

UNIVERSIDAD DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



PRODUCCION DE ISOLEUCINA, LISINA Y ORNITINA  
POR ALGUNOS MICROORGANISMOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO  
PRESENTAN

*Ramona De Hoyos Garza*  
*Francisco De La Luz González Elixondo*  
*Maria Elena Morales Salas*

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1965

12

T

QR9

.A6

H6

c.1

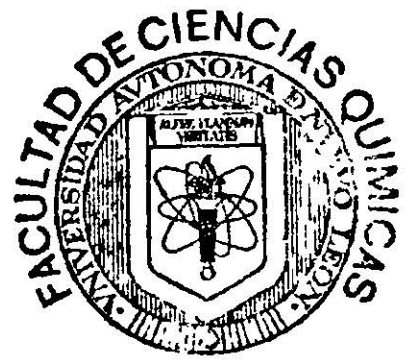
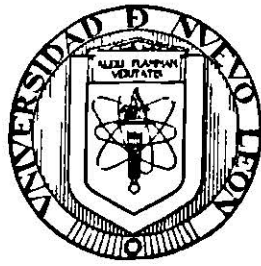


1080075106



# UNIVERSIDAD DE NUEVO LEON

## FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



DEPTO. DE FARMACOBIOLOGIA

### PRODUCCION DE ISOLEUCINA, LISINA Y ORNITINA POR ALGUNOS MICROORGANISMOS

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO  
PRESENTAN



(75106)

*Ramona De Hoyos Garza  
Framary De La Luz Gonzalez Elixondo  
Maria Elena Morales Salas*



X  
Q R92  
A6  
46

**A MI MADRE Y HERMANOS**

**RAMONA**

**A MI QUERIDA MAMACITA, A MIS TIOS Y A SERGIO**

**IZAMARY DE LA LUZ**

**A MI PADRE Y HERMANOS**

**MARIA ELENA**



DEPTO. DE FARMACOBIOLOGIA

**A NUESTROS MAESTROS**

*con gratitud y respeto*

**A NUESTROS COMPAÑEROS Y AMIGOS**



*El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS de la UNIVERSIDAD DE NUEVO LEON bajo la dirección del:*

*Q.F.B.*

*JORGE VALENZUELA PEREZ*



## DEPTO. DE FARMACOBIOLOGIA

### I N D I C E

	<i>Pág</i>
<i>I.- Introducción</i>	<i>1</i>
<i>II.- Material y Métodos</i>	<i>8</i>
<i>III.- Experimentos y Resultados</i>	<i>19</i>
<i>IV.- Discusión y Conclusiones</i>	<i>28</i>
<i>V.- Resumen</i>	<i>30</i>
<i>VI.- Bibliografía</i>	<i>31</i>

## I.- I N T R O D U C C I O N

La isoleucina y la lisina son aminoácidos que constituyen nuestro organismo y se les clasifica en tre los aminoácidos indispensables.

Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal formando parte de las proteínas, sien do posible obtenerlos por hidrólisis de las mismas.

La ornitina habitualmente no forma parte de las proteínas, aún cuando su importancia en biolo gía suele ser considerable. En su forma natural se encuentra en polipéptidos, excrementos de aves y en los músculos del hombre, perro y caballo. También se encuentra en hidrolizados de proteínas de algunas algas marinas.

Limpricht en 1855 (8) sintetizó la leucina ob teniendo a la vez su isómero isoleucina, pero no las obtuvo en forma pura. Alrededor de 1904 Ehrlich (8) aisló este aminoácido en forma pura de un re siduo de melazas de azúcar de remolacha y en 1907 se estableció correctamente su constitución química.

Este aminoácido también se ha obtenido por fermentación, Herr (8), obtuvo la isoleucina en con



centraciones de 7-14 mg/ml por fermentación de medios que contenían ácido aminobutírico (1-2%) empleando Pseudomonas.

Harvat, Godó y Szentirmay (10), observaron que en la producción de oxitetraciclina por Streptomyces rimosus en medios que contenían treonina como fuente de nitrógeno, la isoleucina era producida en cantidades correspondientes al 17% de la treonina.

Drechsel en 1889 (8), obtuvo de un hidrolizado de caseína en ácido clorhídrico hirviente una mezcla de clorhidratos entre los cuales se encontraba el de la lisina. En 1891 Siegfried (8), obtuvo muestras de varios hidrolizados de proteínas y aclaró que la lisina estaba presente en una gran variedad de proteínas. Finalmente en 1891 se le dio el nombre de lisina y se le determinó su constitución química.

También de gran interés es su obtención por fermentación. La L-lisina está siendo manufacturada en los Estados Unidos por un proceso patentado (26),

Mitchel y Houldahan en 1948 y Windsor en -

1951 (26), sintetizaron la lisina partiendo del ácido aminoadípico por levaduras y Neurospora.

David en 1952 (26), describió un método para la obtención de lisina partiendo del ácido diaminopimélico y empleando la enzima descarboxilasa - de dicho ácido la cual la producen Aerobacter aerogenes y Escherichia coli. El aminoácido se producía en 24 horas aproximadamente, a una temperatura de 28°C y a un pH de 7.2.

Richard y Haskins en 1957 (28), trabajando con 600 hongos determinaron su capacidad para producir lisina extracelular en condiciones de cultivo sumergido y empleando medios que contenían glucosa comercial, urea y sales minerales. 12 hongos producían de 5-15 gammas/ml de cultivo filtrado. Considerables cantidades del aminoácido podían ser obtenidas seleccionando los mejores productores y cultivándolos en condiciones óptimas.

Dulaney (5), obtuvo cerca de 400 µg/ml de lisina extracelular en frascos agitados cuando usaba una variedad de Gliocladium y una de Ustilago maydis.

Sagisaka y Shimura en 1957 (14), reportaron la producción enzimática de lisina del ácido aminoadípico usando Torula utilis.

Aida y Uimura en 1958 (14), obtuvieron 2.5-mg/ml de lisina usando una variedad de Bacillus subtilis de sake japonés.

Kinoshita, S. en 1958, Nakayama, K. y Kitada, S. (15), obtuvieron cerca de 8 mg/ml de L-lisina empleando Micrococcus glutamicus y un medio de cultivo hecho a base de glucosa y sales minerales manteniendo el pH entre 5.1-8.5 y un período de tiempo de 86 horas a 28°C.

En 1886, Schulze y Steiger (8), obtuvieron la arginina, la cual sufría una rápida degradación por la acción de los álcalis para obtener urea y un nuevo compuesto básico en forma de clorhidrato al cual se le llamó ornitina. La urea se descompone a su vez en CO<sub>2</sub> y amonio.

La ornitina también se ha obtenido por fermentación.

Sukinko, F.T. y Padgainaya, E.S. en 1951 (32), empleando medios nutritivos standard (pH de



6.7-7.2), al cual se le añadía de 160-170 mg de ar  
ginina e inoculándolos con Microsporium lanosum, M.  
ferrugineum, Fusarium, Aspergillus niger, Tricho-  
derma lignarum y Epidermophyton observaron que to-  
 dos utilizaban la arginina convirtiéndola en urea-  
 y ornitina.

Kinoshita, S., Nakayama, K., Uda, S. y Kitada,  
 S. en 1961 (16), emplearon una variedad de Microco-  
ccus glutamicus que requiere citrulina para su cre-  
 cimiento, aereación, agitación y como fuente del a  
minoácido: peptona, extracto de carne, un hidrolí-  
 zado de caseína etc; como fuente de carbono: gluco-  
 sa, sacarosa, fructosa, maltosa o melazas; sales -  
 de amonio como fuente de nitrógeno y otras sales +  
 inorgánicas; un período de tiempo de 1-5 días, tem-  
 peratura de 25°C - 35°C, pH de 6.0-8.0 y obtuvie-  
 ron de un 25-30% de aminoácido por carbohidrato -  
 consumido.

La necesidad de suministrar suficiente canti-  
 dad de alimentos nitrogenados, cuando el organismo  
 más lo necesita, dió origen al uso de los aminoáci-  
 dos en el campo de la nutrición y de la medicina -

en forma de preparados de aminoácidos ó bien de hidrolizados de proteínas.

Se ha observado que con una mezcla de los aminoácidos indispensables, es posible substituir toda fuente albuminoidea en la alimentación, pero si falta cualquiera de ellos se producen enfermedades por carencia de los mismos, en todo semejantes a la avitaminosis.

Los preparados de aminoácidos se pueden administrar por vía oral ó endovenosa. Hay pruebas de que los preparados de aminoácidos administrados por vía oral, pueden ser útiles coadyuvantes en el tratamiento de úlceras gástricas, ya que posiblemente sirvan al mismo tiempo de alimento que baña la lesión ó de potente antiácido fisiológico.

En lo que respecta a la ornitina debido a su abastecimiento limitado, lo que se sabe acerca de su función bioquímica es muy poco, por lo que su uso se limita a reactivo bioquímico ó como posible profiláctico en la intoxicación por amoníaco en los animales.

En consideración a los datos anteriores he-

mos creído de interés en desarrollar el presente trabajo en el cual se estudia la obtención de  $\alpha$ -isoleucina, lisina y ornitina por fermentación - empleando diferentes microorganismos.

## II.- M A T E R I A L Y M E T O D O S

8  
70  
15  
90

### A.- Plan general de trabajo:

El presente trabajo se realizó con el fin de investigar la producción de aminoácidos tales como: isoleucina, lisina y ornitina por fermentación. Se estudiaron inicialmente 70 especies bacterianas, 5 levaduras y 17 hongos, para determinar el mejor productor de cada aminoácido.

La identificación de los aminoácidos se hizo por medio de técnicas cromatográficas.

Se estudió la influencia de los siguientes factores sobre el desarrollo del proceso: aereación, agitación, aereación-agitación y en cultivos estáticos; concentración de glucosa, fuentes de nitrógeno y precursores. Se hicieron determinaciones cuantitativas de glucosa residual y de los aminoácidos.

Primeramente se procedió a aislar la mayor parte de las especies bacterianas estudiadas; para esto se tomaron muestras de tierra, estiércol, alimentos, agua de deshecho y aire. En seguida -

se procedió a clasificar los microorganismos pro du co to res de am ino á ci do s.

B.- Microorganismos y medios de cultivo empleados:

Se estudiaron bacterias, levaduras y hongos, una parte de éstos microorganismos correspondían a cepas de colección y de los aislados para el presente trabajo se procedió a clasificar únicamente aquellos que daban cantidades considerables ó indicios de aminoácidos. Finalmente se emplearon los microorganismos que producían el aminoácido en una cantidad más ó menos aceptable.

Se estudiaron los siguientes microorganismos procedentes de la colección de cultivos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas: Sarcina lutea, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium hoffmanii, Streptococcus fecalis, Bacillus subtilis, Salmonella typhosa, Klebsiella sp., Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces ellipsoideus, Torulopsis utilis, Endemycopsis fibuliger, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger

(8740), Rhizopus nigricans, Aspergillus niger -  
 (10254), Aspergillus niger (6276) y 38 microorga-  
 nismos aislados de tierra ó aire, 6 aislados de-  
 estiércol, 9 aislados de agua de deshecho y 18 -  
 procedentes de diversos alimentos.

Los microorganismos aislados se sembraron -  
 primeramente en Agar Nutritivo y posteriormente-  
 en los siguientes medios:

Bacterias:

Medio No 1

* POLI-PEPTONA.....	0.5g
EXTRACTO DE CARNE .....	0.3g
EXTRACTO DE LEVADURA .....	3.0g
AGAR-AGAR .....	1.5g
AGUA .....	100 ml.

pH - 7.0

Hongos:

Medio No 2

* AGAR - MALTA.....	4.5g
GLICERINA .....	0.235g
AGUA .....	100ml

pH - 4.5

\*B.B.L.

Se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  -  $30^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas y posteriormente se sembraron en los siguientes - medios:

*Medio No 3*

GLUCOSA.....	5.0g
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ .....	1.0g
*POLI-PEPTONA .....	0.2g
EXTRACTO DE LEVADURA .....	0.3g
AGUA .....	100 ml

pH - 6.8-7-1

*Medio No 4*

GLUCOSA.....	1.0g
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ .....	0.1g
Ac. ASPARTICO .....	3.0g
AGUA .....	100 ml

pH - 6.8-7.1

Se incubaron por agitación continua (100 r.p.m.), tomándose muestras a las 48 y 96 horas, - haciéndose un análisis cromatográfico para determinar cualitativamente la producción de aminoácidos.

\*B.B.L.



En el análisis se incluyó medio de cultivo-estéril y standards de cada uno de los aminoácidos estudiados.

Se hizo cromatografía en papel y en capa delgada, ensayándose diferentes solventes y adsorbentes en el caso de la cromatografía en capa delgada, y utilizándose como revelador para ambos métodos - una solución al 0.2% de ninhidrina en etanol.

En cromatografía en capa delgada, utilizando como adsorbente Gel de Sílice, se ensayaron los siguientes solventes: Piridina-Agua (35:65), Acetona-Agua (40:60), Acetona-Urea-Agua (60:0.5:4), Butanol-Ac. Acético-Agua (40:10:50), (26:6:25) y (60:20:20), Etanol-Agua (63:37), Propanol-Agua (64:36), (1:1) y (4:1), Fenol-Agua (75:25), y (10:4) bidimensionales y (4:1), Propanol-NH<sub>4</sub>OH (67:33), Etanol-NH<sub>4</sub>OH (77:23), Cloroformo-Etanol-NH<sub>4</sub>OH (2:2:1), Metil-etil-cetona- Piridina-Agua-Ac. Acético (70:15:15:2) en cromatografía continua ( 4 veces ), Alcohol terbutílico-Metil-etil-cetona-Ac. fórmico-Agua (40:30:1:15), Metil-etil-cetona-Agua-Alcohol terbutílico-NH<sub>4</sub>OH (30:40:20:10), Butanol-Piridina-

Agua (6:6:6), Butanol, Etanol, Metanol, Propanol, Metanol saturado con agua, Metanol-Agua (1:1), Etanol-Eter (60:40), Alcohol amílico-Agua (1:1), - Butanol-Propanol-Agua (35:55:10), Fenol saturado con agua y 0.1% de  $NH_4OH$ .

Utilizando " Sílica buffer " como adsorbente se ensayaron: Etanol-Agua (70:30), Etanol- $NH_4OH$  (4:1), Etanol- $NH_4OH$ -Agua (7:1:2).

Empleando " Kiesighur - G " y Alúmina como adsorbentes se ensayaron: Agua, Piridina-Agua (1:1) y (80:54), Butanol-Etanol-Agua (60:40:40), Butanol-Ac. Acético-Agua (3:1:1).

Para separar la isoleucina de la leucina se probó el siguiente solvente: Piridina-Metil-etil-cetona-Agua-Ac. Acético (15:70:15:2) en cromatografía continua ( 3 veces ).

Debido a que no se obtuvo una buena separación de lisina y ornitina en capa delgada, se intentó separarlos por cromatografía en papel y para ello se ensayaron los siguientes solventes: Fenol saturado con agua y 0.1% de  $NH_4OH$ , Butanol - Ac. Acético-Agua (60:20:30), Fenol-Agua (75:25).

Se escogió el último solvente ya que los separaba de una manera aceptable.

En la tabla No 1, pueden observarse los aminoácidos producidos por los diferentes microorganismos durante la fermentación, tomando en cuenta, tiempo de incubación, temperatura, pH y agitación.

Una vez seleccionados los microorganismos se procedió a su clasificación, para lo cual se hicieron las pruebas tintoriales, morfológicas y bioquímicas recomendadas por la AMERICAN SOCIETY ON MICROBIOLOGY (2) y (31)., así también se tomaron en cuenta las características del cultivo y la naturaleza de la muestra de las cuales se aislaron los microorganismos.

Los microorganismos clasificados se agrupan en la tabla No II. De éstos microorganismos se escogieron aquellos que producían el aminoácido en mayor concentración, bajo las mismas condiciones expuestas en la tabla No I. Los resultados aparecen en la tabla No III.

C.- Material y Métodos de trabajo:

Los microorganismos seleccionados se sembraron en tubos que contenían 2 ml de medio No 3, se incubaron con agitación continua ( 100 r.p.m. ) - a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ , durante 24 - 48 horas.

Después de éste período de tiempo, los cultivos se emplearon para inocular matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo cada uno 50 ml de medio No 3, con el fin de establecer las condiciones más favorables ( agitación, aereación, aereación-agitación y cultivo estático ) para cada microorganismo seleccionado. Una vez establecidas éstas condiciones, se procedió a ensayar diferentes fuentes de nitrógeno y se varió la concentración de la fuente de carbono.

El medio se mantuvo a pH de 6.8-7.1, mediante la adición de una solución reguladora de pH - constituida por:

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .....	15.22g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	4.55g
AGUA .....	1000 ml

Para la agitación se empleó un agitador de-

vaiuén que proporcionaba una agitación de 100 r.p.m. ( recorriendo una distancia de aproximadamente 5 cm. ) y para la aereación una serie de accesorios, los cuales se adaptaban a los matraces y éstos a su vez al aparato.

Los matraces se mantuvieron en las condiciones establecidas anteriormente durante 96 horas, después de las cuales se determinó a cada matraz la concentración de glucosa residual con el reactivo de la antrona de Dreywood (21) y la concentración aproximada de aminoácido producido, por cromatografía en papel, método ascendente.

Para la cromatografía se usaron cilindros de papel Wathman No 1 de 23 X 25 cm. Se aplicaron muestras de aproximadamente 0.01 ml, utilizando diferentes soluciones de concentración conocida de diversos aminoácidos, así mismo se aplicaron muestras de medio de cultivo estéril y de cada uno de los medios fermentados.

Para éste estudio se utilizó como solvente una solución de Fenol-Agua (75:25) y como revelador una solución al 0.2% de ninhidrina en metanol.

Para determinar el efecto de la aereación, -  
agitación, aereación-agitación y cultivo estático-  
se empleó el medio No 3.

Para ensayar el efecto de la concentración -  
de glucosa se empleó el siguiente medio base:

Medio No 5

$(NH_4)_2CO_3$ .....	1.0g
*POLI-PEPTONA .....	0.2g
EXTRACTO DE LEVADURA .....	0.3g
AGUA .....	100 ml

pH - 6.8-7.1

al cual se le agregó glucosa para obtener una con-  
centración final de 1%, 3%, 5% y 10%.

Para el estudio del efecto de la adición de-  
las diferentes fuentes de nitrógeno se empleó el -  
siguiente medio base:

Medio No 6

*POLI-PEPTONA.....	0.02g
AGUA .....	100 ml

pH - 6.8-7.1

\*B.B.L.

al cual se le agregó el compuesto nitrogenado en una concentración tal que representara 1.5 g/100ml de nitrógeno. La glucosa se le añadió en la concentración favorable para cada microorganismo.

Respecto a los precursores ensayados para isoleucina y lisina el medio base empleado fué el siguiente:

Medio No 7

*POLI-PEPTONA.....	0.02g
Ac.ASPARTICO .....	0.7g
AGUA .....	100ml

pH - 6.8-7.1

En el caso de la ornitina el medio base corresponde al medio No 8.

Medio No 8

*POLI-PEPTONA.....	0.02g
Ac.GLUTAMICO .....	0.8g
AGUA .....	100ml

pH - 6.8-7.1

A los medios números 7 y 8 se les añadió la concentración de glucosa favorable para cada microorganismo.

\*B.B.L.



### III.- EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

Las condiciones experimentales ensayadas en el presente trabajo fueron: Efecto de la agitación, aereación, aereación y agitación combinadas y cultivo estático, concentración de glucosa, fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno y utilización de precursores.

Antes de cada fermentación, fueron esterilizados al autoclave, a 15 libras de presión por 15 minutos, medios de cultivo, matraces, tubos y conexiones. Las inoculaciones se hicieron utilizando cultivos de 24 horas a 48 horas y se incubaron durante 96 horas a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$  y pH constante ( 6.8-7.1 ). Después de este período de tiempo se tomaron muestras para determinar glucosa residual y concentración aproximada del aminoácido.

#### A.- Efecto de la agitación y la aereación:

Para este ensayo se utilizó el medio No 3, del cual se depositaron 50 ml en matraces Erlen-Meyer de 125 ml, en series de 4 matraces para ca-

da uno de los microorganismos en estudio. A una de las series se les pasó una corriente continua de aire estéril de 1.25 litros/minuto, otra serie fué agitada, la tercera serie se sometió a aereación y agitación combinadas y la cuarta serie se incubó en condiciones estáticas y sin aereación con fines de comparación. Se inocularon y se incubaron los matraces como se describió anteriormente.

En el caso de la isoleucina se observó que las condiciones más favorables con respecto a la producción de dicho aminoácido por microorganismos tales como: Rhodopseudomona gelatinosa, Leucostoc mesenteroides, y Saccharomyces ellipsoideus fueron cultivo estático, cultivo aereado-agitado y cultivo aereado-agitado respectivamente.

Estos resultados aparecen en la tabla No IV.

Para la lisina las condiciones más favorables con respecto a la producción de dicho aminoácido por microorganismos tales como: Proteus mirabilis, Arthrobacter simplex, y un hongo no identificado fueron: cultivo aereado-agitado, cultivo a

ereado-agitado y cultivo estático respectivamente.

Los resultados aparecen en la tabla No V.

Con respecto a la ornitina las mejores condiciones para la producción de dicho aminoácido - por diferentes microorganismos tales como: Leucostoc mesenteroides, Micrococcus caseolyticus y Erwinia chrysanthemi fueron: cultivo aereado-agitado, cultivo aereado-agitado y cultivo aereado - respectivamente.

Los resultados aparecen en la tabla No VI.

B.- Efecto de la concentración de glucosa.

Una vez establecidas las condiciones más favorables con respecto a la aereación y la agitación, se procedió a ensayar el efecto de la concentración de glucosa, con tal objeto se emplearon series de 4 matraces, para cada microorganismo en estudio, conteniendo el medio No 5 con las siguientes concentraciones de glucosa: 1%, 3%, 5% y 10%.

La inoculación e incubación se efectuó en las mismas condiciones que en el experimento anterior, determinándose posteriormente glucosa resi-

dual y concentración aproximada de aminoácido. Las tablas VII, VIII y IX muestran los resultados de este experimento.

C.- Efecto de la adición de fuentes de nitrógeno:

Para este estudio se utilizó un medio base consistente en polipeptona y agua (medio No 6), al cual se le agregó: glucosa en la concentración que, el experimento anterior nos indicó era la más favorable para cada microorganismo en estudio y las diferentes fuentes de nitrógeno estudiadas en proporción tal que el nitrógeno disponible se encontrase en la cantidad de 1.5 gramos/100ml. Se inoculó e incubó en las condiciones anteriormente expuestas.

Las fuentes de nitrógeno ensayadas fueron:

$NH_4Cl$ ,  $NH_4NO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $(NH_4)_2CO_3$ ,  $(NH_4)_3PO_4$  y Urea.

Los resultados obtenidos muestran que la producción de isoleucina no fué estimulada por ninguna de las fuentes de nitrógeno ensayadas para los diferentes microorganismos, mientras que la lisina y ornitina mostraban un aumento más ó menos considerable para determinados microorganismos y dife -

rentes fuentes de nitrógeno.

Los resultados obtenidos aparecen en las tablas X, XI y XII respectivamente.

D.- Efecto de la adición de precursores:

Para este experimento se ensayaron diferentes aminoácidos tales como: Acido Aspártico y Acido Glutámico, con el fin de observar si el primero de ellos era transformado en lisina ó isoleucina, ó bien si el Acido glutámico era convertido en ornitina, por acción de los diferentes microorganismos en determinadas condiciones.

Para este estudio se utilizó un medio base consistente en polipeptona, ácido aspártico ó ácido glutámico y agua ( medios 7 y 8 ), al cual se le agregó glucosa en la concentración más favorable para cada microorganismo en estudio.

Se emplearon matraces Erlen-Meyer de 125 ml- conteniendo 50 ml del medio correspondiente. Se esterilizaron en el autoclave a 15 libras de presión- durante 15 minutos. Se inocularon con 2 ml de cultivo de 24 - 48 horas del microorganismo correspondiente el cual fué incubado a una temperatura de —

28°C - 30°C y agitado a 100 r.p.m. Los matraces se incubaron durante 96 horas a la misma temperatura.

En este experimento se utilizó como precursor el ácido aspártico, concluyéndose que solo era efectivo en el caso de la lisina.

Posteriormente se utilizó el medio No 8, en el cual el ácido glutámico es el precursor ensayado para el caso de la ornitina.

El resultado obtenido al utilizar dicho precursor no fué satisfactorio.

Los resultados pueden observarse detalladamente en las tablas XIII, XIV y XV respectivamente.

Los resultados nos revelan que la mayor concentración de aminoácido se obtuvo bajo las siguientes condiciones para cada microorganismo.

Rhodopseudomona gelatinosa:

Cultivo estático

Concentración de glucosa: 3%

Fuentes de nitrógeno : peptona, extracto de levadura

Concentración de isoleucina:  $\approx 0.0125\text{g}/100\text{ml}$

Leuconostoc mesenteroides:

Cultivo aereado-agitado

Concentración de glucosa: 1%

Fuente de nitrógeno: peptona, extracto de-  
levadura.Concentración de isoleucina:  $\approx 0.0125$  g/100mlSaccharomyces ellipsoideus: ~~donde se encuentra?~~

Cultivo aereado-agitado

Concentración de glucosa: 5%

Fuente de nitrógeno: peptona, extracto de-  
levadura.Concentración de isoleucina:  $\approx 0.0125$ g/100mlHongo no identificado: ¿DCM?

Cultivo estático

Concentración de glucosa: 10%

Fuente de nitrógeno:  $NH_4NO_3$ Concentración de lisina:  $\approx 0.0125$ g/100mlProteus mirabilis:

Cultivo aereado-agitado

Concentración de glucosa: 5%



Fuente de nitrógeno:  $NH_4NO_3$

Concentración de lisina:  $\approx 0.0125g/100ml$

Arthrobacter simplex:

Cultivo aereado-agitado

Concentración de glucosa: 5%

Fuente de nitrógeno:  $NH_4NO_3$

Concentración de lisina:  $\approx 0.0125g/100ml$

Leuconostoc mesenteroides:

Cultivo aereado-agitado

Concentración de glucosa: 10%

Fuente de nitrógeno: peptona, extracto de-  
levadura

Concentración de ornitina:  $\approx 0.0125g/100ml$

Micrococcus caseolyticus:

Cultivo aereado-agitado

Concentración de glucosa: 5%

Fuente de nitrógeno:  $NH_4Cl$  ó  $NH_4NO_3$

Concentración de ornitina:  $\approx 0.0125g/100ml$

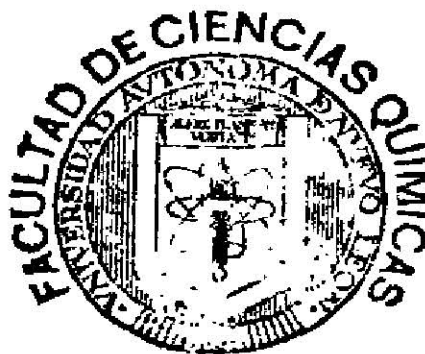
Erwinia chrysanthemi:

Cultivo aereado

Concentración de glucosa: 3%

Fuente de nitrógeno:  $\text{NH}_4\text{Cl}$

Concentración de ornitina:  $\approx 0.00625\text{g}/100\text{ml}$



DEPTO. DE FARMACOBIOLOGIA

#### IV. - D I S C U S I O N Y C O N C L U S I O N E S

Los datos obtenidos nos revelan que los mi  
croorganismos productores de los aminoácidos en-  
estudio se encuentran ampliamente distribuidos -  
en la naturaleza, pero que la cantidad de amino  
ácido producido es mínima.

Las tablas IV, V y VI nos muestran que en-  
general la aereación y agitación combinadas pro-  
ducen un mayor rendimiento en la producción de -  
los aminoácidos en estudio.

En cuanto al efecto de la concentración de  
glucosa sobre la producción de los aminoácidos -  
se concluye que es muy variable, pues en algunos  
casos es favorable y en otros no lo es.

Respecto al efecto de la adición de las di  
ferentes fuentes de nitrógeno, los datos experi-  
mentales obtenidos nos llevan a una conclusión, -  
ya que para algunos microorganismos la adición -  
es notoriamente desfavorable, mientras que en al  
gunos otros dicha adición fué acompañada de pe -  
queños incrementos.

El empleo de los precursores ensayados mostró que, en el caso de la lisina el período de incubación necesario para su producción disminuía notablemente y aumentaba la cantidad de aminoácido producido.

Esto nos permite concluir que, en este caso, los microorganismos en estudio siguen el camino metabólico universalmente aceptado para la lisina.

En cuanto al caso de la producción de isoleucina y ornitina, el empleo de precursores tuvo resultados negativos, sin embargo el número de precursores empleados no nos permiten asegurar que puedan obtenerse resultados satisfactorios con estos aminoácidos.

## V.- R E S U M E N

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio que, sobre la producción de isoleucina, lisina y ornitina por algunos microorganismos, tienen la aereación, agitación, aereación-agitación y cultivo estático; fuentes de nitrógeno, concentración de glucosa y algunos precursores.

Se emplearon 90 microorganismos de los cuales 8 produjeron cantidades apreciables de los aminoácidos en estudio.

Los resultados nos revelan que las condiciones bajo las cuales se obtuvo la mayor concentración de aminoácido varían para cada microorganismo.

En general podemos decir que la única condición común parece ser la aereación y la agitación combinadas, ya que los demás factores tienen efectos diversos sobre los diferentes microorganismos estudiados.

Se hace notar la importancia que tendría el hacer un estudio más completo respecto al empleo de precursores en el caso de isoleucina y ornitina.

## VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- BOBBITT, J.M. : " Thin-Layer Chromatography " - Reinhold Publishing Corporation. Chapman Hall, Ltd., London. (1963)
- 2.- BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. and SMITH, N.R.: " Bergey's Manual of Determinative Bacteriology " 7th Ed. The Williams & Wilkins Company. - Baltimore Maryland (1957)
- 3.- BRENNER, M. y NIEDERWIESER, A.: " Dunnschicht - Chromatographie von Aminosäuren " *Experientia*, - Basel, 16(8), 378-83, 1960.
- 4.- COOK, E.F., MARTIN, E.W.: " Farmacia Práctica - de Remington " Unión tipográfica Editorial Hispano-Americano, México (1953)
- 5.- DULANEY, E.L.: " Formation of extracellular Lysine by *Ustilago maydis* and *Gliocladium* sp., - *Can. Jour. Microbiol.*, 3:467-76 (1957)
- 6.- FIESER, L.F. Y FIESER, M. : " Química Orgánica " 2a Ed. Editorial Grijalbo, S.A. México, D.F. - (1960)
- 7.- GALE, E.F.: " Determination of Amino Acids by - Use of Bacterial Amino Acids Decarboxilases, Me

- thodos of Biochemical Analysis " Interscience - Publishers, Inc., New York, IV, 285-306 (1957)
- 8.- GREINSTEIN, J.P. and WINITZ, M.: " Chemistry - of the Amino Acids " III, 2043-52, 2098, 1842.
- 9.- HACKMAN, R.H. and LAZARUS, M.: " Quantitative- Analysis of aminoacids using paper chromatogra<sub>ph</sub>y " Austral. J. biol. Sci., 9, No2, 281-82 - (1956)
- 10.- HARVATH, I., GODO, I. and SZENTIRMAJ, A.: " - " Formation of isoleucine from threonine by - Streptomyces rimosus " J. Bacteriol. 78, 293 - (1959)
- 11.- HEBER, U.: " Ubereine neu Methode zur quantita<sub>t</sub>iven Stoffbestimmung direkt am Papier Chroma- togramm, insbesondere zur Analyse von Aminosäu<sub>re</sub>-und Zuckergemischem " Z. anal. Chem. 161 - (6), 409-21, (1958)
- 12.- HILLER, E., ZINNERT, F. and FRESE, G.: " Ein - Beitrag zur quantitativen Bestimmung von amino<sub>s</sub>äuren in Papier Chromatogrammen " Biochem. Z., Dtsch. No 4, 245-50, 323 (1952)
- 13.- HIMES, J.B. and METCALFE, L.D.: " Rapid quanti<sub>t</sub>



- tative determination of aminoacids by high temperature paper chromatography " *Analyt. Chem.*, 31 (7), 1192-4 (1959)
- 14.- KINOSHITA, S.: " *Advances in Applied Microbiology* " Tome 1, 208-11, (1959)
- 15.- KINOSHITA, S., NAKAYAMA, K. and KITADA, S.: - " *L-lysine manufacture by fermentation* " *Japan*, 6499 (1961)
- 16.- KINOSHITA, S., NAKAYAMA, K., UDAKA, S. and KITADA, S.: " *L-ornithine manufacture by fermentation* " *U.S.* 2, 988, 489 (1961).
- 17.- KLATZKEN, C. : " *Quantitative determination of aminoacids separated by paper partition chromatography* " *Nature*, G.B. 169, No 4297, 422, - (1952)
- 18.- LAGUNA, J.: " *Bioquímica* " Editorial Fournier, S.A. México, D.F. (1962)
- 19.- LEPPER, H.A.: " *A.O.A.C.* " Editorial Board, - 7th. Ed. (1960)
- 20.- MENKE, K.H.: " *Zur photometrischen Auswertung von Farbreaktionen auf Papier. Ein einfaches Verfahren zur quantitative Aminosäurenbesti* -

- mmung " *Z. Anal. Chem.* 172 (6), 423-8, (1960)
- 21.- MORRIS, D.L.: " Quantitative Determination of carbohydrates with Dreywood's Anthrone reagent " *Science* 107, 254-55. (1948)
- 22.- MUTSCHELER, E. y ROCHELMAYER, H. : " Über der-tremung von Aminosäuren mit Hilfe der Dünnsch-Chromatographie " *Arch. Pharm.* 292 (8/9), 449-52, (1959).
- 23.- MYERS, W.: " Dhydroxi-acid-dehydrase: an enzy-me involved in the biosynthesis of isoleucine-and valine " *J. biol. Chem.*, 236 (5), 1414-8 - (1961)
- 24.- PELCZAR, M.J., HANSEN, P.A. and KONETZKA, W.A.: " Quantitative Bacterial Physiology Laboratory-Experiments " Burges Publishing Co. Minneapo-lis 15, Minnesota. 4 th. Printing (1960)
- 25.- PORTER, C.A., MARGOLIS, D. and SHARP, D.: " Quantitative determination of aminoacids by-paper chromatography " *Contr. Boyce Thompson - Inst.*, 18; 465-76 (1957)
- 26.- PRESCOTT, S.C. and DUNN, C.G.: " Industrial - Microbiology " 3th. Ed. Mc. Graw-Hill Book Co.

New York (1959)

- 27.- RHULAND, L.E. and HAMILTON, R.D.: " The functional pathway of lysine biosynthesis in *E. coli* " *Biochem-biophys Acta*, 51 (3), 525-8 (1961)
- 28.- RICHARDS, M. and HASKINS, R.H.: " Extracellular lysine production by various fungi " *Can. Jour. Microbiol.*, 3: 543-46 (1957)
- 29.- SIBOLLE, S.M. and RADY, N.V.: " Determination of lysine, arginine and histidine by high temperature paper chromatography " *Analyt. Chem.*- 33 (9), 1223-4 (1961)
- 30.- SKERMAN, V.B.D.: " A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria " The Williams & Wilkins Co. Baltimore Maryland (1959)
- 31.- SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGY. " Manual of Microbiological Methods " Mc. Graw-Hill Book Co. Inc. New York (1957)
- 32.- SUKHINKO, F.T., PADGAINAYA, E.S.: " The utilization of arginine by some fungi " *Izvest. Seber. Othel., Akad. Nauk. S.S.S.R.*, No 8 96 - 106 (1959)
- 33.- TSUKAMOTO, T., KOMONI, T. and INONE, Y.: " Mi-

croanalysis by Amino Acids IV. Quantitative estimation by paper-partition chromatography".-  
*Journal of chromatography*, 9, No 2 (1963)

- 34.- VOGEL, H.J., ABELSON, P.H. and BOLTON, E.T. :-  
" On ornithine and proline synthesis in *E. coli* " *Biochem. Biophys. Acta.* 11., No 4, 584-5-  
(1953)

TABLA I. Producción de aminoácidos.

Microor- ganismos	48 horas de incubación			96 horas de incubación		
	Iso	Lis	Orni	Iso	Lis	Orni
14	-	-	-	-	+	-
16	-	-	-	-	-	+
23	-	-	-	+	+	+
25	-	-	-	+	-	-
27	-	-	-	+	-	+
32	-	-	+	+	+	+
35	-	-	-	-	-	+
35N	-	+	-	-	+	-
41	+	-	-	-	-	-
44	+	-	-	-	-	-
45	-	-	-	+	-	+
49	-	-	-	-	+	-
50	-	-	-	+	+	+
62	-	-	-	-	+	-
63	-	+	-	-	-	-
64	-	-	-	+	+	-
65	-	-	-	-	-	+
67	-	+	-	-	+	+
68	-	-	-	+	-	-
73	-	-	-	-	+	-
74	+	-	-	-	-	+
79	+	-	-	+	-	-
6276	+	-	-	-	-	-
9248	+	-	-	-	-	-

ABREVIATURAS:

Iso = Isoleucina.

Lis = Lisina.

Orni = Ornitina.

CONDICIONES:

pH del medio de cultivo: 6.8-7.1

Temperatura: 28°C - 30°C

Agitación: 100 r.p.m.

TABLA II. Microorganismos Aislados y Clasificados.

No.	Microorganismo	Procedencia
✓23	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Tierra
25	<u><i>Rhodopseudomona gelatinosa</i></u>	<u>Agua de deshecho</u>
27	<u><i>Leuconostoc mesenteroides</i></u> ←	<u>Alimentos</u> ?
✓28	<i>Micrococcus caseolyticus</i> ←	<u>Alimentos</u>
44	<i>Proteus vulgaris</i>	Agua de deshecho
✓45	<i>Staphylococcus aureus</i>	Aire
49	<i>Proteus mirabilis</i>	Estiércol
50	<i>Micrococcus varians</i>	Estiércol
62	<i>Arthrobacter simplex</i>	Tierra
✓65	<i>Erwinia chrysanthemi</i> ←	<u>Tierra</u>
✓67	<i>Mycococcus luteus</i>	Tierra
68	<i>Pseudomonas fluorescens var immobilis</i>	Tierra
73	<u><i>Proteus mirabilis</i></u>	<u>Tierra</u>
✓74	<i>Bacillus sphaericus</i>	Tierra

ABREVIATURAS :

No. = Número.



DEPTO. DE FARMACOBIOLOGIA

TABLA III. Microorganismos Seleccionados.

Microorganismos	Aminoácidos		
	Isoleucina	Lisina	Ornitina
<i>Rhodopseudomona gelatinosa</i>	+	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-	+
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-
<i>Hongo no identificado</i>	-	+	-
<i>Arthrobacter simplex</i>	-	+	-
<i>Micrococcus caseolyticus</i>	-	-	+
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-	-	+

CONDICIONES:

pH del medio de cultivo: 6.8 - 7.1

Temperatura : 28°C - 30°C

Agitación : 100 r.p.m.

Período de incubación : 96 horas.

**TABLA IV.** Efecto de las condiciones de aereación, agitación, aereación-agitación y cultivo estático sobre la producción de Isoleucina.

Microorganismos	Condiciones	Conc. del aminoácido en g/100ml
<i>Rhodopseudomona gelatinosa.</i>	Aereación	Neg.
	Agitación	Neg.
	Aereación-Agitación	Neg.
	Cultivo estático	≈ 0.00625.
<i>Leuconostoc mesenteoides</i>	Aereación	Neg.
	Agitación	Neg.
	Aereación-Agitación	≈ 0.00625.
	Cultivo estático	Neg.
<i>Saccharomyces ellipticoideus</i>	Aereación	Neg.
	Agitación	Neg.
	Aereación-Agitación	≈ 0.0125
	Cultivo estático	Neg.

**ABREVIATURAS:**

Conc. = Concentración  
g = gramos  
Neg = Negativo

**CONDICIONES:**

pH del medio de cultivo 6.8 - 7.1  
Temperatura : 28°C - 30°C.  
Período de incubación : 96 horas  
Aereación: 1.25 litros/ minuto  
Agitación: 100 r.p.m.



*TABLA V. Efecto de las condiciones de aereación, agitación, aereación-agitación y cultivo estático sobre la producción de lisina.*

<i>Microorganismos</i>	<i>Condiciones</i>	<i>Conc. del aminoácido en g/100ml</i>
<i>Hongo no identificado</i>	<i>Aereación</i>	<i>Neg.</i>
	<i>Agitación</i>	<i>Neg.</i>
	<i>Aereación-Agitación</i>	<i>Neg.</i>
	<i>Cultivo estático</i>	<i>≈ 0.00625</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Aereación</i>	<i>Neg.</i>
	<i>Agitación</i>	<i>Neg.</i>
	<i>Aereación-Agitación</i>	<i>≈ 0.00625</i>
	<i>Cultivo estático</i>	<i>Neg.</i>
<i>Arthrobacter simplex</i>	<i>Aereación</i>	<i>Neg.</i>
	<i>Agitación</i>	<i>Neg.</i>
	<i>Aereación-Agitación</i>	<i>≈ 0.00625</i>
	<i>Cultivo estático</i>	<i>Neg.</i>

**ABREVIATURAS:**

*Conc.* = *Concentración*  
*g* = *gramos*  
*Neg.* = *Negativo*

**CONDICIONES:**

*pH* del medio de cultivo: 6.8 - 7.1  
*Temperatura:* 28°C - 30°C  
*Aereación:* 1.25 litros/minuto  
*Agitación:* 100 r.p.m.

**TABLA VI. Efecto de las condiciones de aereación, agitación, aereación-agitación y cultivo estático sobre la producción de ornitina.**

<i>Microorganismos</i>	<i>Condiciones</i>	<i>Conc. del aminoácido en g/100ml</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Aereación</i>	<i>Neg.</i>
	<i>Agitación</i>	<i>Neg.</i>
	<u><i>Aereación-Agitación</i></u>	$\approx 0.00625$
	<i>Cultivo estático</i>	<i>Neg.</i>
<i>Micrococcus caseolyticus</i>	<i>Aereación</i>	<i>Neg.</i>
	<i>Agitación</i>	<i>Neg.</i>
	<u><i>Aereación-Agitación</i></u>	$\approx 0.00625$
	<i>Cultivo estático</i>	<i>Neg.</i>
} <i>Erwinia chrysanthemi</i>	<u><i>Aereación</i></u>	$\approx 0.00625$
	<i>Agitación</i>	<i>Neg.</i>
	<i>Aereación-Agitación</i>	<i>Neg.</i>
	<i>Cultivo estático</i>	<i>Neg.</i>

**ABREVIATURAS:**

*Conc.* = *Concentración*  
*g* = *gramos*  
*Neg* = *Negativo*

**CONDICIONES:**

*pH* del medio de cultivo: 6.8-7.1  
*Temperaturas:* 28°C - 30°C  
*Período de incubación:* 96 horas  
*Aereación:* 1.25 litros/minute.  
*Agitación:* 100 r.p.m.

**TABLA VII. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de Isoleucina.**

<i>Microorganismos</i>	<i>Condiciones</i>	<i>Conc. ini. de glucosa en %</i>	<i>Conc. de aminoácido en g/100ml</i>	<i>Glucosa residual en %</i>
		1	≈ 0.00625	0.2
<i>Rhodopseudomona</i>	<i>Cultivo</i>	3	≈ 0.0125	2.4
<i>gelatinosa</i>	<i>estático</i>	5	≈ 0.00625	3.6
		10	trazas	6.9
		1	≈ 0.0125	0.9
<i>Leuconostoc</i>	<i>Aeración-</i>	3	≈ 0.00625	1.95
<i>mesenteroides</i>	<i>Agitación.</i>	5	≈ 0.00625	3.95
		10	≈ 0.00625	9.1
		1	≈ 0.00625	0.2
<i>Saccharomyces</i>	<i>Aeración-</i>	3	≈ 0.00625	2.7
<i>ellipsoideus</i>	<i>Agitación</i>	5	≈ 0.0025	4.8
		10	≈ 0.00625	9.2

**ABREVIATURAS:**

*Conc.* = *Concentración.*

*ini* = *inicial*

*g* = *gramos*

**CONDICIONES:**

*pH* del medio de cultivo: 6.8 - 7.1

*Temperatura:* 28°C - 30°C

*Aeración:* 1.25 litros/minuto.

*Agitación:* 100 r.p.m.

*TABLA VIII. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de lisina.*

<i>Microorganismos</i>	<i>Condiciones</i>	<i>Conc. ini. de glucosa en %</i>	<i>Conc. de aminoácido en g/100ml</i>	<i>Glucosa residual en %</i>
<i>Hongo no identificado</i>	<i>Cultivo estático</i>	1	≈ 0.00625	0.95
		3	≈ 0.00625	2.7
		5	≈ 0.00625	4.2
		10	≈ 0.0125	6.95
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Aereación- Agitación</i>	1	<i>trazas</i>	0.1
		3	<i>trazas</i>	2.2
		5	≈ 0.00625	4.3
		10	<i>trazas</i>	9.2
<i>Arthrobacter simplex</i>	<i>Aereación- Agitación</i>	1	<i>trazas</i>	0.3
		3	<i>trazas</i>	2.4
		5	≈ 0.00625	4.4
		10	<i>trazas</i>	8.7

**ABREVIATURAS:**

*Conc.* = *Concentración.*  
*ini* = *inicial*  
*g* = *gramos*

**CONDICIONES:**

*pH del medio de cultivo:* 6.8 - 7.1  
*Temperaturas:* 28°C - 30°C  
*Periodo de incubación:* 96 horas  
*Aereación :* 1.25 litros/minuto  
*Agitación:* 100 r.p.m.

**TABLE IX. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de ornitina.**

Microorganismos	Condiciones	Conc. ini. de glucosa en %	Conc. de aminoácido en g/100ml	Glucosa residual en %	
		1	trazas	0.9	0.1
<i>Leuconostoc</i>	Aeración-	3	trazas	1.95	1.05
<i>mesenteroides</i>	Agitación	5	≈ 0.00625	3.95	1.05
		10	≈ 0.0125	9.1	.9
		1	trazas	0.4	.6
<i>Micrococcus</i>	Aeración-	3	trazas	2.7	.3
<i>caseolyticus</i>	Agitación	5	≈ 0.00625	3.9	1.1
		10	trazas	7.2	2.8
		1	trazas	0.4	.6
<i>Erwinia</i>	Aeración	3	≈ 0.00625	1.6	1.4
<i>chrysanthemi</i>		5	trazas	4.3	0.7
		10	trazas	8.3	1.7

**ABREVIATURAS:**

Conc. = Concentración  
ini = inicial  
g = gramos

**CONDICIONES:**

pH del medio de cultivo: 6.8 - 7.1  
Temperatura: 28°C - 30°C  
Período de incubación: 96 horas  
Aeración: 1.25 litros/minuto  
Agitación: 100 r.p.m.

TABLA I. Efecto de diversas fuentes de nitrógeno sobre la producción de isoleucina.

Microorganismo	Condiciones	Conc. ini	Fuentes de nitrógeno.	Conc. de aminoácido residual en g/100ml en %	Glucosa residual en %
<i>Rhodopseudomona gelatinosa</i>	Cultivo estático	3	$NH_4Cl$	Neg.	2.6
			$NH_4NO_3$	Neg.	2.2
			$(NH_4)_2CO_3$	Neg.	3.0
			$(NH_4)_2SO_4$	Neg.	2.1
			$(NH_4)_3PO_4$	Neg.	2.2
			Urea	Neg.	2.2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Aereación-Agitación.	1	$NH_4Cl$	Neg.	1.0
			$NH_4NO_3$	Neg.	0.2
			$(NH_4)_2CO_3$	Neg.	1.0
			$(NH_4)_2SO_4$	Neg.	1.0
			$(NH_4)_3PO_4$	Neg.	0.4
			Urea	Neg.	0.45
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	Aereación-Agitación	5	$NH_4Cl$	Neg.	4.9
			$NH_4NO_3$	Neg.	3.9
			$(NH_4)_2CO_3$	Neg.	4.4
			$(NH_4)_2SO_4$	Neg.	4.2
			$(NH_4)_3PO_4$	Neg.	4.5
			Urea	Neg.	4.3

ABREVIATURAS:

Conc. = Concentración.  
 ini = inicial.  
 g = gramos  
 Neg = Negativo

CONDICIONES:

pH del medio de cultivo: 6.8 - 7.1  
 Temperatura: 28°C - 30°C.  
 Período de incubación: 96 horas  
 Aereación : 1.25 litros/minuto  
 Agitación: 100 r.p.m.

TABLA XI. Efecto de diversas fuentes de nitrógeno sobre la producción de ornitina.

Microorganismos	Condiciones	Conc. ini. en %	Fuentes de nitrógeno.	Conc. de aminoácido residual en g/100ml en %	Glucosa residual en %
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Aeración-Agitación.	10	$NH_4Cl$	Neg.	10.0
			$NH_4NO_3$	$\approx 0.00625$	9.0
			$(NH_4)_2CO_3$	trazas	8.2
			$(NH_4)_2SO_4$	Neg.	10.0
			$(NH_4)_3PO_4$	Neg.	7.2
			Urea	Neg.	10.0
<i>Micrococcus caseolyticus</i>	Aeración-Agitación	5	$NH_4Cl$	$\approx 0.0125$	4.1
			$NH_4NO_3$	$\approx 0.0125$	3.0
			$(NH_4)_2CO_3$	Neg.	5.0
			$(NH_4)_2SO_4$	trazas	2.5
			$(NH_4)_3PO_4$	trazas	2.4
			Urea	Neg.	3.1
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Aeración	3	$NH_4Cl$	$\approx 0.00625$	2.2 .9
			$NH_4NO_3$	Neg.	2.9
			$(NH_4)_2CO_3$	Neg.	2.6
			$(NH_4)_2SO_4$	Neg.	2.85
			$(NH_4)_3PO_4$	Neg.	2.4
			Urea	Neg.	2.8

ABREVIATURAS:

Conc. = Concentración.  
ini = inicial  
g = gramos  
Neg. = Negativo

CONDICIONES:

pH del medio de cultivo: 6.8 - 7.1  
Temperatura: 28°C - 30°C  
Período de incubación: 96 horas  
Aeración: 1.85 litros/minuto.  
Agitación: 100 r.p.m.

**TABLA XII. Efecto de diversas fuentes de nitrógeno sobre la producción de lisina.**

Microorganismos	Condiciones	Conc. ini. de glucosa en %	Fuentes de nitrógeno.	Conc. de aminoácido en g/100ml	Glucosa residual en %
<i>Hongo no identificado</i>	Cultivo estático	10	$NH_4Cl$	Neg.	7.5
			$NH_4NO_3$	≈ 0.0125	7.3
			$(NH_4)_2CO_3$	Neg.	9.7
			$(NH_4)_2SO_4$	Neg.	7.4
			$(NH_4)_3PO_4$	trazas	6.5
			Urea	Neg.	9.5
<i>Proteus mirabilis</i>	Aeración Agitación	5	$NH_4Cl$	Neg.	5.0
			$NH_4NO_3$	≈ 0.00625	4.0
			$(NH_4)_2CO_3$	Neg.	4.6
			$(NH_4)_2SO_4$	Neg.	3.3
			$(NH_4)_3PO_4$	Neg.	3.5
			Urea	Neg.	4.6
<i>Arthrobacter simplex</i>	Aeración- Agitación	5	$NH_4Cl$	Neg.	1.7
			$NH_4NO_3$	≈ 0.0125	2.4
			$(NH_4)_2CO_3$	trazas	4.1
			$(NH_4)_2SO_4$	trazas	2.0
			$(NH_4)_3PO_4$	trazas	3.9
Urea	Neg.	4.5			

**ABREVIATURAS:**

Conc. = Concentración.  
ini = inicial  
g = gramos  
Neg. = Negativo.

**CONDICIONES:**

pH del medio de cultivo: 6.8 - 7.1  
Temperaturas: 28°C - 30°C  
Período de incubación: 96 horas.  
Aeración: 1.25 litros/minuto  
Agitación: 100 r.p.m.



**TABLA XIII. Efecto de la adición de precursores sobre la producción de isoleucina.**

Microorganismos	Condiciones	Conc. ini. de glucosa en %	Precursor	Tiempo en horas	Conc. de aminoácido residual en g/100ml en %
Rhodospseudomona gelatinosa	Cultivo estático	3	Acido Aspártico	24	Neg.
				48	Neg.
				72	Neg.
				96	Neg. 1.8
Leuconostoc mesenteroides	Aeración-Agitación	1	Acido Aspártico	24	Neg.
				48	Neg.
				72	Neg.
				96	Neg. 0.25
Saccharomyces ellipsoideus	Aeración-Agitación	5	Acido Aspártico	24	Neg.
				48	Neg.
				72	Neg.
				96	Neg. 4.1

**ABREVIATURAS:**  
 Conc. = Concentración.  
 ini = inicial.  
 g = gramos  
 Neg. = Negativo

**CONDICIONES:**  
 pH del medio de cultivo: 6.8-7.1  
 Temperatura: 28°C - 30°C  
 Periodo de incubación: 96 horas  
 Aeración: 1.25 litros/minuto  
 Agitación: 100 r.p.m.

TABLA XIV. Efecto de la adición de precursores sobre la producción de lisina.

Microorganismos	Condiciones	Conc. ini. de glucosa en %	Precursor	Tiempo en horas	Conc. de aminoácido residual en g/100ml en %	Glucosa residual en %
<i>Hongo no identificado</i>	Cultivo estático	10	Acido Aspártico	24	Neg.	
				48	Neg.	
				72	trazas	
				96	≈ 0.00625	6.7
<i>Proteus mirabilis</i>	Aeración-Agitación	5	Acido Aspártico	24	≈ 0.05	
				48	≈ 0.05	
				72	≈ 0.1	
				96	≈ 0.1	3.4
<i>Arthrobaacter simplex</i>	Aeración-Agitación	5	Acido Aspártico	24	≈ 0.0125	
				48	≈ 0.0250	
				72	≈ 0.1	
				96	≈ 0.05	4.0

ABREVIATURAS:

- Conc. = Concentración.
- ini = inicial
- g = gramos
- Neg. = Negativo.

CONDICIONES:

- pH del medio de cultivo: 6.8-7.1
- Temperatura: 28°C - 30°C
- Período de incubación: 96 horas
- Aeración: 1.25 litros/ minuto
- Agitación: 100 r.p.m.

TABLE XV. Efecto de la adición de precursores sobre la producción de ornitina.

Microorganismos	Condiciones	Conc. int. de glucosa en %	Precursor	Tiempo en horas	Conc. de aminoácido residual en g/100ml en %
Leuconostoc mesenteroides	Aeración-	10	Acido	24	Neg.
	Agitación		Glutámico	48	Neg.
				72	Neg.
				96	Neg. 8.2
Micrococcus caseolyticus	Aeración-	5	Acido	24	Neg.
	Agitación		Glutámico	48	Neg.
				72	Neg.
				96	Neg. 4.4
Erwinia chrysanthemi	Aeración	3	Acido	24	Neg.
			Glutámico	48	Neg.
				72	Neg.
				96	Neg. 0.9

ABREVIATURAS:

- Cono. = Concentración.
- int = inicial
- g = gramos
- Neg. = Negativo

CONDICIONES:

pH del medio de cultivo: 6.8-7.1  
 Temperatura: 28°C - 30°C  
 Período de incubación: 96 horas  
 Aeración: 1.25 litros/minuto  
 Agitación: 100 r.p.m.



