	≤0,010	—	0,440	—
96	1,55	1,35	0,012	0,030	0,535	0,455
144	2,45	1,70	—	0,030	0,550	0,440
216	2,20	1,15	0,020	0,028	0,610	0,360

TABLA XIX

Desarrollo de *C. intermedium* C_3, en Roux

Horas	Nitrógeno amínico mM		Proteína soluble (N × 6,25) g/l		Peso seco g/l	
		*		*		*
24	0,95	0,82	0,022	0,018	0,510	0,730
48	1,40	1,10	0,011	≤0,010	0,685	1,200
96	0,77	0,91	—	0,013	0,960	1,050
168	0,82	0,73	≤0,010	0,011	0,960	1,300

* Agitación del frasco cada 24 horas.

TABLA XX

Asimilación de amónico y excreción de aminoácidos por *C. intermedium* C_3
Balance del nitrógeno

Horas	$ClNH_4$ mM	Aminoácidos mM	Prot. sol. (mM de N)	Peso seco (mM de N celular) (*)	Total mM	Discrepancia %
0	272	—	—	—	272	0,0
24	267	1,75	0,20	2,57	271,5	—0,2
48	265	3,28	0,23	3,54	272	0,0
96	254	12,00	0,20	6,10	272,3	+0,1
168	246	11,25	0,30	5,56	263,1	—3,3
336	245	5,50	0,23	4,44	255,2	—6,2

* Se considera el mismo valor que para *E. Coli:* 15 % de N sobre seco (etapa logarítmica: 24, 48h) y 10 % de N sobre seco (etapa estacionaria: 96h y siguientes).

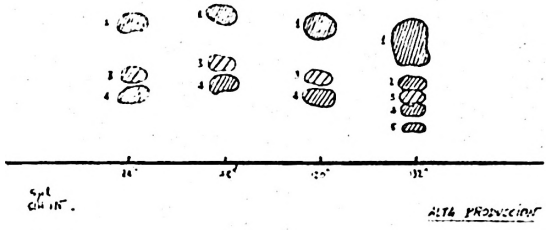

FIG. 2. Cromatografía de aminoácidos, sobre papel, a lo largo del tiempo en un proceso de alta producción. Identificaciones idénticas a la figura 1

respecto al total de los aminoácidos es del 44,4 % y del 70,8 %, respectivamente, en cada caso.

BALANCE DEL NITRÓGENO. En la tabla XX se expresan las concentraciones correspondientes a los aminoácidos libres del medio, proteína soluble, masa celular y NH_4Cl residual, correspondientes a distintos tiempos de incubación a 30° C de un cultivo de *C. intermedium* C_3 en M_{14}. Estos resultados se han expresado bajo la forma de balance de nitrógeno.

Discusión

Como se mostró (7), durante el desarrollo de *C. intermedium* C_3, el pH del medio va descendiendo. Existe la posibilidad de que el crecimiento total sea limitado por este hecho. La estabilización del pH del medio con la adición de carbonato cálcico fue motivada por esta razón, con independencia del efecto directo sobre la misma segregación de aminoácidos. El carbonato cálcico se utiliza desde hace tiempo para estabilizar el pH del medio en muchos procesos de fermentación y fue empleado por ASAI y col. (4) en el estudio de la producción de aminoácidos por *M. varians*.

Una comparación de los resultados consignados en la tabla con los correlativos a procesos llevados a cabo sin adición de carbonato cálcico (7), muestra que existe una significativa disminución del tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima de aminoácidos libres. En presencia de carbonato se consigue alrededor de las 96 horas de incubación, en tanto que en M_1 simple se requieren 264 horas. Por lo demás, la producción de aminoácidos parece equivalente en uno y otro caso.

En la tabla VI se pone de manifiesto que a pH constante, el crecimiento de *C. intermedium* C_3, prosigue hasta agotar toda la glucosa disponible, por lo menos hasta concentraciones iniciales del 4 %. Sin embargo, utilizando concentraciones iniciales superiores al 2 %, deja de aumentar proporcionalmente el crecimiento total, y la relación concentración máxima de aminoácidos/concentración glucosa inicial, disminuye bruscamente. Este resultado es todavía más patente cuando el proceso se lleva a cabo con una concentración de $ClNH_4$ de 14 g/l (tabla V). Por lo tanto, parece verosímil que sin transferencia de materia durante el proceso, una concentración de glucosa de 20 g/l sea óptima para la producción de aminoácidos.

La sustitución de la glucosa por glicerina, sorbitol o xilosa, no modifica sustancialmente las características del crecimiento ni las de la producción de aminoácidos (tablas VII, VIII y IX). Este resultado puede ser interesante en relación con el mecanismo responsable de la acumulación de aminoácidos en el medio, excluyendo la posibilidad de que esté relacionado con una alta permeabilidad a la glucosa.

La tabla XVIII representa por sí mismo una verificación del fenómeno de segregación de aminoácidos por *C. intermedium* C_3, dado que permite cuadrar el balance del nitrógeno con los datos obtenidos por el método de la sal de cobre. Por otra parte pone de manifiesto que dicho fenómeno se lleva a cabo en un exceso de cloruro amónico, puesto que sólo se llega a utilizar un 10 % del inicial.

Para concentraciones iniciales de cloruro amónico más bajas disminuye la producción, sobre todo al pasar de 7 g/l a 3,5 g/l (tabla VIII). Esto permite llegar a la conclusión que, concentraciones inferiores de cloruro amónico podrían soportar el crecimiento total de *C. intermedium* C_3 sin que se acumulasen aminoácidos en el medio. Sin embargo, la cantidad de aminoácidos acumulada es pequeña frente al exceso de cloruro amónico para poder considerar a este proceso eficaz como mecanismo de detoxificación. Además, la producción de aminoácidos no aumenta a partir de 14 g/l. Las condiciones óptimas para la producción de aminoácidos parecen estar en 14 g/l, utilizando un inóculo desarrollado en un medio con 7 g/l (6).

C. intermedium C_3 puede utilizar aminoácidos para el crecimiento, incluso los mismos aminoácidos que segrega cuando se desarrolla en M_1 (8). Cuando crece en extracto de levadura el nitrógeno amínico del medio disminuye progresivamente, a pesar de permitir un crecimiento equivalente al de 7 g/l de NH_4Cl.

Al parecer, ni la biotina ni el Tween 60 modifican la producción de aminoácidos por *C. intermedium* C_3 en M_1, a las concentraciones empleadas (tablas XIII y XIV). Esto sugiere una diferencia fundamental en el mecanismo bioquímico responsable de la producción de aminoácidos de *C. intermedium* C_3, con relación a la de glutamato de *M. glutamicus* (11, 19).

Las experiencias descritas en las tablas XV y XVI muestran que la temperatura para el crecimiento de *C. intermedium* C_3 es también la más favorable para la producción de aminoácidos y en todo caso, próxima a los 30° C.

La escala de tubo es muy poco apropiada para llevar a cabo estudios precisos sobre el complejo aireación-agitación en un determinado proceso microbiológico. En la producción de aminoácidos por *C. intermedium* C_3 esta circunstancia se ve agravada por el hecho de que el óptimo para este proceso está fuera de las situaciones extremas de anaerobiosis y fuerte oxigenación (tabla XVII y XIX). El ensayo de una anaerobiosis a partir de una etapa inicial de desarrollo aeróbico no conduce a un valor óptimo de aminoácidos en el medio (tabla XVIII), consiguiéndose valores mayores en incubaciones llevadas a cabo continuamente en tubo abierto. El tubo abierto no representa unas condiciones perfectamente aeróbicas, puesto que se forma una columna de CO_2 encima del medio debido a la cual el oxígeno disuelto no está en equilibrio con el atmosférico. Al parecer existe un valor de aireación-agitación crítico en las condiciones de crecimiento experimentadas que puede referirse a un coeficiente de intercambio de oxígeno de 0,07 mM O_2/l/minuto. Existe la posibilidad de que la tensión de CO_2 desempeñe un papel importante que no se ha revelado directamente en los experimentos llevados a cabo hasta el presente.

Las cinco fracciones reveladas por cromatografía sobre papel se identifican con alanina, glutamato, aspartato, y aminoácidos del tipo de la arginina, lisina e histidina, para las manchas indicadas con los números 4 y 5. La proporción de alanina oscila entre un 44 y un 70 %, en todo caso mucho mayor que los porcentajes hallados en los hidrolizados de bacterias, que no alcanzan el 15 % (12). Esto constituye una prueba más de que el origen de este aminoácido no es autolítico. Para los desarrollos de *C. intermedium* C_3 que han dado una mayor concentración absoluta de aminoácidos, el porcentaje de alanina es también máximo, llegando casi a duplicar el correspondiente a los procesos de baja producción. Esto sugiere que el fenómeno de acumulación de aminoácidos en el medio de crecimiento de *Citrobacter intermedium* C_3 consiste fundamentalmente en una segregación de alanina.

Los valores máximos de la concentra-

ción de alanina representan un 2 % de los sólidos de los medios de cultivo y un 104 % del desarrollo bacteriano. El glutamato se halla junto a la alanina como el segundo aminoácido mayoritario. En general su concentración tiende a disminuir con el tiempo de incubación, lo cual indicaría que si la segregación primaria es de un solo aminoácido deberá tratarse del glutamato. La alanina se formaría entonces por transaminación y la lesión bioquímica primaria estaría ligada a una desregulación de la síntesis del glutamato. Es verosímil que los demás aminoácidos presentes en una proporción global nunca superior al 20 %, sean también productos secundarios.

Resumen

Citrobacter intermedium C_3 es una cepa caracterizada por acumular una considerable cantidad de aminoácidos extracelularmente, durante su crecimiento en un medio mineral con glucosa. La estabilización del pH del medio con carbonato cálcico acorta el tiempo necesario para conseguir la concentración máxima de aminoácidos (AA), pero no modifica su valor absoluto. El rendimiento de la producción de AA con respecto a la concentración de glucosa inicial es máximo para 20 g/l. Sustituyendo la glucosa por glicerina, sorbitol o xilosa se obtienen resultados comparables. Un estudio del balance del nitrógeno muestra una recuperación satisfactoria sobre los valores proporcionado por el método de SPIES y CHAMBERS. Las condiciones óptimas para la segregación de AA (12 mM) parecen hallarse para una concentración inicial de NH_4Cl de 14 g/l, utilizando un inóculo en 48 horas en un medio de sólo 7 g/l. A estas concentraciones el crecimiento total supone sólo la utilización de un 10 % del nitrógeno disponible, pero valores inferiores disminuyen la segregación de AA. La temperatura óptima es 30° C. Para la segregación máxima de AA se requieren unas condiciones críticas de aireación y agitación que a la escala de tubo corresponden a un coeficiente de transporte de O_2 de 0,07 $mMO_2/l/min$. Se señala la posibilidad de cierto efecto de la tensión de CO_2. La biotina y el Tween 60 no tienen ningún efecto sobre este proceso.

Por cromatografía ascendente sobre papel se muestra que los aminoácidos segregados se reparten entre alanina, glutamato, aspartato y aminoácidos básicos. La proporción de alanina puede alcanzar el 70 % del total (2 % de los sólidos del medio y 104 % del desarrollo bacteriano total). Sigue en importancia cuantitativa el glutamato, pero su concentración disminuye a lo largo del tiempo. Se sugiere la posibilidad que este último sea el aminoácido primariamente acumulado como consecuencia de alguna lesión en los mecanismos de regulación metabólica, formándose los demás secundariamente por transaminación, incluyendo la alanina, a pesar de su mayor abundancia.

Summary

Production of Alanine by Fermentation with *Citrobacter intermedium* C_3

Citrobacter intermedium C_3 is a strain characterized for to accumulate extracellular aminoacids, growing in a mineral medium with glucose. To stabilize the pH of the medium with calcium carbonate gests the smaller time for to obtain the maximum value of aminoacids (AA) but the absolute value remains unchanged. The highest yield in the AA production against the inicial glucose is for 20 g/l. If the glucose is changed by glycerine, sorbitol or xilose the results are the same. The nitrogen balance-sheet shows a very good acommodation with the AA determinations (SPIES & CHAMBERS method). The optimum for the AA acumulation (12 mM) is to 14 g/l NH_4Cl how a inicial concentration, with an inoculum developed during 48 hours in a medium with only 7 g/l; to these concentration the total growing manifest the only utilisation of 10 % of the available nitrogen, but at lower concentrations decrease the AA extracellular production. The best temperature is 30° C. For the optimum AA accumulation are necessaries a special aireation conditions, that in a tube scale it is for a oxigen coefficient transport of 0,07 $mMO_2/l/min$. May be significant the

CO_2 parcial pressure. The biotin and the Tween 60 are not effect in this process.

The paper chromatographic determination shows that the AA are: alanine, glutamate, aspartate and basic aminoacids. The highest alanine proportion is the 70 % of the total (2 % of the solids medium and 104 % of the total bacterial growth). The second A in proportion is the glutamate. This should be the first A accumulated, by some lesion in the biochemical regulation, and the others would form by transamination, inclusively the alanine, in spite of its greater abundance.

Bibliografía

1. AMBANELLI, G.: *Ind. Conserve*, 29, 115, 1954.
2. ANGULO, J., G. DÍAZ, T. MAURIÑO y A. M. MUNICIO: *An. Real Soc. Esp. Fis. Quím.*, 57B, 211, 1961.
3. A.O.A.C. (Association of Official Agricultural Chemist): *Official Methods of Analysis*, 9.ª Ed., Washington, D.C., 1960.
4. ASAI, T., K. AIDA, K. OISHI: *Bull. Agr. Chem. Soc.*, 21, 134, 1957.
5. BLOCK, R. J.: *Aminoacid Analysis of Protein Hydrolizates. Standard Methods of Chemical Analysis.* (Ed. F. J. Welcher). Vol. II Part A-D. Van Nostrand Co. Princenton, 6.ª Ed., 1963.
6. CLOTET, R.: Tesis doctoral. Universidad de Madrid, 1968.
7. CLOTET, R., J. GUINEA y R. PARÉS-FARRÁS: *Microbiol. Esp.*, 1968 (en prensa).
8. GUINEA, J.: Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, 1966.
9. *Hawk's Physiological Chemistry*. Ed. B. L. Oser, 14 Ed., McGraw-Hill Boock Co., 1965.
10. HEFTMANN, E.: *Cromatography*. Reinhold Publ. Co., N. Y., 1961.
11. KINOSHITA, S.: Recent Progress in Microbiology. VIII International Congress Montreal, 1962. (Ed. N. E. Gibbons). University of Toronto Press, 1963.
12. LURIA, S. E.: *The Bacteria.* Dirigido por I. C. Gunsalus and R. Stanier. Academic Press, N. Y., Vol. 1, pág. 1, 1960.
13. OTSUKA, S., R. MIYASIMA y J. SHIIO: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 11, 285, 1965.
14. OTSUKA, S., R. MIYASIMA y J. SHIIO: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 11, 295, 1965.
15. PARTRIDGE, S. M.: *Biochem. J.*, 42, 238, 1947.
16. SCHLEICHER y SCHULL: *Technique de la chromatographie sur papier et possibilités d'erreurs*, Dassel, 1956.
17. SCHLEICHER y SCHULL: *Cromatographie sur papier. Méthode de travail*, Dassel, 1956.
18. SHIIO, I., S. OTSUKA y M. TAKAHASHI: *J. Biochem.*, 51, 56, 1962.
19. SHIIO, I., S. OTSUKA y M. TAKAHASHI: *J. Biochem.*, 53, 333, 1963.
20. SPIES, J. R.: En *Methods in Enzimology*. Dirigido por S. P. Colowick y N. O. Kaplan, Academic Press, N. Y., Vol. III, 1957.
21. WILLIAMS y KIRBY: *Science*, 107, 481, 1948.