

**DOS TIPUS DE SEGREGACIÓ D'AMINOÀCIDS  
PER UN COLIFORM  
(*ESCHERICHIA INTERMEDIA C3*)**

Comunicació presentada el dia 20 d'abril de 1967 per

**R. CLOTET i BALLÚS**

Professor ajudant del Departament de Microbiologia de la Facultat  
de Ciències de la Universitat de Barcelona

i

**R. PARÉS i FARRÀS**

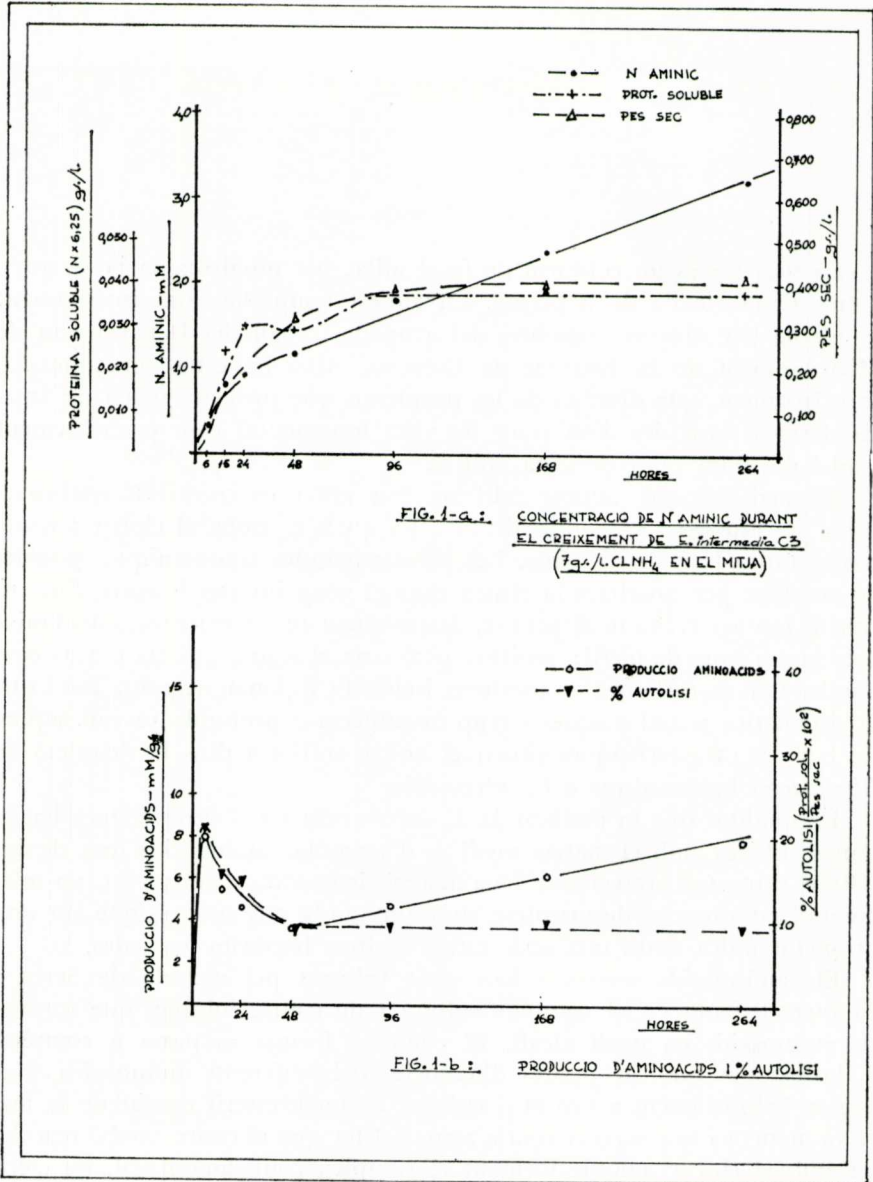
Professor de Microbiologia de la Facultat de Ciències  
de la Universitat de Barcelona

La soca C<sub>3</sub> és un coliform no fecal aïllat per nosaltres, fa ja sis anys, d'una aigua colada de paperera. En aquest temps ha estat intensament estudiada per diversos membres del grup de treball del Departament de Microbiologia de la Facultat de Ciències. Això ha estat conseqüència, principalment, que diverses de les propietats que presenta tenen un interès destacat tant des d'un punt de vista fonamental com probablement també des d'un punt de vista aplicat.

El medi en què aquest coliform fou aïllat és constituït exclusivament per glucosa i sals minerals, dins les quals es troba el clorur amònic com a única font de nitrogen. Les característiques taxonòmiques posades de manifest per nosaltres la situen dins el grup intermedi entre *Escherichia* i *Aerobacter*. Com el primer, desenvolupa una fermentació àcid-mixt dels sucres (roig de metil: positiu), però com el segon, utilitza citrats com a única font de carboni i no produeix indol. És Eijkman negatiu. Tot i que la sistemàtica actual d'aquests grup és subjecta a profunda revisió, aquestes i altres característiques situen el nostre coliform dins la definició de *Citrobacter intermedium* o *E. intermedia*.

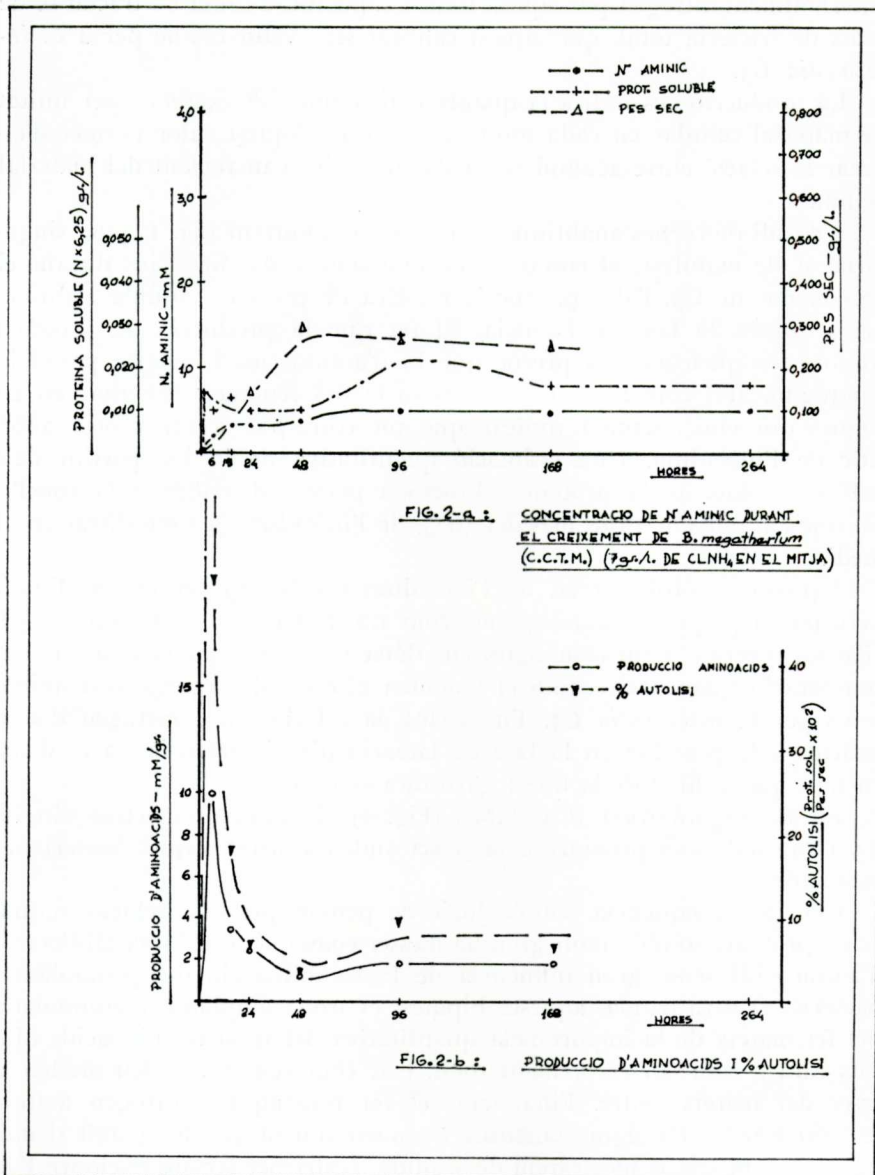
La qualitat que fa destacar la *E. intermedia* C<sub>3</sub> d'altres soques bacterianes aïllades amb el mateix medi és d'acumular aminoàcids fora de les cèl·lules durant el creixement. Una anàlisi sistemàtica d'aquest fet, no solament el posà ben bé de manifest, sinó que també ens ensenyà que era una propietat única entre una sèrie estesa d'altres bacteries assajades.

Els aminoàcids segregats han estat valorats pel mètode de SPIES i CHAMBERS, basat en el complex colorejat de coure, soluble, que formen els aminoàcids en medi alcalí. El complex format es passa a complex d'alanina per unificar petites diferències dels diferents aminoàcids, i es llegeix l'absorbiment a 620 m  $\mu$  enfront de medi estèril tractat de la mateixa manera i que serveix com a zero. Pel fet que el coure també reacciona amb el clorur amònic formant el complex coure-amoniacal, de color blau igualment, ha calgut realitzar una correcció del color. Aquesta correcció és possible perquè en tot cas el color d'interferència degut a l'amoniac és més petit que el degut als aminoàcids, tot i trobar-se en una proporció netament inferior. No seria, en canvi, possible d'utilitzar altres mètodes colorimètrics com el que fa ús de la ninhidrina.



El creixement s'ha seguit per l'evolució del pes sec determinat després de centrifugació i rentats a 4.000 r. p. m. i posterior assecatge a 105° C durant 48 hores.

La proteïna soluble (autòlisi) s'ha determinat turbidimètricament, a



620 m $\mu$ , precipitant-la amb àcid tricloracètic 3M en presència de sulfat amònic. A causa de l'ínfima quantitat existent no es pot valorar directament el nitrogen del precipitat. Per fer-ho s'ha actuat indirectament realitzant un lisat, amb lisozima, de *M. lysodeikticus* i calibrant la relació

enterboliment-nitrogen per aquest lisat, i suposant, a causa de tractar-se de lisats de bactèria total, que aquest calibrat serà vàlid també per a *E. intermèdia C3*.

La producció ens indica la quantitat d'aminoàcids excretats per unitat de material cel·lular en cada punt de la corba. Aquest valor permet d'estimar la relació entre acumulament d'aminoàcids i increment del material cel·lular.

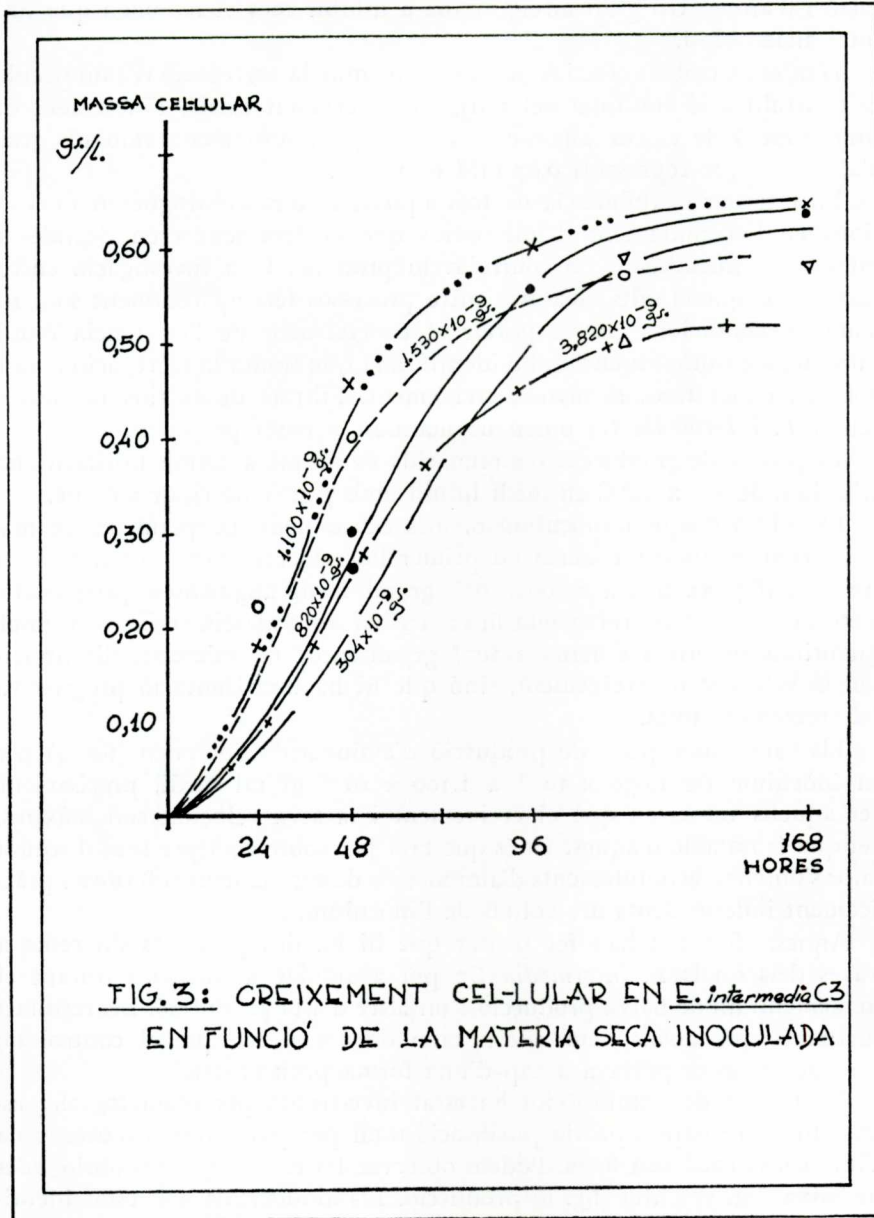
L'estudi de corbes analítiques com les que mostrem (fig. 1) posa singularment de manifest, al costat de l'acumulament d'aminoàcids durant el creixement de *C3*, l'alta producció relativa de proteïna soluble i aminoàcids durant la fase de latència. El fet que la producció de proteïna soluble fos quelcom més precoç que la d'aminoàcids i sempre paral·lela a aquesta, així com la mateixa constància del fenomen (estudiat en 20 soques diferents), sembla indicar que tot correspon a un procés autolític de l'inòculum. Una estimació quantitativa de la lisi partint dels valors absoluts de la proteïna alliberada permet d'arribar a la conclusió que en molts de casos més del 50 % de l'inòculum és solubilitzat en el medi.

Aquesta autòlisi parcial de l'inòculum no és cap fet extraordinari, però potser poques vegades apareix com ara dins un resultat d'unes experiències precises. Sigui com sigui, ens dóna peu per a poder establir una comparació quantitativa amb el fenomen ulterior de segregació d'aminoàcids per *E. intermedia C3*. En efecte: la relació entre nitrogen d'aminoàcids i de proteïna en la fase de latència d'*E. intermedia C3* és d'1,5, en tant que al final de la fase logarítmica és de 67.

En *B. megatherium* (C.C.T.M.) (Fig. 2) els valors respectius són de 3,5 i 10, molt més pròxims, com passa amb les altres soques bacterianes estudiades.

Com a conseqüència sembla lògic de pensar que una relació aminoàcids/proteïna soluble molt gran ha d'ésser conseqüència d'una alliberació d'aminoàcids sense gran influència de la solubilització del protoplasma bacterià. D'altra banda, aquesta hipòtesi es troba amplament apuntalada pel fet mateix de la importància quantitativa del total d'aminoàcids lliurats cara a cara del creixement total, car, com veurem, poden arribar a ésser del mateix ordre. Finalment, el fet que aquest nitrogen amínic d'*E. intermedia C3* sigui constituït fonamentalment per un parell d'aminoàcids, com també mostrarem de seguida, acaba per fer-nos excloure l'alternativa que fossin el resultat d'autòlisi.

Aquest acumulament d'aminoàcids en el medi pot ésser pràcticament suprimit sense afectar el creixement d'*E. intermedia C3*, si hom abaixa la concentració de clorur amònic a valors de l'ordre d'1 gr/1. Són condicions que disminueixen molt la segregació d'aminoàcids, sense arribar a



anullar-la, el creixement anaeròbic i també un fort aireig. Aquest últim efecte s'ha observat tant en cultiu en repòs en ampelles ROUX com en cultiu en fermentador de laboratori sota condicions ben controlades d'agi-

tació i d'aireig. Un gran aireig arriba a inhibir més el fenomen que una total anaerobiosi.

Han estat trobats efectius per a incrementar la segregació d'aminoàcids, la neutralització contínua del mitjà amb carbonat càlcic, l'increment de concentració de clorur amònic fins a 14 gr/1, juntament amb un grau d'aerobiosi que representi 0,07 mM  $O_2/1$  min.

En estudiar la influència de tots aquests factors s'obtingueren fluctuacions en l'acumulament d'aminoàcids que evidentment eren degudes a causes que inicialment no controlàvem prou bé. Una investigació entretinguda d'aquests salts aleatoris entre processos fets aparentment sota les mateixes condicions ens va portar al coneixement de l'existència d'una substància autotòxica encara no identificada que limita la segregació d'aminoàcids, i més tard, el mateix creixement. Filtrats de cultius massius o vells d'*E. intermedia* C3 posen de manifest aquesta propietat.

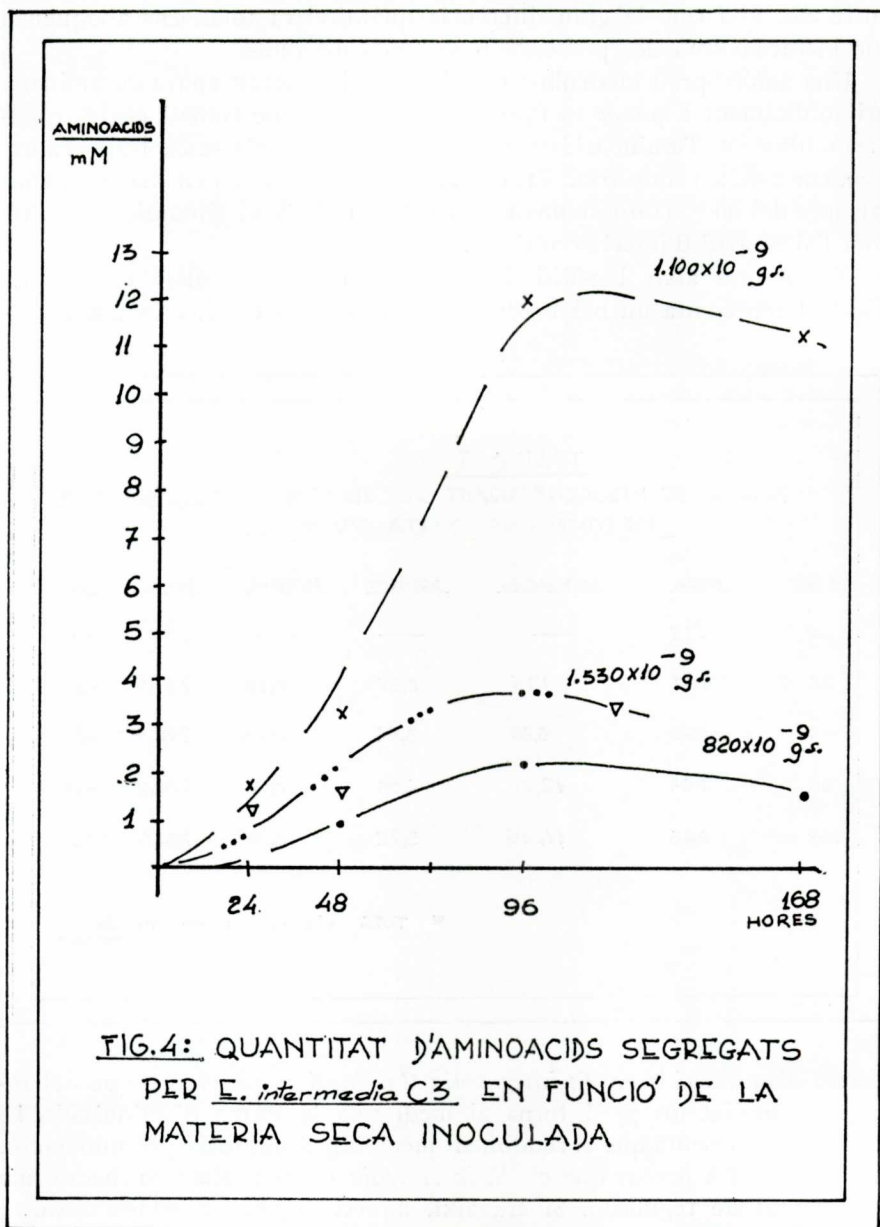
El procés de producció d'aminoàcids és portat a terme utilitzant un inòculum de 48<sup>h</sup> a 30° C en medi líquid amb 7 gr/1 de clour amònic.

El volum d'aquest inòculum o, més exactament, la quantitat de material celular inoculat afecta en primer lloc el creixement total. Inòculs creixent (fig. 3), fins a  $1.100 \times 10^{-9}$  gr/ml medi augmenten progressivament la velocitat de creixement fins a arribar a un mateix creixement final. Quantitats superiors a  $1.100 \times 10^{-9}$  gr/ml medi no solament disminueixen la velocitat de creixement, sinó que hi ha una limitació progressiva del creixement total.

Els valors més grans de producció d'aminoàcids s'obtenen (fig. 4) per un inòculum de  $1.050 \times 10^{-9}$  a  $1.100 \times 10^{-9}$  gr/ml medi, precisament per aquells valors en què el creixement i la seva velocitat són màxims, i el que és notable d'aquest fet és que tant per sobre com per sota d'aquest valor s'obtenen acumulaments d'aminoàcids destacadament inferiors i pràcticament independents del volum de l'inòculum.

Aquests fets ens han fet pensar que hi ha dos processos diferents a través dels quals *E. intermedia* C3 pot acumular aminoàcids durant el creixement, un de baixa producció i un altre d'alta producció. Els resultats fluctuants que abans hem referit eren deguts al fet que el control de l'inòculum no es portava a cap d'una forma prou crítica.

La natura dels aminoàcids ha estat investigada per cromatografia ascendent sobre paper, prèvia purificació total per pas a través d'una reïna d'intercanvi catiònica forta. Podem observar les cromatografies obtingudes en baixa (fig. 5) i alta (fig. 6) producció. Els aminoàcids han estat identificats com: 1, alanina; 2, àcid glutàmic; 3, àcid aspàrtic; 4 i 5, aminoàcids bàsics. La contribució relativa de cada un d'ells al valor total de nitrogen amínic s'ha realitzat per extracció de la taca amb acetona-aigua i lectura de la seva absorció a 570 m $\mu$ , comparant amb l'extinció del total de totes



les taques. En la baixa producció el percentatge d'alanina és del 44 %, mentre que en l'alta és d'un 71 %. Tant la diferent distribució dels aminoàcids en baixa i alta producció (figs. 5 i 6), com la diferent proporció



entre ells, així com la gran diferència quantitativa total, ens aboquen a considerar-ho com dos processos bioquímics diferents.

Una anàlisi prou meticulosa com la portada a terme anava encaminada primordialment a poder establir unes condicions de treball en les quals l'acumulament d'aminoàcids arribés a ésser un procés susceptible d'aprofitament a escala industrial. Els dos aminoàcids segregats en major quantitat, més del 80% conjuntament, són l'alanina i l'àcid glutàmic, tant l'un com l'altre avui d'interès econòmic.

No obstant això, l'anàlisi d'aquest fenomen té un altre vessant. La Taula I representa un balanç del nitrogen sota les condicions d'alta pro-

<u>TAULA I</u>						
BALANÇ DE NITROGEN* DURANT EL CREIXEMENT DE <u><i>E. intermedia</i> C3</u>						
EN CONDICIONS D'ALTA PRODUCCIÓ						
<u>HORES</u>	<u>MITJA</u>	<u>AMINOACIDS</u>	<u>SEDIMENT</u>	<u>PROTEINA</u>	<u>TOTAL</u>	<u>Δ</u>
0	272	—	—	—	272	—
24	267	1,75	2,57	0,20	271,5	-0,5
48	263	3,28	3,54	0,23	270,-	-2
96	254	12,25	4,06	0,20	270,2	-4,8
168	246	11,25	3,72	0,30	261,3	-10,7

\* TOTS els valors en mM de NITROGEN

ducció d'aminoàcids en *E. intermedia* C3. Aquí es pot veure que del nitrogen assimilat un 74% torna al medi sota la forma d'aminoàcids, la qual cosa representa que el rendiment metabòlic disminueix profundament. Això ens ha fet pensar que en *E. intermedia* C3 pot fallar un mecanisme fonamental de regulació. Si era així, aquest organisme podria resultar molt apropiat per a investigar el mecanisme de regulació que en els casos on no hi ha producció domina la situació.

L'acumulació anormal d'aminoàcids comporta dos problemes diferents: en primer lloc, el de la síntesi a partir dels substrats externs que supor-

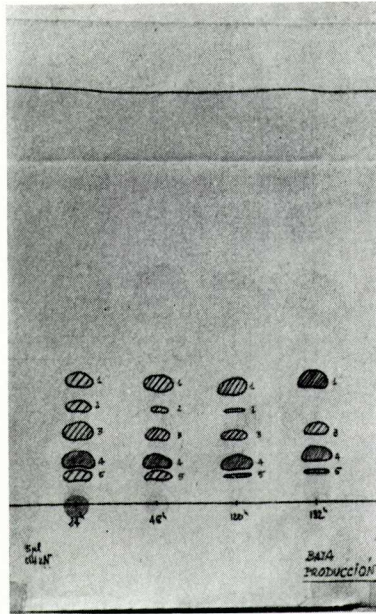


FIG. 5. — Aminoàcids segregats al llarg de baixa producció per *E. intermedia* C<sub>3</sub>.

1: alanina — 2: àcid glutàmic —  
3: àcid aspàrtic — 4 i 5: aminoàcids bàsics.

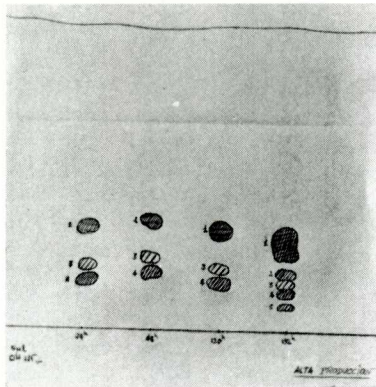


FIG. 6. — Aminoàcids segregats al llarg d'alta producció per *E. intermedia* C<sub>3</sub>.

ten el creixement bacterià; d'altra banda, els factors que condicionen el fet que s'acumuli, que cal lògicament cercar en un mecanisme de sobreproducció o en un altre de subutilització. En aquest darrer cas existeix l'evidència de la intervenció de sistemes de regulació, ja que la composició d'aminoàcids de la fracció àcid-soluble és normalment independent de la composició del medi i de la mateixa velocitat de creixement. Per tant, la sobreproducció o la subutilització poden mirar-se més aviat d'una manera general a través d'una fallada dels anomenats mecanismes.

Altres investigacions portades a terme en el mateix Departament han posat clarament en evidència que la segregació d'alanina i d'àcid glutàmic en *E. intermèdia* C<sub>3</sub> són degudes a un fenomen de mutació genètica controlat per un sol gen, el qual, no essent subjecte a selecció en el medi de desenvolupament, es troba en equilibri mutacional. Actualment ens esforcem per lligar el fet dels dos tipus de producció d'aminoàcids amb aquests mecanismes genètics.