

Microbiología Española

*publicada por
el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 160 PTA; extranjero, 200 PTA

Número: España, 45 PTA; extranjero, 55 PTA

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA» DEL C. S. I. C.

ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA (publicada por el Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología. Madrid). Mensual. Suscripción: España, 160 PTA; extranjero, 240 PTA. Número: España, 20 PTA; extranjero, 30 PTA.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI» (Estación Experimental de «Aula Dei». Zaragoza). Irregular. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 50 PTA.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES» [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto «A. J. de Cavanilles». Madrid). Anual. Suscripción: España, 190 PTA; extranjero, 220 PTA. Número: España, 200 PTA; extranjero, 230 PTA.

ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 175 PTA. Número: España, 160 PTA; extranjero, 185 PTA.

ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 80 PTA; extranjero, 100 PTA. Número: España, 45 PTA; extranjero, 60 PTA.

ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 165 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 60 PTA.

CEDRO (Instituto de Estudios de Jardinería y Arte Paisajista. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 45 PTA.

COLLECTANEA BOTANICA (Instituto Botánico Municipal. Barcelona). Anual. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 125 PTA. Número: España, 110 PTA; extranjero, 135 PTA.

CURSILLOS Y CONFERENCIAS DEL INSTITUTO «LUCAS MALLADA» (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Anual. Suscripción: España, 50 PTA; extranjero, 80 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 70 PTA.

ESTUDIOS GEOLOGICOS (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.

FARMACOGNOSIA (Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 35 PTA; extranjero, 45 PTA.

GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España y Portugal, 80 PTA; países restantes, 120 PTA. Número: España y Portugal, 25 PTA; países restantes, 35 PTA.

PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.



CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Eduardo Gallardo Martínez, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

Dr. Miguel Rubio Huertos, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

Dr. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

INDICE

	Página
Efectos de la temperatura sobre la sintomatología del virus «ringspot» de la petunia, por <i>M. Rubio-Huertos</i>	1
Estudio de la fracción hormonal de los tumores producidos en el olivo por el <i>Pseudomonas savastanoi</i> . I. Biogénesis del ácido β -indolacético contenido en los tumores, por <i>R. Beltrá</i>	13
Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. VI. Influencia del tratamiento por alcoholes en la fermentación superficial de melazas de azúcar, por <i>A. Puente</i> y <i>B. Regueiro</i>	35
Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. VII. Influencia de algunos factores en medios de fermentación de melazas y tratamiento de éstas en fermentación sumergida, por <i>A. Puente</i> y <i>B. Regueiro</i>	59

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAÏME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISILOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

EFFECTOS DE LA TEMPERATURA SOBRE LA SINTOMATOLOGIA DEL VIRUS "RINGSPOT" DE LA PETUNIA

POR
M. RUBIO-HUERTOS (*)

INTRODUCCION

La alta temperatura, además de afectar a las plantas, afecta a los virus que en ellas se reproducen, produciendo un cambio total en la sintomatología y, algunas veces, la inactivación completa del virus, aunque la temperatura no alcance el grado necesario para la inactivación *in vitro* del virus. De esta propiedad se han valido diversos autores para la curación de algunas virosis. Para esto, naturalmente, es necesario que el virus sea más susceptible al calor que la planta huésped, lo que no ocurre siempre; así, si calentamos algunas plantas por encima de los 65 °C, posiblemente las libraremos del virus, pero, al mismo tiempo, mataremos la planta; por esto se ha conseguido esta curación en contados casos. Uno de los primeros que hicieron experimentos en este sentido fue Wilbrink (7), que pudo eliminar un virus de la caña de azúcar sumergiendo estolones para la reproducción de ésta, en agua a 52 °C, durante una hora.

Kunkel (4), primero, con varios virus del melocotonero, y más tarde (5) con plantas de *Vinca rosea* infectadas con el virus «*Aster yellow*» consiguió curaciones teniendo las plantas durante dos semanas a tem-

(*) Este trabajo es parte del realizado mediante una beca de la Fundación «Juan March», a la que expresamos nuestro agradecimiento.

peraturas de 35°-38 °C, o más rápidamente, sumergiéndolas en agua a 40°-50 °C, durante algunas horas.

Kassanis (3) ha conseguido liberar del virus enrollado de la patata una serie de tubérculos infectados, poniéndolos en estufa a 37,5 °C, en ambiente húmedo. Sin embargo, no consiguió lo mismo con el virus X de la patata, haciendo el mismo experimento.

De todas formas, lo más corriente es que las altas temperaturas (25°-35 °C), dependiendo del virus de que se trate, produzcan un enmascaramiento de los síntomas, adquiriendo las plantas un aspecto completamente normal, pero volviendo a mostrar síntomas de virosis si la temperatura desciende a menos de 20 °C.

Las temperaturas excepcionalmente altas registradas en el invernadero del C. S. I. C. durante los meses de verano de los años 1960 y 1961, nos permitieron, accidentalmente, observar un fenómeno de este tipo en plantas de *Vicia faba* infectadas con el virus «ringspot» de la petunia, y siendo característico de este virus la formación de inclusiones intracelulares, pensamos tendría interés el estudio de las alteraciones producidas por el calor en la sintomatología en relación con la formación de dichas inclusiones intracelulares, ya que sobre este tema no se había publicado nada.

MATERIALES Y METODOS

Se empleó el virus «ringspot» de la petunia (6) mantenido en *Petunia hybrida* y en *Vicia faba* por medio de inoculaciones mecánicas, con ayuda de polvo de carborundo, en series sucesivas.

La temperatura del invernadero donde se mantuvieron las plantas alcanzó máximas de 42 °C, y mínimas de 25 °C, durante los meses de verano. Durante el invierno, la media de máximas fue de 18,5 °C, y la de mínimas, 9,2 °C, con calefacción eléctrica.

Las observaciones histológicas se realizaron siguiendo los métodos descritos por nosotros en trabajos anteriores (5).

Las microfotografías fueron hechas con un microscopio Zeiss con contraste de fases, y un microscopio Leitz de luz ultravioleta.

RESULTADOS

Las plantas de *Vicia faba*, después de los doce días de inoculadas con el virus «ringspot» de la petunia, mantenido a temperaturas inferiores a 22 °C, presentan un típico mosaico, algunas veces acompañado de reducción del limbo de las hojas jóvenes (*figura 1*). Las plantas de petunia presentan los síntomas de «ringspot», o sea, anillos cloróticos concéntricos (*figura 2*).

Al cabo de unas dos semanas, durante las cuales la temperatura del invernadero subió hasta una media de 35 °C, observamos que en las plantas de *Vicia faba* inoculadas con el virus aparecía una necrosis en la parte apical, que se iba extendiendo hacia abajo por toda la planta y que acababa por destruirla en unos ocho días (*figuras 3-4*). Por otra parte, un reducido tanto por ciento de las plantas inoculadas no presentaba síntoma alguno y crecía tan bien como las sanas. Esto último pensamos que sería debido al tanto por ciento normal de plantas que, al ser inoculadas, no adquieren la infección; sin embargo, estas plantas aparentemente sanas, observadas al microscopio, presentaban las inclusiones intracelulares características de la infección por este virus de la petunia.

De esta forma, debido al efecto de la temperatura, nos encontramos con dos variantes del virus que pudieron ser mantenidas por inoculaciones sucesivas a plantas sanas, sin que variase su sintomatología durante todo el tiempo en que la temperatura no bajó de 25 °C.

Cuando las inoculaciones se realizaron en plantas mantenidas a temperatura inferior a 20 °C, en el caso de la variante necrosante, en la primera inoculación, de diez plantas inoculadas, seis seguían dando necrosis con muerte rápida de la planta, una o dos presentaban necrosis, pero no tan fuerte, y las restantes daban el mosaico típico del virus normal. Cuando se hicieron posteriormente inoculaciones con las plantas necróticas de esta serie a plantas conservadas a 20 °C, el porcentaje de plantas con necrosis disminuyó, resultando al tercer pase todas las plantas con síntomas del virus tipo.

En el caso de la variante sin síntomas, la primera serie de inoculaciones, a menos de 20 °C, ya dio síntomas de mosaico, característicos de virus tipo, en todas las plantas inoculadas.

Observaciones citológicas

En el estudio histopatológico de la variante necrosante pudimos observar que casi el 100 por ciento de las células de la epidermis, tanto del limbo de las hojas como del tallo de la planta, contenían gran número de inclusiones amorfas y cristalinas, en las que, al lado de las inclusiones típicas del virus «ringspot» de la petunia, es decir, inclusiones amorfas y otras cristalinas del sistema cúbico (*figura 5*), aparecían en bastantes células inclusiones de tipo acicular que nunca aparecen en el virus tipo. Estas inclusiones están formadas por agujas cristalinas o paracristalinas, en manojos, y se encuentran en el citoplasmas de las células junto al núcleo o a la pared celular (*figuras 6-8*), tiñéndose de rojo vivo por la floxina, al igual que las inclusiones normales.

Las inclusiones de tipo normal y las aciculares no se encuentran nunca juntas en la misma célula.

La variante que no presenta síntomas externos, como hemos dicho anteriormente, produce inclusiones intracelulares amorfas y cristalinas iguales y tan numerosas como las del virus tipo. Su período de aparición en las células de las hojas jóvenes (doce-catorce días) también coincide con lo que sucede en plantas que presentan los síntomas de mosaico tipo.

DISCUSION

El fenómeno de aparición de variantes en plantas sometidas a altas temperaturas se creyó debido a mutaciones producidas por el calor; sin embargo, Bawden (1) dice que se trata, más bien, de que toda virosis está producida, no por una estirpe de virus sola, sino por una serie de estirpes del mismo virus en la que predomina aquella más adaptada al medio normal (especie de planta, temperatura media, humedad, luz, etc.), lo que experimentalmente está comprobado, ya que, en la mayor parte de los casos, es posible obtener diferentes mutantes de cualquier virus por pases a través de distintos huéspedes, aislamiento de lesiones necróticas, etc. Así, según Bawden, lo que sucede es, no que se produzca una mutación, sino que se realiza una selección entre las mutantes que existen normalmente, desarrollándose una de

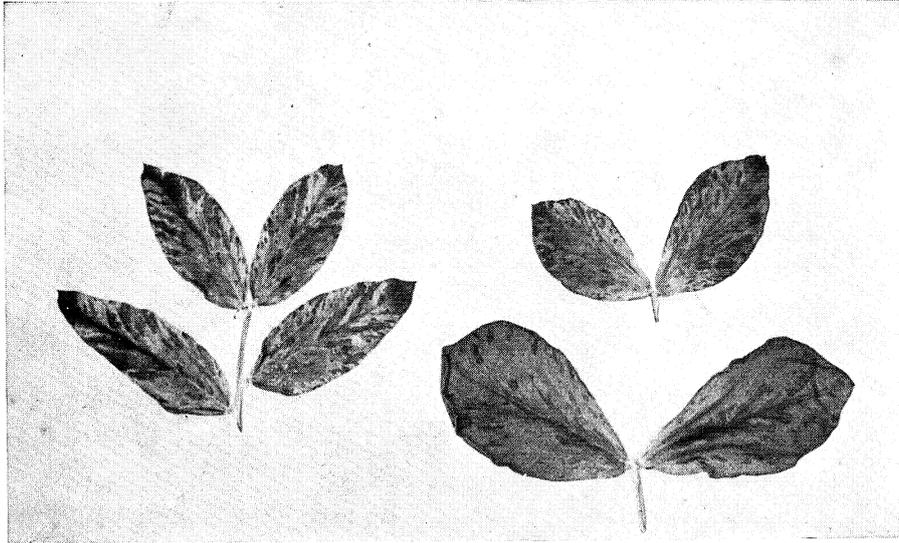


Figura 1. Virus tipo

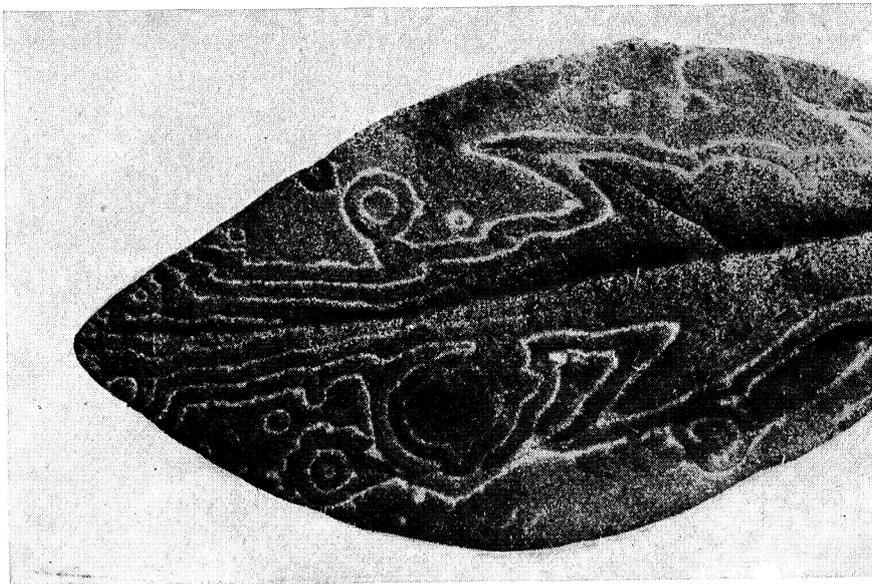


Figura 2. Virus tipo (en petunia)

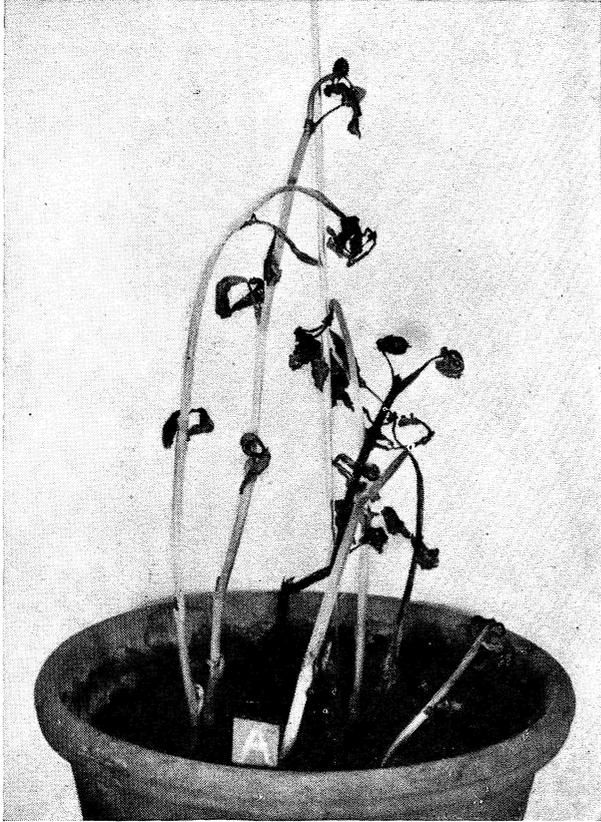


Figura 3. Estirpe necrosante. Necrosis apical



Figura 4. Estirpe necrosante. Necrosis del tallo

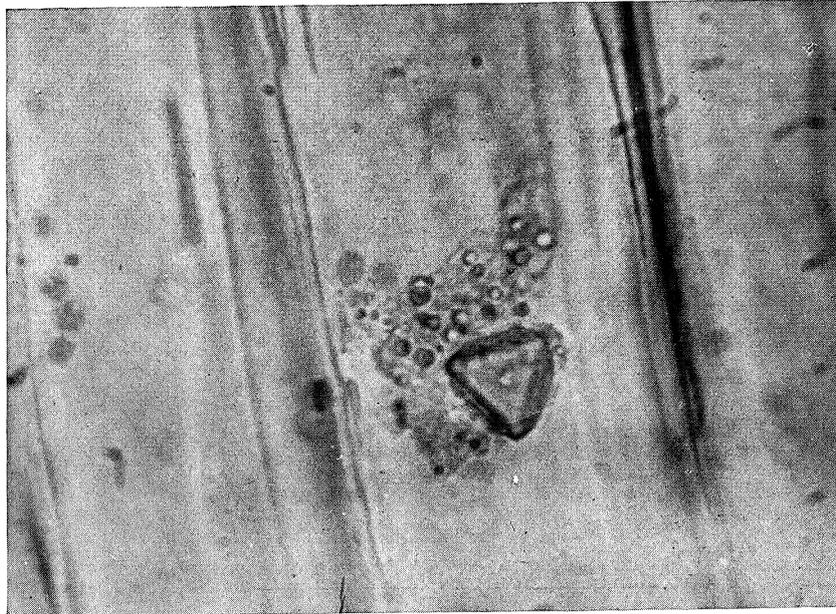


Figura 5. Virus tipo. Inclusiones amorfa y cristalina



Figura 6. Estirpe necrosante. Agujas paracristalinas



Figuras 7-8. Estirpe necrosante. Agujas paracristalinas

ellas más deprisa que la estirpe normal, dadas las condiciones excepcionales de la temperatura, y dando así a las plantas infectadas los caracteres propios de esta estirpe que, en condiciones normales, no se ponen de manifiesto.

El caso de la variante necrosante, del «ringspot» de la petunia, parece una demostración clara de lo supuesto por Bawden, ya que si hubiera existido una mutación, por el calor, del virus tipo, este virus mutado tendría que seguir conservando sus caracteres típicos a través de las inoculaciones sucesivas, siendo ya independiente del factor temperatura, y habría que explicar su reversión al tipo normal por otra mutación debida a temperaturas por bajo de 20 °C, lo que parece bastante improbable.

La variante sin síntomas externos, por otro lado, podría ser también un caso de selección de una mutante presente en el virus original, pero dado que la atenuación y desaparición de síntomas en plantas sometidas durante algún tiempo a altas temperaturas, parece ser un fenómeno general, lo más probable es que se deba a una acción directa de la temperatura sobre algunos elementos celulares, tales como los protoplastidios, que sabemos son afectados por los virus, impidiendo su desarrollo normal y formándose así el típico síntoma de mosaico. En este caso, el calor, o bien destruyendo alguna sustancia receptora o reforzando la resistencia de dichos elementos al virus, impediría su acción destructora y, por lo tanto, ya no se producirían los síntomas de mosaico y las hojas tendrían el aspecto normal. Al bajar la temperatura se producirían las sustancias necesarias para el ataque del virus a los protoplastidios, apareciendo los síntomas, como así sucede, en las hojas nuevas formadas a baja temperatura.

Varios autores, estudiando comparativamente la morfología de las inclusiones intracelulares producidas por distintas estirpes del virus mosaico del tabaco, han encontrado algunas diferencias entre ellas.

En el caso de la estirpe necrosante, del virus «ringspot» de la petunia, las diferencias son muy claras, pero debemos hacer constar otra vez el hecho, un poco extraño, de que este tipo de inclusiones no es el único en las plantas con necrosis, sino que en bastantes células epidérmicas de estas plantas las inclusiones amorfas y cristalinas son exactamente iguales a las del virus tipo, lo que de momento no podemos explicar, pero podría ser prueba de la coexistencia de diferentes estirpes en una infección conjunta y localizadas en células sepa-

radas, como se ha comprobado en las estirpes amarillas del virus mosaico del tabaco y del pepino («*Cucumber mosaic*»), en las que en hojas con sintomatología del virus tipo, aparecen pequeñas manchas de un intenso color amarillo claro, y recortando estas manchas e inoculando con ellas se pueden obtener plantas con la sintomatología de esta estirpe amarilla (2).

RESUMEN

Se describen dos variantes producidas por efecto de temperaturas de 25°-35 °C durante cierto tiempo sobre el virus «ringspot» de la petunia, mantenido en plantas de *Vicia faba*.

Una variante produce necrosis generalizada y la muerte de la planta diez o doce días después de la inoculación y presenta inclusiones intracelulares de tipo acicular, paracristalinas, diferentes de las del virus tipo, aunque en algunas células epidérmicas se encuentren también éstas.

Una segunda variante no produce síntoma externo alguno sobre las plantas inoculadas, pero es capaz de transmitir la virosis por inoculación, y a pesar de no presentar síntomas externos, produce inclusiones intracelulares iguales y tan numerosas como el virus tipo.

Ambas variantes, cuando se inoculan a plantas mantenidas a temperaturas inferiores a 20 °C, al segundo pase, vuelven a dar las características del virus tipo.

Se discute si son estirpes producidas por el calor o una selección de las mutantes presentes en el inóculo original y que a alta temperatura se desarrollan con mayor velocidad que el virus tipo, que queda inhibido.

SUMMARY

Two strains of petunia ringspot virus were obtained when *Vicia faba* plants inoculated with the virus were kept at 25°-35 C°. One of them was a masked strain. The plants showed no mosaic nor stunting but they had in the epidermical cells of the leaves and stems the typical amorphous and crystalline inclusions of the normal strain. These plants when placed at temperatures below 22 °C did not show any symptoms again; however, young *V. faba* plants inoculated

with the masked strain and below 22 °C did revert to the normal strain.

The second strain produced a severe necrosis in the top and stem of the inoculated plants, causing their death 10-12 days after the inoculation. This strain formed intracellular paracrystalline needles different from the ones formed by the normal strain; however, in some areas of the epiderm groups of cells contained amorphous and crystalline inclusions similar to those from the normal strain. Plants with the necrotic strain did not recover when placed below 22 °C. Only after three serial inoculations to young *Vicia faba* plants at below 22 °C did the normal strain reappear.

BIBLIOGRAFIA

1. BAWDEN, F. C. 1950. Plant Viruses and Virus Diseases, 3.^a edición. Chron. Botanica Company.
2. HICHBORN, J. H., y THOMSON, A. D. 1960. Variation in plant viruses. *En Advances in Virus Research*. Academic Press.
3. KASSANIS, B. 1950. *Ann. Appl. Biol.*, 37, 339.
4. KUNKEL, L. O. 1936. *Phytopathology*, 26, 809.
5. KUNKEL, L. O. 1941. *Am. J. Botany*, 28, 683.
6. RUBIO-HUERTOS, M. 1956. *Phytopathology*, 46, 553.
7. RUBIO-HUERTOS, M. 1960. *Microbiol. Españ.*, 12, 325.
8. WILBRINK, G. 1923. *Arch. Suikerind. Ned.-Indië*, 31, 1.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISILOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

ESTUDIO DE LA FRACCION HORMONAL DE LOS TUMORES PRODUCIDOS EN EL OLIVO POR EL *PSEUDOMONAS SAVASTANOI*

I. Biogénesis del ácido β -indolacético contenido en los tumores

POR
R. BELTRA (*)

Este trabajo forma parte de una serie de investigaciones que comprenden el estudio fraccionado de los tumores producidos en el olivo por la bacteria *Pseudomonas savastanoi*. Se ha llevado a cabo con el fin de obtener la formación de tumores asépticos en las plantas de experimentación, mediante la inoculación conjunta y separadamente de cada uno de los componentes identificados en las respectivas fracciones tumorales. Esta primera parte comprenderá un estudio de la fracción hormonal en sus dos capítulos: I) Biogénesis del A. I. A. (**) contenido en los tumores; y II) Valoración química y biológica del A. I. A.

INTRODUCCION

Al estudiar las diferentes fracciones presentes en los tumores bacterianos del olivo, con el fin de obtener experimentalmente la formación de tumores asépticos, se fijó especial atención sobre la fracción

(*) Expreso mi agradecimiento a la Fundación «Juan March», que ha subvencionado, mediante una beca de estudios, la realización de estas experiencias.

(**) Acido β -indolacético.

auxínica tumoral, pues es sabido que las auxinas juegan un papel importante en determinadas fases de la formación de tumores vegetales.

La transformación de la célula sana en tumoral no es un proceso instantáneo, según Braun (12), sino consecuencia de un proceso gradual y progresivo; Klein (26-27), de acuerdo con las investigaciones de Braun (11) y Beremblum (5), considera que la transformación se realiza en tres fases, llamadas, respectivamente: Acondicionamiento, Inducción y Promoción o Incremento. Las bacterias no son necesarias en la primera fase, sino sólo se necesita la presencia de ciertos agentes, cuya ausencia limita la capacidad de la célula para su transformación en célula tumoral. Para Thomas y Klein (43), la fase de Acondicionamiento requiere algunos compuestos derivados del jugo de heridas de la planta huésped, que incluye purinas y posiblemente auxinas (13).

La fase de Inducción, que es sobre la que actualmente existe más confusión, a pesar de los trabajos de Thomas y Klein (43), se cree que es la consecuencia de la acción de un P. I. T (*), que bien podría ser el ácido desoxirribonucleico, sintetizado por la bacteria, en presencia de un factor favorecedor del proceso. En la fase de Promoción es en la que, según Braun y Laskaris (14) y Klein y Link (27), se necesita la auxina como agente co-carcinógeno, sintetizando estas auxinas la bacteria causal a partir de células tumorales incipientes; Klein y Link estudian la relación entre el P. I. T. y las auxinas, cada una de las cuales parece ser necesaria, pero no suficiente para producir la génesis del tumor; deducen, como resultado de sus investigaciones, que sin la auxina, una célula tumoral incipiente no se transformaría en una célula primaria típicamente tumoral; el haber prolongado experimentalmente la fase de Promoción mediante la adición de auxinas, indica que estas sustancias son imprescindibles para completar la tumoración. Cuando la célula es ya una célula tumoral primaria, entra en el período de duplicación, se divide continuamente, pero no de una manera coordinada; en esta fase puede haber procesos secundarios influidos por la elevación de niveles de auxina, en los que no se requiere ni la bacteria ni posiblemente el P. I. T.

De la breve exposición de las fases que tienen lugar en los procesos de transformación tumoral, se desprende que las auxinas o sus-

(*) Principio de inducción tumoral.

tancias estimuladoras del crecimiento juegan un papel importante en los procesos de inducción tumoral, pues por diversos autores se considera imprescindibles para que las células sanas, después de las alteraciones sufridas por la acción de los agentes de acondicionamiento e inducción, se transformen en células tumorales; estas sustancias actúan como activadoras del crecimiento en las fases de Promoción, considerándose los factores decisivos en los procesos de cancerización vegetal, ya que su presencia se requiere específicamente para completar la tumoración y desprendiéndose que sea del mayor interés, cuando se estudia un tumor vegetal producido por bacterias, conocer la presencia o ausencia de las auxinas, así como de otros factores proliferantes presentes en el tumor y que puedan influir más o menos directamente en la transformación de la célula sana en tumoral.

De todos los tumores vegetales conocidos, el «crown-gall» ha sido el más ampliamente estudiado desde este punto de vista (7, 9, 21-22, 28, 30-31, 33), comprobándose la producción de A. I. A. por razas virulentas de su agente causal, *Agrobacterium tumefaciens*, en medios de cultivo especiales, así como la presencia de A. I. A., I. A. N. (*), I. A. (**) y otras sustancias de crecimiento en este tipo de tumores. La comprobación de que los tejidos tumorales tienen mayor concentración de auxinas que los tejidos sanos, está en íntima relación con las experiencias llevadas a cabo por Gautheret (15-17), que demuestran que los tejidos normales necesitan para su crecimiento menos cantidad de auxina que la que sintetizan los tejidos tumorales; Berthelot y Amoreaux (6) ven el paralelismo entre la reacción de los tejidos tratados con A. I. A. y una sustancia producida por el organismo del «crown-gall» a partir del triptofano y la reacción de plantas tratadas con cultivos vivos de *A. tumefaciens*; sin embargo, otros autores niegan la importancia del A. I. A. y sustancias similares en la formación de los tumores, y dicen que el *A. tumefaciens* es patógeno para el tejido, independientemente de la presencia de estas sustancias estimuladoras del crecimiento.

En relación con la tuberculosis del olivo, la comprobación de que los tallos con tumores producidos por la bacteria *Pseudomonas sa-*

(*) Indolacetónitrilo.

(**) Indolaldehído.

vastanoi, contienen mayor concentración de triptofano que los sanos (1), así como la capacidad de dicha bacteria para producir A. I. A. en medios de cultivo con triptofano (2), sugirió la posibilidad de que este aminoácido pudiera influir en la localización y producción de tumores de origen bacteriano que contuvieran A. I. A. y para los que fuese necesaria la intervención de las auxinas (principalmente A. I. A.) en alguna de sus fases de formación. El resultado de estas observaciones nos llevó a investigar la presencia de sustancias auxínicas en la fracción hormonal del tumor, así como su biogénesis a partir del triptofano, con el fin de esclarecer la posible influencia que pudieran tener en la obtención experimental de tumores asépticos que fuesen morfológica e histológicamente iguales a los producidos por la bacteria.

Debido a las experiencias realizadas por diversos autores sobre la biogénesis del A. I. A., se considera al triptofano como fuente más probable de dicha sustancia. Thimann considera a otros miembros de la familia del A. I. A. como precursores de esta sustancia: triptamina e I. A. N., de los que no se sabe actualmente con seguridad si son producidos a partir del triptofano, pero sí que pueden dar A. I. A. (4, 41).

Los procesos seguidos por el triptofano hasta su transformación en A. I. A. son probablemente una desaminación oxidante para dar A. I. Pc. (*), creyéndose que este ácido posteriormente, por descarboxilación oxidante, da el A. I. A.; Wildman y cols. (46) demuestran que preparaciones enzimáticas de hojas convierten el triptofano en auxina y que el A. I. Pc. puede también actuar como precursor; Skoog (37) vio que tanto el triptofano como la triptamina producen curvatura en los coleoptilos de avena debido a su transformación en A. I. A.; por estas investigaciones se propuso una nueva vía de formación del A. I. A., vía I. Ac. (**), por oxidación de la triptamina. Yamaki y Nakamura (47), trabajando con maíz, proponen como posibles precursores del A. I. A. los complejos proteínicos en los que entra a formar parte el triptofano. En los trabajos de Gordon (18) y Larsen (29) se encuentran esquematizadas las posibles vías de formación del A. I. A. a partir del triptofano.

(*) Acido β -indolpirúvico.

(**) Indolacetaldehido.

La transformación del triptofano en A. I. A. por la acción de las bacterias, ha sido ampliamente demostrada por diferentes autores trabajando con medios de cultivo que contenían triptofano: por Berthelot y Amoreaux (6) y Kaper y Veldstra (22), con el *Agrobacterium tumefaciens*, y Beltrá (2), con el *Pseudomonas savastanoi*.

Interesante por el paralelismo con los resultados obtenidos por nosotros en estas experiencias, es el trabajo de Kaper y Veldstra (22), citado últimamente, en el que demuestran la formación de A. I. A. por el *Agrobacterium tumefaciens*, a partir de medios de cultivo con triptofano y en donde el A. I. Pc. se presenta como un producto intermedio, muy lábil cuando se investiga por cromatografía con disolventes alcalinos, pues se descompone en siete compuestos, dos de los cuales los identifican como A. I. A. e I. A., siendo también probable la presencia de A. I. G. (*). Los autores consideran las otras manchas sin identificar como «artefactos» que se producen por rotura espontánea del triptofano (en la extracción del cultivo con disolventes) y del A. I. Pc. (durante la cromatografía).

PARTE EXPERIMENTAL

I. Obtención de la fracción hormonal

Se han preparado extractos etéreos hormonales, partiendo de tumores frescos y jóvenes y de éter purificado por el método de Garbarini, siguiendo las técnicas de Bitancourt (7) y Overbeek (36), modificada por nosotros, y Yamaki y Nakamura (47).

II. Identificación de las auxinas presentes en los extractos etéreos hormonales

Como prueba preliminar antes de hacer la identificación por cromatografía de las auxinas que pudiera haber en los extractos, se probó la acción de éstos sobre semillas de leguminosas, pues es sabido que las auxinas influyen aumentando el poder germinativo de las semillas; para ello se han preparado dos lotes de semillas de garbanzos,

(*) Acido indolglicólico.

judías y guisantes, que se pusieron a germinar en condiciones estériles en placas petri, sobre disco de papel de filtro humedecido con 10 cm³ de agua estéril y en estufa a 26 °C. A las veinticuatro horas se tomó un lote de estas semillas, que ya tenían el tegumento más blando, y se trataron con 1 cm³ de los extractos tumorales en bruto.

A los cuatro días, las semillas tratadas con el extracto tumoral mostraban un crecimiento radicular muy superior a las tratadas solamente con agua destilada; se había producido una aceleración en el proceso germinativo, observándose la aparición de raicillas secundarias. Estos hechos pusieron de manifiesto que en los extractos tumorales existía efectivamente un factor de crecimiento y que era el que en este caso influía sobre la germinación (*figuras 1-2*).

III. Extractos hormonales

1. Técnicas cromatográficas

Hemos realizado cromatografía sobre papel de los extractos etéreos preparados para este fin, según las técnicas de Bitancourt (7), Overbeek (36) y Yamaki y Nakamura (47).

Los cromatogramas se realizaron en papel Whatman núm. 1, de 43×13 cm, 35×13 cm, 20×12,5 cm y en tiras de 21×3,8 cm, realizándose estos últimos en tubos de 29,5×4,4 cm.

Por esta técnica hemos investigado la presencia de auxinas con anillo indólico, estableciendo los valores de R_f del A. I. A., A. I. B. (*), A. I. P. (**), triptofano, I. A. N., I. A., I. Ac., etc., tanto del producto sintético puro como de las que se encuentran en los extractos.

Los cromatogramas preparados con los extractos a investigar se han tenido de ocho-diez horas sobre el disolvente (sin introducir y con el fin de saturar el papel), a la temperatura de la habitación y en cámara oscura. Para el desarrollo se han empleado tiempos que oscilan entre cinco-quince horas.

1a. Disolventes. Para auxinas ácidas hemos empleado los citados por Bitancourt (7), Nitsch (35), Vlitos (44-45) y Yamaki y Nakamura (47).

(*) Acido β-indolbutírico.

(**) Acido β-indolpropiónico.

Para las auxinas neutras, algunos de los anteriores más los siguientes:

- Tolueno (100 %)
- Tolueno:agua (95 : 5)
- Benceno (100 %)
- Benceno:agua (95 : 5)

b. Reveladores. Como reveladores para las auxinas ácidas hemos usado cloruro férrico y ácidos sulfúrico, clorhídrico y perclórico (3, 47), soluciones de p-dimetilaminobenzaldehído (23, 44) y otros.

Para auxinas neutras, alguno de los anteriores más el reactivo de Eck (bencidina en ácido acético al 5 por ciento), y para el triptofano, también algunos de los reactivos para auxinas ácidas y especialmente ninhidrina.

2. Cromatografía de los extractos etéreos preparados según la técnica de Overbeek modificada (36)

En estos extractos hemos investigado la presencia de ácidos indolcarboxílicos, principalmente A. I. A., A. I. B. y A. I. Pc.

Para el desarrollo de los cromatogramas con estos extractos hemos ensayado un total de siete disolventes con seis reactivos reveladores.

2a. Resultados. En el *cuadro 1* damos los Rf para diferentes disolventes del A. I. A. puro (Merck), así como de la mancha obtenida en el ensayo cromatográfico del extracto.

Cuadro 1

Disolventes	Rf	
	Extracto hormonal	A. I. A. (Merck)
Alcohol propílico : amoníaco : agua (80 : 5 : 15)	0,51-0,52	0,52
Alcohol propílico : amoníaco : agua (60 : 30 : 10)	0,82-0,85	0,85
Alcohol isopropílico : amoníaco (28 %) : agua (80 : 10 : 10)	0,49-0,52	0,49
Alcohol etílico (70 %)	0,85	0,85
Alcohol butílico saturado con amoníaco (5 %)	0,35	0,35
Alcohol butílico : ácido acético : agua (60 : 15 : 25)	0,91-0,98	0,97
Alcohol butílico secundario : alcohol metílico : agua (80 : 5 : 15)	0,25-0,26	0,24

En este extracto tumoral se ha comprobado la presencia del A. I. A. o una auxina con el mismo Rf; la variación encontrada depende del disolvente y revelador empleados.

Para comprobar que la sustancia encontrada en el extracto tumoral y que tiene igual Rf que el A. I. A., es verdaderamente A. I. A., se ha agregado al extracto tumoral A. I. A. puro; después de revelar el cromatograma de este extracto modificado, obtuvimos una sola mancha, más coloreada que cuando trabajábamos con los extractos tumorales puros.

3. *Cromatografía de los extractos obtenidos según Yamaki y Nakamura (47)*

Mediante esta técnica, es posible investigar la presencia en los extractos de A. I. A., I. A., triptofano y A. I. A. liberado por hidrólisis alcalina.

3a. Fracción ácida. En el desarrollo de los cromatogramas anteriores con los disolventes citados para auxinas ácidas, hemos empleado los que nos dieron mejores resultados: alcohol isopropílico : amoníaco (28 %) : agua (8 : 10 : 10) (al que denominaremos primer disolvente), y alcohol isopropílico : amoníaco : agua (10 : 1 : 1) (segundo disolvente), en cromatografía ascendente.

En el caso particular de los extractos ácidos preparados según Yamaki y Nakamura, esperábamos encontrar solamente A. I. A., pero, al revelar con el reactivo de Ehrlich, hemos encontrado una serie de seis o siete manchas, perfectamente separadas (*figura 3*), cuyos Rf y colores desarrollados con Ehrlich damos en el *cuadro 2*.

De estas manchas, la situada en tercer lugar siguiendo la dirección de desarrollo ascensional, no aparece constantemente en todos los cromatogramas con los dos disolventes empleados.

En el *cuadro 3* damos los Rf de los compuestos indólicos usados como testigos.

Con los dos disolventes se ha identificado el A. I. A. e I. A.; cuando empleamos el primero, el Rf de 0,97 obtenido en los cromatogramas de los extractos lo identificamos sin lugar a duda como I. A., ya que, a pesar de la pequeña diferencia de valores de Rf encontrados para el I. A. e I. A. N. testigos (0,97-0,98 y 0,99), se distinguen fácilmente uno de otro, pues el I. A. da con el reactivo de Ehrlich color rojizo violeta como el del extracto hormonal, típico de los compues-

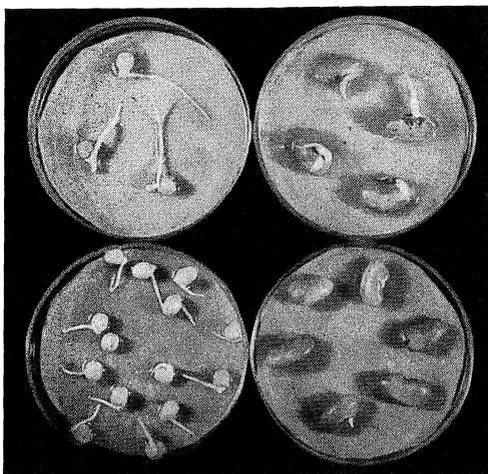


Figura 1. Diferente grado de germinación observado por tratamiento con agua destilada (placas superiores) y extracto tumoral (placas inferiores), en semillas de guisante (izquierda) y judía (derecha)

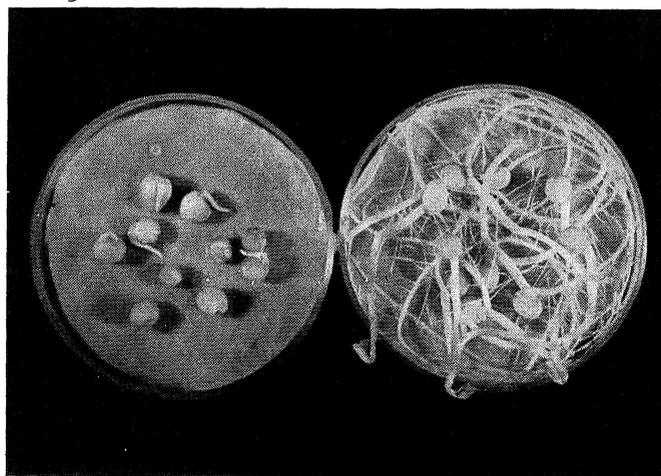


Figura 2. Diferente grado de germinación observado por tratamiento con agua destilada (izquierda) y extracto tumoral (derecha), en garbanzos

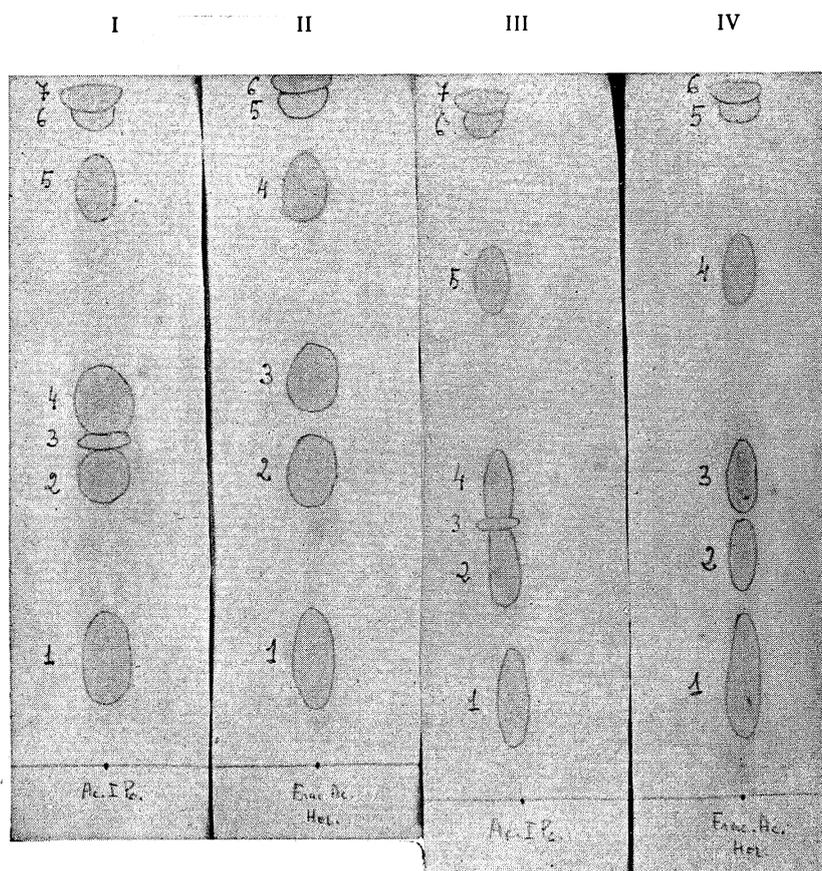


Figura 3. Cromatogramas de extractos etéreos tumorales (II y IV) y A. I. Pc. puro (I y III). Disolventes: alcohol isopropílico : amoníaco : agua (10 : 1 : 1) y alcohol isopropílico : amoníaco (28 %) : agua (80 : 10 : 10). Revelador: reactivo de Ehrlich

Cromatogramas I y III. Las manchas 2, 4 y 7 corresponden, respectivamente, al A. I. G., A. I. A. e I. A.; las 1, 3, 5 y 6, sin identificar, corresponden a productos de descomposición del A. I. Pc., en disolventes alcalinos.

Cromatogramas II y IV. Se ha obtenido igual resultado que con el A. I. Pc., aislándose una mancha menos, correspondiente a los productos de descomposición

Cuadro 2. Fracción ácida hormonal obtenida según Yamaki y Nakamura

Rf		Coloraciones
Alcohol isopropílico: amoníaco (28 %): agua (80: 10: 10)	Alcohol isopropílico: amoníaco: agua (10: 1: 1)	
0,97	0,96-0,97	Rojo violeta
0,90	0,92-0,93	Azul verdoso
0,84	0,76	Amarillo castaño
0,49-0,54	0,42-0,44	Azul fuerte
?	0,38 ?	Rosa
0,47	0,30-0,32	Rojo
0,22-0,25	0,12-0,14	Amarillo, que pasa a verde; se refuerza por el calor

tos indólicos, mientras que el I. A. N. da color azul verdoso, de los indolnitrilos. Lo mismo sucede, con mayor diferencia de valores de Rf, cuando usamos el segundo disolvente.

La mancha correspondiente a los valores de Rf 0,22-0,25 (primer disolvente) y 0,12-0,14 (segundo disolvente) de los cromatogramas de extractos hormonales, presenta una característica fija. Consiste en que la mancha pierde rápidamente su color amarillento verdoso después de revelarla con el reactivo de Ehrlich, recuperándolo en un verde más intenso al volverla a calentar y siendo la mancha casi imperceptible cuando los cromatogramas se mantienen fríos.

Repasando bibliografía sobre este tema, encontramos que Stowe y Thimann (38) citan dos compuestos presentes en extractos vegetales que se revelaron y desarrollaron en las mismas condiciones de nuestra fracción ácida del extracto y cuyos Rf tienen valores próximos a los nuestros; estos compuestos son: ácido 5-hidroxiindolacético, de Rf 0,17, y ácido 7-hidroxiindolacético, de Rf 0,10; Kefford (23) obtiene en cromatogramas de extractos de plantas una mancha verde de Rf elevado y que identifica como I. A. N. Ninguno de estos compuestos encontrados por Stowe y Kefford presentan la característica citada de la variabilidad de intensidad del color verde, según se caliente o no el cromatograma.

En un trabajo posterior, Kaper y Veldstra (22), al estudiar el metabolismo del triptofano por el *Agrobacterium tumefaciens*, describen

Cuadro 3

Disolventes	Rf				
	A. I. A. (Merck)	A. I. B. (Merck)	A. I. Pc. (Merck)	I. A. (Fluka)	I. A. N. (Light)
Alcohol isopropílico : amoníaco (28 %) : agua (80 : 16 : 10)	0,49-0,54	0,76	0,65-0,66	0,97-0,98	0,99
Alcohol isopropílico : amoníaco : agua (10 : 1 : 1)	0,44	0,72	0,60	0,97-0,98	0,99

cómo el triptofano, precursor principal del A. I. A. por desaminación oxidante o transaminación, da como un intermediario el A. I. Pc. Este ácido es una sustancia extremadamente lábil, que al estudiarlo por cromatografía con disolventes alcalinos se descompone en siete compuestos, dos de los cuales los identifican como A. I. A. e I. A. y un tercero como A. I. G. Encuentran una mancha verde de Rf aproximado 0,11-0,12, con las mismas características que las nuestra de Rf 0,12-0,14 y 0,22-0,25 (según los disolventes); la que dan como A. I. G. con Rf 0,32 es equivalente a la nuestra de Rf 0,30-0,32 y 0,47; la situada en tercer lugar en desarrollo ascendente, como en nuestro caso, sólo se les revela en algunos cromatogramas, presentándose con caracteres constantes las cuatro manchas restantes, entre las que se encuentran el A. I. A. e I. A.

Esta concordancia de resultados, encontrada entre las experiencias de estos autores y las nuestras, se confirmó plenamente al estudiar comparativamente por cromatografía los extractos ácidos hormonales de los tumores y el A. I. Pc. Se obtuvieron en los dos casos la serie de siete manchas descritas anteriormente y con las mismas características de coloración, Rf y aparición variable en alguna de ellas (*figura 3*).

Estos resultados parecen demostrar que en estos extractos se encuentra presente A. I. A. libre y probablemente A. I. Pc., éste, bajo determinadas condiciones cromatográficas, se rompe, originando A. I. A. e I. A., quizás A. I. G. y las demás manchas que Kaper y Veldstra llaman «artefactos». Aunque exista seguramente en estos extractos A. I. Pc., sólo hemos podido demostrar, como los autores citados, la presencia de las distintas sustancias que origina al romperse este compuesto, cuando se desarrolla con disolventes alcalinos.

3b. Fracción neutra. En la fracción neutra de estos extractos, preparados según se dijo anteriormente, hemos podido investigar la presencia de I. A. E., I. Ac. e I. A. N., sintetizándose el I. Ac. en nuestro laboratorio, no habiendo podido comparar su pureza con el producto sintético y sólo con los datos como Rf, etc., dados por otros autores. El I. Ac. se sintetizó mediante acetilación del I. A. con anhídrido

(*) Deseo expresar mi agradecimiento a los doctores Kaper y Veldstra, de la Universidad de Leyden (Holanda), que amablemente me han proporcionado el ácido indolpirúvico para estas experiencias.

acético y ácido sulfúrico, siguiendo la técnica dada por Miller y colaboradores (34).

La acetilación no se consiguió en la totalidad del producto, pues quedó como impureza un resto de I. A., ya que en los cromatogramas desarrollados con alcohol etílico de 70 por ciento y revelados con el reactivo de Eck, se obtuvieron dos manchas, una de color violeta rojizo, que se corresponde con el Rf 0,45-0,50 dado por Yamaki y Nakamura para el I. Ac. puro en las mismas condiciones, y otra de Rf 0,95-0,97 de color amarillo fuerte, que corresponde al I. A. sin acetilar.

En los cromatogramas de la fracción neutra de desarrollo ascendente con alcohol isopropílico: amoníaco (28 %) : agua (80 : 10 : 10) y revelados con reactivo de Eck, se han obtenido dos manchas de color marrón oscuro, de Rf 0,47 y 0,98, que, aunque tienen igual Rf que el I. Ac. e I. A. N. puros, no son ninguno de ellos, por la diferencia de colores obtenida; esta diferencia se observa mejor revelando con el reactivo de Ehrlich, pues la mancha correspondiente al I. A. N. puro es de color pardo azulado y la de Rf 0,98 del extracto neutro es de color rojizo anaranjado.

En una experiencia comparativa de las fracciones neutra y ácida, esta última estudiada anteriormente, se han preparado cromatogramas de desarrollo descendente en alcohol etílico de 70 por ciento, que se revelaron con reactivo de Eck; en los cromatogramas de las dos fracciones se han obtenido, respectivamente, una mancha de color castaño oscuro y Rf 0,78; el I. A. N. puro en las mismas condiciones da un Rf 0,74-0,76, pero la mancha es de color amarillo fuerte.

Este estudio comparativo de las dos fracciones, ácida y neutra, también se ha llevado a cabo revelando con reactivo de Eck cromatogramas de la fracción ácida, desarrollados en solución isopropílica ascendente; hemos encontrado una mancha marrón oscura de Rf 0,47, que se corresponde con la del mismo Rf encontrada en un principio en la fracción neutra.

Estas manchas de Rf 0,47 presentes en las fracciones ácida y neutra, no son ningún compuesto indólico, pues al revelar estos cromatogramas con Ehrlich, en el de la fracción neutra no se ha puesto de manifiesto más que una mancha anaranjada, de Rf 0,95, y en el de la fracción ácida, las ya citadas en el apartado anterior.

Los cromatogramas de los extractos neutros se han desarrollado

Cuadro 4

Disolvente	Revelador	Rf y coloración				
		Fración neutra	I. Ac.	I. A.	I. A. N.	I. A. E.
Alcohol isopropílico : amoníaco (28 %) : agua (80 : 10 : 10)	Eck	0,47 0,95 (castaño oscuro)	0,45-0,50 (rojo violeta)	0,45-0,97 (amarillo)	0,97 (pardo verdoso)	
	Ehrlich	0,95 (anaranjada)	0,45-0,50 (rojiza)	0,97 (rojo violeta)	0,97 (pardo azul)	0,98 (púrpura)

Cuadro 5

Disolvente	Revelador	Rf y coloración		
		Fración ácida	Fración neutra	A. I. N.
Alcohol etílico (70 %)	Eck	0,78 (castaño oscuro)	0,78 (castaño oscuro)	0,74-0,76 (amarillo fuerte)
Alcohol isopropílico : amoníaco (28 %) : agua (80 : 10 : 10)	Eck	0,47 (castaño oscuro)	0,47-0,97 (castaño oscuro)	0,97 (pardo verdoso)

también en agua destilada, estando la cámara cromatográfica saturada con una solución de ácido acético o amoníaco de 10 por ciento; con el I. A. N. puro hemos obtenido un Rf 0,45-0,46, que es el mismo valor que da Bitancourt (7) para el I. A. N. puro y para el que identifica a partir de extractos de «crown-gall»; nosotros, con nuestro extracto, hemos obtenido una mancha única alargada, con cola, no pudiéndose comprobar la presencia de I. A. N., I. A. E. (*) e I. Ac. por comparación de los datos obtenidos con los Rf de los productos puros.

Tampoco hemos obtenido buen resultado cuando hemos utilizado como disolventes: tolueno (100 %); tolueno : agua (95 : 5); benceno (100 %), y benceno : agua (95 : 5), recomendados por Nitsch (35), pues, como en el caso anterior, el extracto tumoral da en los cromatogramas desarrollados con estos disolventes una mancha con mucha cola.

En el *cuadro 4* damos los resultados obtenidos en los ensayos cromatográficos con la fracción neutra y compuestos indólicos, frente a los reveladores de Eck y Ehrlich.

En el *cuadro 5* se da el resumen del estudio comparativo de las fracciones ácidas y neutras, donde se muestra la no identidad de sustancias con igual Rf, por no dar igual reacción coloreada con los mismos reactivos.

3c. *Triptofano*. Para investigar la presencia de triptofano en la fracción separada según la técnica de Yamaki y Nakamura, hemos empleado diferentes disolventes, y como reveladores el reactivo de Ehrlich y ninhidrina de 0,1 por ciento en alcohol propílico (Block (10)).

En el *cuadro 6* damos los valores de Rf obtenidos en la fracción triptofano del extracto tumoral y los del triptofano puro, con distintos disolventes. Estos resultados demuestran la presencia de triptofano en la fracción ensayada por igualdad en los valores Rf encontrados y en la coloración de las manchas con ninhidrina.

3d. *A. I. A., ligado*. Con los distintos disolventes y reveladores empleados no hemos encontrado en los cromatogramas de esta fracción mancha alguna.

(*) Indolacetato de etilo.

Cuadro 6

Disolvente	Rf	
	Fracción triptofano	Triptofano (Merck)
Alcohol isopropílico : amoníaco : agua (80 : 5 : 15)	0,45	0,43
Alcohol propílico : amoníaco : agua (60 : 30 : 10)	0,47	0,47
Alcohol butílico saturado con amoníaco (5 %)	0,45	0,45-0,47
Alcohol butílico : ácido acético : agua (60 : 15 : 25)	0,51	0,52
Alcohol butílico : ácido acético : agua (40 : 10 : 50)	0,51-0,52	0,52

4. *Cromatografía de los extractos obtenidos según la técnica de Bitancourt (7)*

Los resultados que hemos obtenido al estudiar cromatográficamente las fracciones ácida y neutra separadas por esta técnica, son concordantes con los obtenidos, respectivamente, según la técnica de Yamaki y Nakamura, estudiada anteriormente.

5. *Cromatografía del extracto clorofórmico obtenido según Thimann (39)*

Para los cromatogramas de estos extractos usamos en desarrollo ascendente alcohol isopropílico : amoníaco (23 %) : agua (80 : 10 : 10).

Al revelar con reactivo de Ehrlich, identificamos el I. A. con un Rf de 0,95-0,98 y, sin embargo, no encontramos A. I. A.

6. *Cromatografía del extracto alcohólico obtenido según Linser (32)*

Solamente hemos obtenido resultados positivos al revelar con Ehrlich, identificando, como en el caso anterior del extracto clorofórmico, el I. A.

7. *Cromatografía del extracto acuoso obtenido según Gorter (20)*

Hemos obtenido resultados negativos con todos los disolventes y reveladores empleados.

CONCLUSIONES

Obtuvimos la comprobación de la presencia de A. I. A. y otras sustancias auxínicas en los tumores, así como su biogénesis a partir del triptofano, vía A. I. Pc, al lograr identificar en los extractos hormonales preparados según las técnicas de Yamaki y Nakamura, Bitancourt, etc., y mediante cromatografía en disolventes alcalinos, los productos de descomposición del A. I. Pc., citados por Bentley y Hcusley (4) y Kaper y Veldstra (22), encontrando en nuestros cromatogramas al revelar con reactivo de Ehrlich, las seis manchas típicas citadas por dichos autores, de Rf: 0,20-0,22, 0,47, 0,49-0,54, 0,84, 0,90, 0,97-0,98 e identificándose a las de Rf 0,47 como A. I. G.; 0,49-0,54, como A. I. A., y 0,97-0,98, como I. A.

El no haber identificado auxina neutra alguna en las fracciones hormonales correspondientes de estos tumores, nos ha hecho descartar como posibles vías de formación del A. I. A. a partir del triptofano las que tienen como productos intermediarios, I. A. e I. A. N., proponiéndose, en consecuencia, como vía de la síntesis biológica del A. I. A. presente en los tumores, la que sigue este camino (Thimann (42): proteína → triptofano → A. I. Pc. → A. I. A.

Mientras que Kaper y Veldstra sólo observaron esta vía de formación del A. I. A. en medios de cultivo sintético, nosotros la hemos logrado identificar, a pesar de la inestabilidad del A. I. Pc., como un proceso biogénético, ya que lo conseguimos partiendo de un material biológico como son los tumores del olivo.

RESUMEN

Se estudia en los tumores bacterianos del olivo la biogénesis del ácido β -indolacético a partir del triptofano, encontrándose que ésta se realiza por la vía del ácido indolpirúvico y cuyos productos de descomposición se identifican en los extractos tumorales, mediante cromatografía en disolventes alcalinos.

SUMMARY

The biogenesis of the β -indole acetic acid from triptophan in the olive oil bacterial tumors has been studied. We have found that the biogenesis takes place *via* β -indole pyruvic acid. The degradation products in the tumoral extracts are identified by chromatography in alkaline solvents.

BIBLIOGRAFIA

1. BELTRÁ, R. 1958. Relación entre la concentración de triptofano en los tallos de olivo y la localización de los tumores bacterianos. *Microbiol. Españ.*, 4, 401-10.
2. BELTRÁ, R. 1959. El ácido β -indolacético y los tumores vegetales de origen bacteriano. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 2, 23-32.
3. BENNET-CLARK, T. A.; TAMBIAH, H. S., y KEFFORD, N. P. 1952. Estimation of plant growth substances by partition chromatography. *Nature*, 169, 452-53.
4. BENTLEY, J. A., y HOUSLEY, S. 1956. Growth of avena coleoptile sections in solutions of 3-indolylacetic acid and 3-indolylacetonitrile. *Physiol. Plantarum*, 6, 480.
5. BEREMBLUM, I. 1944. Irritation and carcinogenesis. *Arch. Pathol.*, 38, 233-44.
6. BERTHELOT, A., y AMOREAUX, G. 1938. Sur la formation d'acide indole-3-acétique dans l'action de *Bacterium tumefaciens* sur le tryptophane. *Compt. Rend.*, 206, 537-40.
7. BITANCOURT, A. A. 1954. La nature des auxines des tumeurs vegetales. *Année Biol.*, 30, 7-10.
8. BITANCOURT, A. A. 1955. Recherches physiologiques sur les auxines. *Rev. Gen. Botan.*, 62, 498-594.
9. BITANCOURT, A. A.; SCHWARZ, K., y DIERBERGER, R. 1954. La nature des auxines de tumeurs vegetales. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 148, 822-25.
10. BLOCK, R. J. 1952. Paper chromatography, 58.
11. BRAUN, C. A. 1943. Studies on tumor inception in the crown-gall disease. *Am. J. Botany*, 30, 674-77.
12. BRAUN, C. A. 1951. Cellular autonomy in crown-gall. *Phytopathology*, 41, 963-66.
13. BRAUN, C. A. 1958. A physiological basis for autonomous growth of the crown-gall tumor cell. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 44, 338-68.
14. BRAUN, C. A., y LASKARIS, T. 1942. Tumor formation by attenuated crown-gall bacteria in the presence of growth-promoting substances. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 28, 468-77.
15. GAUTHERET, R. J. 1946. Comparaison entre l'action de l'acide indole-acétique et celle de *Phytomonas tumefaciens* sur la croissance des tissus vegetaux. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 140, 169-71.

16. GAUTHERET, R. J. 1947. Sur les besoins en heteroauxine des cultures de tissus de quelques vegetaux. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 141, 627-29.
17. GAUTHERET, R. J. 1948. Action de l'acide indole-acetique sur le development de trois types de tissus de Scorsonere: tissus normaux, tissus de crown-gall et tissus accoutumés a l'hetero-auxine. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 142, 774-75.
18. GORDON, S. A. 1956. The biogenesis of natural auxins. *En R. L. Wain y F. W. Wightman (ed.): The chemistry and mode of action of plant growth substances*, 65-75. Academic Press, Nueva York.
19. GORDON, S. A., y WEBER, R. P. 1951. Colorimetric stimation of indolacetic acid. *Plant Physiol.*, 26, 192-95.
20. GORTER, R. M. 1932. Diss. Utrecht.
21. HENDERSON, J. H., y BONNER, J. 1952. Auxin metabolism in normal and crown-gall tissue of sunflower. *Am. J. Botany*, 39, 444-51.
22. KAPER, J. M., y VELDSTRA, H. 1958. On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 30, 401-20.
23. KEFFORD, N. P. 1955. The growth substances separated from plant extracts by chromatography. *J. Exp. Botany*, 6, 129-51.
24. KLEIN, R. M. 1952. Nitrogen and phosphorous fractions respiration and structure of normal and crown-gall tissues of tomato. *Plant Physiol.*, 335-44.
25. KLEIN, R. M. 1957. The activation of metabolic systems during crown-gall tumor cell formation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 43, 956-60.
26. KLEIN, R. M. 1958. Activation of metabolic systems during tumor cell formation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 44, 338-68.
27. KLEIN, R. M., y LINK, K. K. 1952. Studies on the metabolism of plant neoplasms. V. Auxin as a promoting agent in the transformation of normal to crown-gall tumor cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 38, 1.066-72.
28. KULESCHA, Z., y GAUTHERET, R. J. 1948. Sur l'elaboration de substances de croissance par trois types de cultures de tissus de Scorsonere: cultures normales, cultures de crown-gall et cultures accoutumés a l'heteroauxine. *Compt. Rend.*, 227, 292-94.
29. LARSEN, P. 1951. Formation, occurrence and inactivation of growth substances. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 2, 169-95.
30. LEFEBRE, J. 1939. Observations sur la teneur de divers organes vegetaux en acide indole-3-acetique. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 130, 225-27.
31. LINK, G. K. K., y EGGERS, V. 1941. Hyperauxing in the crow-gall of tomato. *Botan. Gaz.*, 103, 87-106.
32. LINSER, H. 1939. Zur methodik der Weichssfondestimmung. II. Die Extraction von Pflanzenmaterial. *Planta*, 29, 392-408.
33. LOCKE, S. B.; RIKER, A. J., y DUGGAR, B. M. 1938. Growth substance and the development of crown-gall. *J. Agr. Research*, 57, 21-39.
34. MILLER, C. O.; SKOOG, F.; OKAMURA, F. S.; SALTZA, M. H., y STRONG, F. M. 1956. Isolation structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 1.375-80.
35. NITSCH, J. P., y NITSCH, C. 1955. The separation of natural plant growth substances by paper chromatography. *Beitr. Biol. Pflanz.*, 387-408.

36. OVERBEEK, J. 1938. A simplified method of auxin extraction. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 24, 42-46.
37. SKOOG, F. 1937. A deseeded avena test method for small amounts of auxin and auxin precursor. J. Gen. Physiol., 20, 311-34.
38. STOWE, B. B., y THIMANN, K. V. 1954. The paper chromatography of indole compounds and some indol-containing auxins of plant tissues. Arch. Biochem. Biophys., 51, 499-516.
39. THIMANN, K. V. 1934. Studies on the growth hormone of plants. VI. The distribution of the growth substance in plant tissues. J. Gen. Physiol., 18, 23-34.
40. THIMANN, K. V. 1935. On the plant growth hormone produced by *Rhizopus stinus*. J. Biol. Chem., 109, 279.
41. THIMANN, K. V. 1953. Hydrolysis of indole acetonitrile in plants. Arch. Biochem. Biophys., 44, 392.
42. THIMANN, K. V. 1956. L'origine et les fonctions des auxines, 13-24.
43. THOMAS, A. J., y KLEIN, R. M. 1959. *In vitro* synthesis of the crown-gall tumour-inducing principle. Nature, 183, 46-54.
44. VLITOS, A. J., y MEUDT, W. 1953. The role of auxin in plant flowering I. A quantitative method based on paper chromatography for the determination of indole compounds and of 3-indolacetic acid in plant tissues. Contrib. Boyce Thompson Inst., 17, 197-202.
45. VLITOS, A. J.; MEUDT, W., y REIMLER, R. 1956. The role of auxin in plant flowering. IV. A new unidentified naturally occurring indole hormone in normal acid gamma irradiated Maryland mammoth tobacco. Contrib. Boyce Thompson Inst., 18, 283-93.
46. WILDMAN, S. G.; FERRY, M. G., y BONNER, J. 1957. The enzymatic conversion of tryptophan to auxin by spinach leaves. Arch. Biochem. Biophys., 13, 131.
47. YAMAKI, T., y NAKAMURA, K. 1952. Formations of indole acetic in maize embryo. Sci. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo, 2, 81-98.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE ACIDO CITRICO POR FERMENTACION

VI. Influencia del tratamiento por alcoholes en la fermentación superficial de melazas de azúcar

POR
A. PUENTE y B. REGUEIRO

INTRODUCCION

Revisando la bibliografía referente al mejoramiento de la producción de ácido cítrico por fermentación, encontramos que Schweiger y Snell (5) añadían 500 ppm de morfina a un medio sintético y obtenían un aumento en la eficacia de la fermentación, estimulando la germinación, estabilizando los caracteres y produciendo cítrico más rápidamente.

Sin embargo, el efecto más notable es el conseguido por la adición de alcoholes de bajo peso molecular, como hace Moyer (4). Sus cultivos apenas presentan esporulación, y sabemos que cuando la producción de ácido cítrico se eleva, se presenta este efecto. Esto ocurre sobre todo, cuando se adiciona a los medios un 3 por ciento de metanol o etanol.

Malo y Regueiro (2) adicionan metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol a medios sintéticos en fermentación superficial, y observan que el mejor efecto es producido por el metanol, que disminuye el consumo de azúcar y la cantidad de micelio, frena el crecimiento y la esporulación, pero en cambio produce mayor cantidad de ácido cítrico. Así, en un medio sintético, con un 4 por ciento de metanol, logran un 56,8 por ciento de ácido cítrico, aumentando esta cifra si falta cobre o manganeso.

En esto influye bastante la raza de hongo, pues hay algunas de éstas poco tolerantes al metanol. Moyer (4) adiciona también alcoholes a medios con melazas de azúcar, observando que el metanol aumenta el rendimiento en ácido cítrico en medio de melazas de remolacha, y aun más si éstas están tratadas por ferrocianuro.

En el presente trabajo estudiamos la influencia de la adición de algunos alcoholes, como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol a medios con melazas de remolacha y de caña, ambos tratados y sin tratar con ferrocianuro, aparte del estudio de otros factores adicionales.

MÉTODOS

En este trabajo se emplean los métodos generales dados por Malo y Regueiro (1) y Puente y Regueiro (4) en relación con el hongo utilizado (*Aspergillus niger* 72-4 Wiss. mutante), los medios de conservación y fermentación, y el control de las muestras. La adición de los alcoholes se realiza después de la esterilización del medio.

Se realizan determinaciones de pH, cantidad de micelio, azúcar remanente, acidez titulable y ácido cítrico, por técnicas dadas anteriormente.

RESULTADOS

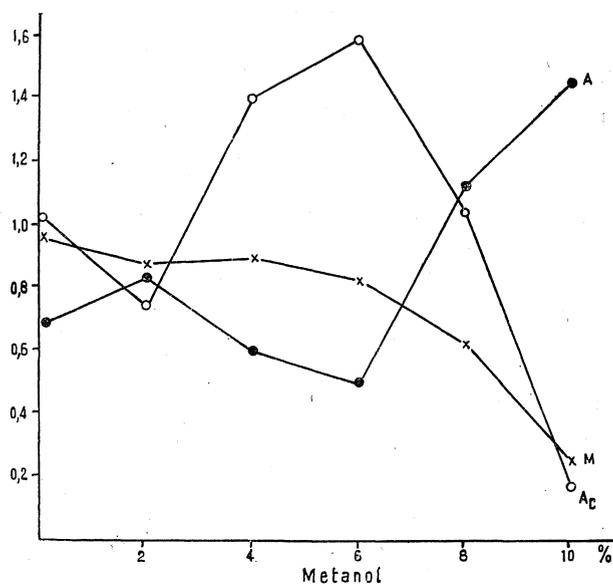
En primer lugar, estudiamos la posible influencia de los diferentes alcoholes (metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol) en la fermentación de melazas de remolacha y caña. Después estudiamos en medios adicionados con metanol, la influencia del pH, complexonas y el medio de inoculación. Por último, vemos si la morfina posee influencia en nuestros medios.

Influencia del metanol

Para ver ésta se utilizan cuatro tipos de medios, a los que se adicionan diferentes cantidades de metanol, como se indica en las gráficas correspondientes.

a) Medio con melazas de remolacha, cuyos resultados se expresan en la *figura 1*. A medida que aumenta la concentración de me-

tanol disminuye la cantidad de micelio; a partir del 6 por ciento empieza a bajar el consumo de azúcar, subiendo el ácido cítrico hasta 79,6 por ciento; a partir de esta concentración empieza a bajar rápida-



A = Azúcar, porcentaje. Ac = Ácido cítrico, porcentaje.
M = Micelio, gramos

Figura 1

A, × (*) 5. Ac, × 50

mente. El crecimiento es lento a medida que sube el metanol, y no hay esporulación hasta los seis días.

El medio sin metanol da un micelio liso, consistente, con esporulación completa en pardo oscuro y cabezas esporíferas pequeñas; con 2-4 por ciento de metanol, el micelio tiene esporulación en pardo oscuro y cabezas esporíferas grandes; con 6 por ciento de metanol, el micelio ya aparece blanco y no esporulado, y, finalmente, con 8-10 por ciento de metanol, apenas hay crecimiento.

(*) En cada caso, la cifra exacta se obtiene multiplicando la de la escala por el número que va detrás de este signo.

b) Medio también con melazas de remolacha, pero tratadas por ferrocianuro en la forma general; sus resultados se expresan en la *figura 2*. Observamos que hay aumento de micelio hasta 2 por ciento de metanol, y después baja rápidamente; a su vez, el consumo de azúcar comienza a bajar rápidamente a partir de 4 por ciento de metanol; el ácido cítrico sube hasta 69,6 por ciento en presencia de

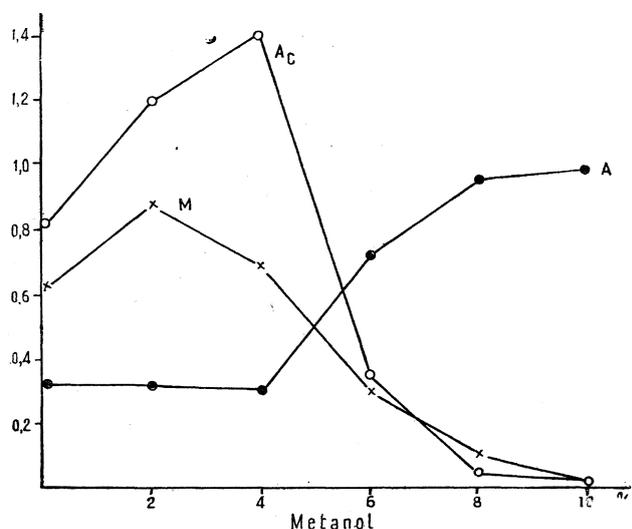


Figura 2

A, $\times 10$. A_c, $\times 50$

4 por ciento de metanol, bajando después rápidamente. El crecimiento es cada vez más lento a medida que sube el metanol, y no hay esporulación.

El medio sin metanol da un micelio blanco, consistente, con esporulación incompleta en pardo, apenas micelio sumergido; con 2-4 por ciento de metanol, el micelio es blanco, consistente, muy rugoso y no esporulado; con más metanol, apenas hay crecimiento.

c) Medio con melazas de caña, cuyos resultados se expresan en la *figura 3*. Observamos que la cantidad de micelio, así como el consumo de azúcar, baja ligeramente; el ácido cítrico sube hasta 40 por ciento con 4 por ciento de metanol. El crecimiento, como en los

casos anteriores, es cada vez más lento a medida que sube el metanol, y no hay esporulación.

El medio sin metanol, o el que tiene de 1-2 por ciento de metanol, da un micelio totalmente esporulado en pardo oscuro, el primero, y pardo negruzco, los demás; con más cantidad de metanol se produce micelio amarillo tenue y sin esporular.

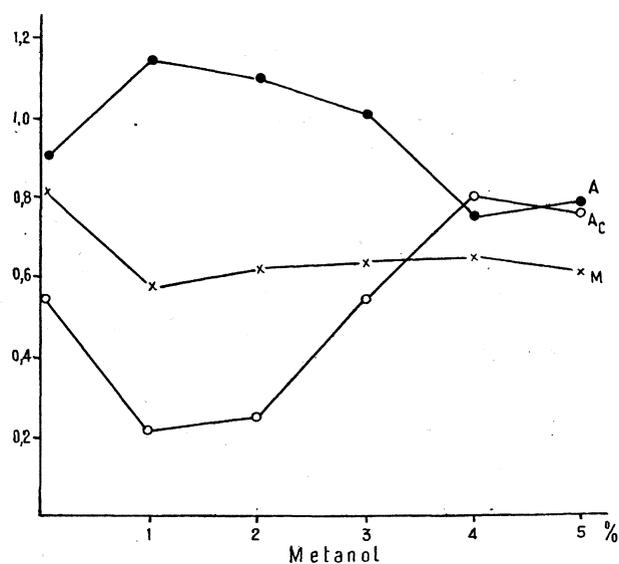


Figura 3

A, $\times 5$. Ac, $\times 50$

d) Medio también de melazas de caña, pero tratadas por ferrocianuro en la forma general; sus resultados se expresan en la figura 4. Observamos alguna disminución de micelio en presencia de metanol, así como de consumo de azúcar; en cuanto a la producción de ácido cítrico, parece que hay pocas variaciones, manteniéndose entre 30-35 por ciento en presencia de metanol. De todas maneras, el crecimiento se hace cada vez más lento a medida que sube el metanol, y no hay esporulación.

El medio sin metanol produce un micelio consistente, ligeramente rugoso, parcialmente esporulado en pardo oscuro; con 1-4 por ciento de metanol, el micelio es ligeramente rugoso, parcialmente esporula-

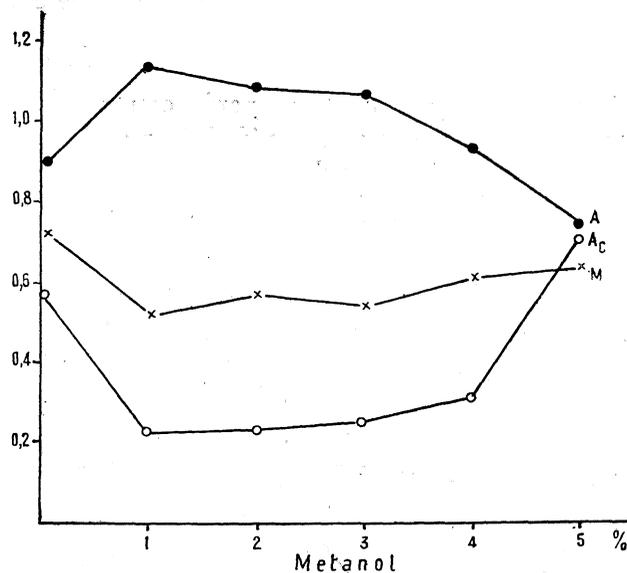


Figura 4

A, $\times 5$. Ac, $\times 50$

do en pardo, aumentando su consistencia con la cantidad de metanol; con 5 por ciento de metanol, el micelio es consistente, ligeramente rugoso, amarillo y no esporulado.

Influencia del etanol

Para estas experiencias se siguen las técnicas generales de fermentación, utilizando los cuatro tipos de medios dados en la experiencia anterior, a los que se añaden diferentes cantidades de etanol (0,5 por ciento). En líneas generales, el etanol influye poco en la producción de ácido cítrico por fermentación, pero, de todas maneras, veamos lo que ocurre en cada caso particular.

a) Medio con melazas de remolacha. Hay muy poca variación del pH, cantidad de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico; de todas maneras, el etanol retrasa el crecimiento, aunque no inhibe la esporulación.

En cuanto a los caracteres morfológicos que presentan los culti-

vos a los seis días, el medio sin etanol presenta micelio liso, consistente, esporulación completa en pardo oscuro, con cabezas esporíferas pequeñas; con 1-4 por ciento de etanol es parecido, pero la esporulación es incompleta; con un 5 por ciento de etanol, el micelio es amarillo, con esporulación en los bordes.

b) Medio también con melazas de remolacha, pero tratadas con ferrocianuro. Aquí tampoco se observa variación apreciable en los factores y testigos de fermentación, como en el caso anterior.

En cuanto a los caracteres morfológicos, el medio sin etanol da un micelio blanco, consistente, con esporulación incompleta en pardo y micelio algo sumergido; con 1-3 por ciento de etanol, el micelio es consistente; la esporulación, incompleta, en pardo, rugosa; con 4 por ciento de etanol, el micelio es amarillo, ligeramente rugoso, no esporulado; con 5 por ciento se produce un micelio blanco, muy tenue, que cubre toda la superficie, y no esporulado.

c) Medio con melazas de caña. No se observan variaciones apreciables en los factores analizados, como en los casos anteriores.

En cuanto a los caracteres morfológicos, el medio sin etanol da un micelio consistente, esporulado en pardo; con 1-4 por ciento de etanol da micelio ligeramente consistente, esporulado en pardo ceniza; con 5 por ciento de etanol da lo mismo.

d) Medio también de melazas de caña, pero tratadas con ferrocianuro. No se observan variaciones apreciables, como en casos anteriores.

En cuanto a caracteres morfológicos, el medio sin etanol da un micelio consistente, ligeramente rugoso, totalmente esporulado en pardo oscuro; con 1-2 por ciento de etanol se produce un micelio de mayor consistencia, liso, totalmente esporulado en pardo; con 3-4 por ciento de etanol, el micelio es consistente, liso, totalmente esporulado en pardo grisáceo, y con 5 por ciento de etanol se produce un micelio ligeramente consistente, liso, totalmente esporulado en pardo grisáceo.

Influencia del propanol

Para esta experiencia se siguen las técnicas generales anteriores de fermentación, utilizando también los cuatro tipos de medios, a los que se añaden diferentes cantidades de propanol (0-1,4 por ciento). En líneas generales, se observa influencia del propanol en el caso de

medios preparados con melazas de remolacha, pero no en las melazas de caña, como veremos a continuación en cada caso.

a) Medio con melazas de remolacha, cuyos resultados se expresan en la *figura 5*. Se observa poca variación hasta 0,8 por ciento de propanol, pero después hay aumento de pH, disminución de micelio y consumo de azúcar y caída rápida de producción de ácido cítrico. Se retrasa el crecimiento, pero no se impide la esporulación.

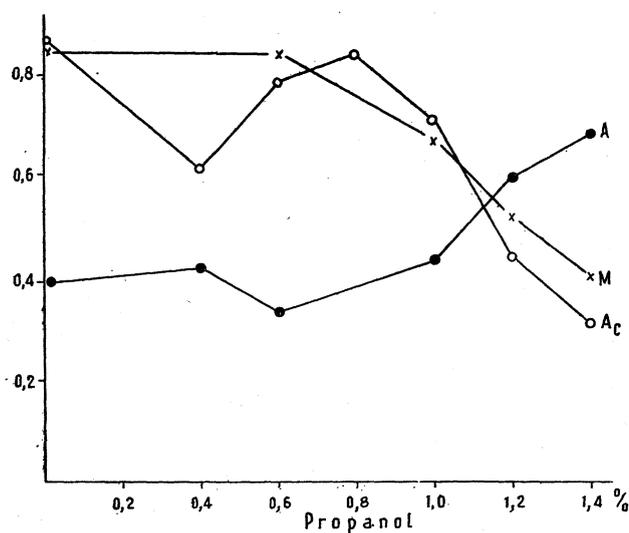


Figura 5

A, $\times 10$. Ac, $\times 50$

En cuanto a los caracteres morfológicos, el medio sin propanol da micelio consistente, ligeramente rugoso y esporulación parda oscura; con 0,4-0,8 por ciento de propanol se produce micelio liso total y esporulación cenicienta; con 0,8 por ciento de propanol, el micelio es liso totalmente y amarillo y esporulación cenicienta, escasa; con 1,0-1,4 por ciento, el micelio sólo crece en los bordes, en amarillo y no esporulado.

b) Medio con melazas de remolacha, pero tratadas con ferrocianuro; sus resultados se expresan en la *figura 6*. Se observa que la adición de 0,4 por ciento de propanol hace subir la producción de

ácido cítrico a 6l por ciento, para después bajar rápidamente con más concentración; también tiende a disminuir la cantidad de micelio y el consumo de azúcar. El crecimiento se retrasa y no se impide la esporulación.

En cuanto a los caracteres morfológicos, el medio sin alcohol da micelio blanco sucio, rugoso y no esporulado; con 0,4-0,6 por ciento de

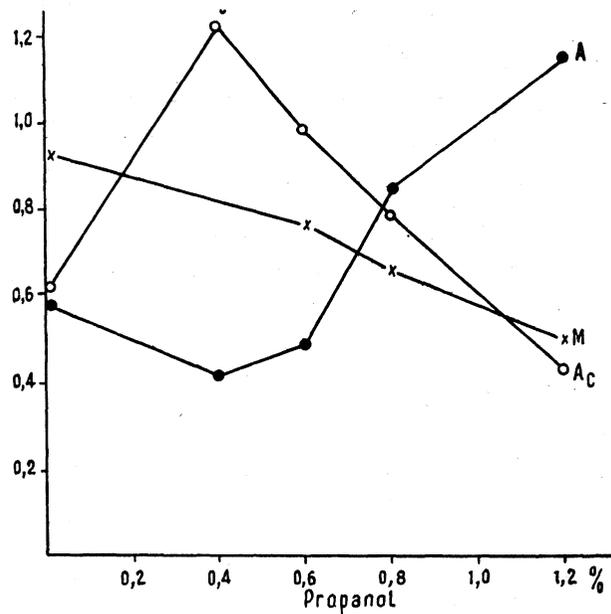


Figura 6

A, $\times 5$. Ac, $\times 50$

propanol da micelio amarillo, rugoso y no esporulado; con 0,8-1,2 por ciento de propanol da micelio amarillo en el borde y no esporulado.

c) Medio con melazas de caña. No se observan grandes variaciones en cuanto a los factores que se estudian.

En relación con los caracteres morfológicos, el medio sin alcohol da micelio totalmente esporulado en pardo oscuro; con 0,3-0,6 por ciento de propanol, se produce micelio ligeramente consistente, esporulado en pardo; de 0,9-1,2 por ciento de propanol se produce micelio amarillo, ligeramente consistente y no esporulado.

d) Medio con melazas de caña, pero tratadas con ferrocianuro. No se observan tampoco grandes variaciones en cuanto a los factores que se estudian.

En relación con los caracteres morfológicos, el medio sin alcohol da micelio blanco, liso, ligeramente esporulado; con 0,3-0,6 por ciento de propanol, da micelio amarillo, liso, ligeramente esporulado; con 0,9-1,2 por ciento de propanol se produce micelio blanco y ligero, no esporulado.

Influencia del isopropanol

Para esta experiencia se siguen las técnicas generales anteriormente señaladas, utilizando los cuatro tipos de medios, a los que se añaden diferentes cantidades de isopropanol (0-1,2 por ciento). En líneas generales, este alcohol ejerce poca influencia en la fermentación de melazas de remolacha y caña. Veamos cada caso particular.

a) Medio con melazas de remolacha. No se observa acción apreciable en el pH, cantidad de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico. Se retrasa el crecimiento, pero no se afecta la esporulación.

En cuanto a los caracteres morfológicos, a los cinco días de fermentación el medio sin alcohol da micelio consistente, ligeramente rugoso, con esporulación parda oscura; con 0,4-0,8 por ciento de isopropanol da lo mismo, pero la esporulación es color ceniza; con 1,0-1,4 por ciento, el micelio es amarillo, consistente, ligeramente rugoso y no esporulado.

b) Medio también de melazas de remolacha, pero tratadas con ferrocianuro. No se observa variación de pH, cantidad de micelio y consumo de azúcar, pero el ácido cítrico sube a 47,5 por ciento con 0,6 por ciento de isopropanol. El crecimiento y la esporulación no se afectan.

En cuanto a los caracteres morfológicos, en todos, a los cinco días, aparece el micelio blanco, sucio, rugoso, no esporulado, con tomento blanco en toda la superficie.

c) Medio de melazas de caña. No se observan variaciones en el pH, cantidad de micelio y consumo de azúcar. En cuanto a la producción de ácido cítrico, la presencia del isopropanol reduce su cantidad. El crecimiento es más lento y no se afecta la esporulación.

En cuanto a los caracteres morfológicos, a los seis días el medio sin alcohol está totalmente esporulado en pardo oscuro; con 0,3-0,6 por ciento de isopropanol se produce micelio ligeramente consistente y parcialmente esporulado en pardo ceniza; con 0,9-1,2 por ciento de isopropanol, el micelio se presenta blanco grisáceo, ligeramente consistente y con comienzo de esporulación.

d) Medio también con melazas de caña, pero tratadas por ferrocianuro. No se observa gran variación en cuanto al pH, cantidad de micelio y consumo de azúcar; en cuanto a la producción de ácido cítrico, la presencia del alcohol hace bajar su cantidad.

En cuanto a los caracteres morfológicos que se presentan a los ocho días de fermentación, el medio sin alcohol tiene micelio consistente, ligeramente rugoso, esporulado en pardo oscuro; con 0,3-0,9 por ciento de isopropanol se produce micelio grueso, consistente y liso, esporulado en pardo; con 1,2 por ciento de alcohol, es igual, pero la esporulación es en pardo claro.

Influencia del butanol

Para esta experiencia se siguen las técnicas generales antes señaladas y empleando los cuatro tipos de medios a los que se añaden diferentes cantidades de butanol (0-0,8 por ciento). En líneas generales, se observa influencia del butanol en el caso de medios preparados con melazas de caña, pero no tanto en los de melazas de remolacha, como se indica a continuación.

a) Medio con melazas de remolacha, en el que se observa muy poca variación en cuanto al pH, cantidad de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico (da 61 por ciento, con 0,4 por ciento de butanol). El crecimiento se retrasa y la esporulación no se afecta.

En cuanto a los caracteres morfológicos, a los siete días de fermentación, el medio sin alcohol da micelio consistente, ligeramente rugoso y totalmente esporulado en pardo; con 0,2 por ciento de butanol da micelio parcialmente esporulado en pardo ceniza; con 0,4 por ciento de butanol da micelio blanco, ligero, consistente y no esporulado, con manchas de color ocre.

b) Medio también con melazas de remolacha, pero tratadas con ferrocianuro. Como en el caso anterior, no se observa variación apre-

ciable de pH, cantidad de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico. El crecimiento se retrasa y además se impide la esporulación.

En cuanto a los caracteres morfológicos, el medio sin alcohol da micelio blanco sucio, poco esporulado, en pardo; con 0,2-0,4 por ciento de butanol da micelio blanco, poco consistente, que cubre toda la superficie y no esporulado; con 0,6 por ciento de butanol, el micelio es blanco, tenue y no esporulado; lo mismo sucede con 0,8 por ciento de butanol.

c) Medio con melazas de caña, cuyos resultados se expresan en la figura 7. El pH tiene tendencia a elevarse, y se observa que la

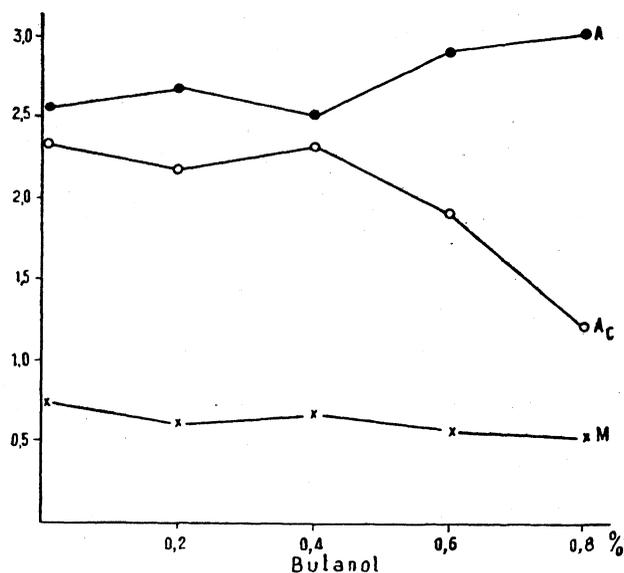


Figura 7

A, $\times 2$. A_c, $\times 10$

cantidad de micelio no varía, pero el consumo de azúcar y la cantidad de ácido cítrico tienden a bajar a partir de 0,5 por ciento de butanol. El crecimiento se retrasa y se impide la esporulación.

En cuanto a los caracteres morfológicos, el medio sin alcohol da micelio esporulado, totalmente en pardo oscuro; con 0,2 por ciento de

butanol da micelio aéreo, ligero, rugoso y no esporulado; con 0,4-0,6 por ciento de butanol da micelio blanco, ligero, consistente, no esporulado; y con 0,8 por ciento de butanol da micelio blanco, tenue y no esporulado.

d) Medio también con melazas de caña, pero tratadas con ferrocianuro, y cuyos resultados se expresan en la *figura 8*. El pH tiene tendencia a elevarse; la cantidad de micelio baja lentamente, pero el

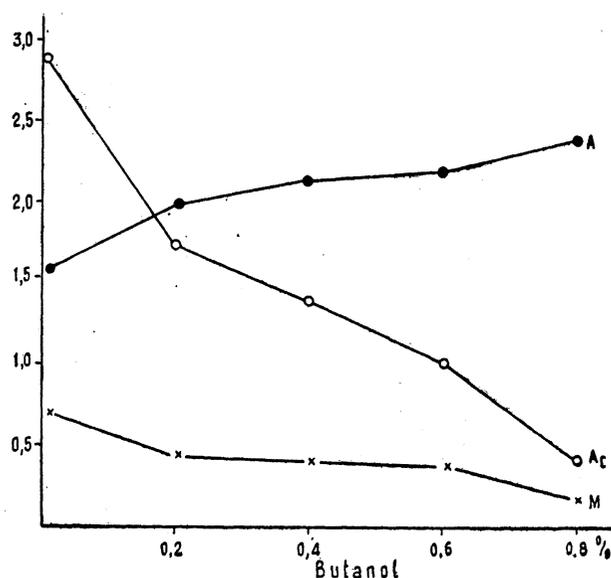


Figura 8

A, $\times 3$. Ac, $\times 10$

consumo de azúcar y la producción de ácido cítrico disminuyen rápidamente. El crecimiento se retrasa y se impide la esporulación.

En cuanto a los caracteres morfológicos, el medio sin alcohol presenta micelio blanco y consistente, ligeramente rugoso y esporulado en pardo; con 0,2-0,6 por ciento de butanol, el micelio es blanco sucio, ligeramente consistente, en parte sumergido y no esporulado; con 0,8 por ciento de butanol no se forma micelio.

Influencia del isobutanol

Para esta experiencia se siguen las técnicas generales antes mencionadas y empleando los cuatro tipos de medios, a los que se añaden diferentes cantidades de isobutanol (0-0,8 por ciento). Los resultados de cada caso se dan a continuación.

a) Medio con melazas de remolacha, en el que se observa a partir de la adición de 0,5 por ciento de isobutanol, disminución en

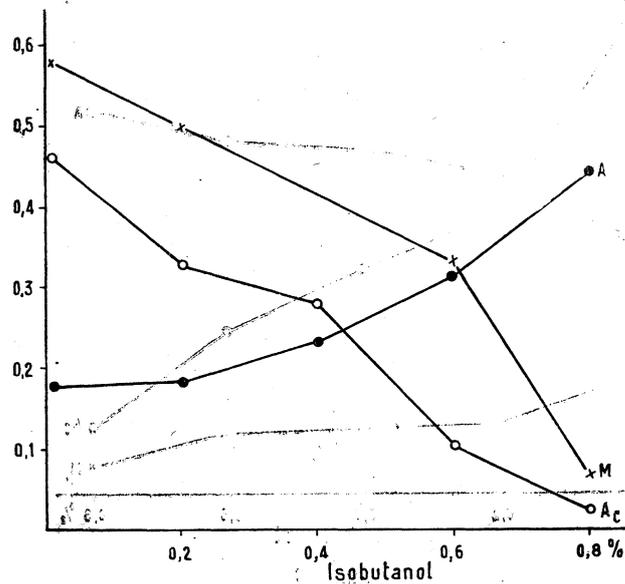


Figura 9

A, $\times 20$. A_c, $\times 100$

el consumo de azúcar y en la producción de ácido cítrico; el pH y la cantidad de micelio varían ligeramente. El crecimiento se retrasa y se impide la esporulación.

En cuanto a los caracteres morfológicos, el medio sin alcohol, a los siete días, da un micelio consistente, ligeramente rugoso y totalmente esporulado en pardo; con 0,2 por ciento de isobutanol, el micelio es blanco, consistente, con el centro sumergido y no esporulado; con 0,4 por ciento de isobutanol da micelio blanco, tenue, con man-

chas ocreas y no esporulado; con 0,6-0,8 por ciento de isobutanol, el micelio es blanco, tenue y no esporulado.

b) Medio de melazas de remolacha, pero tratado con ferrocianuro; sus resultados se expresan en la figura 9. El pH tiene tendencia a elevarse; se observa que la cantidad de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico disminuyen rápidamente hasta

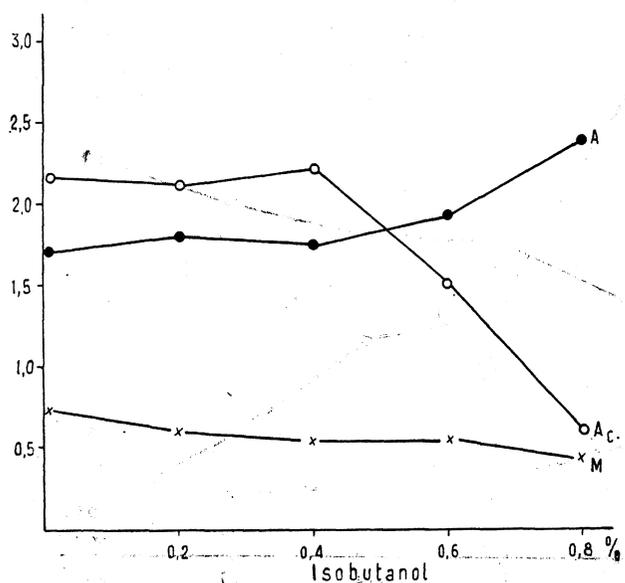


Figura 10

A, $\times 3$; Ac, $\times 10$

anularse a una concentración de 0,8 por ciento de isobutanol. El crecimiento se retrasa y la esporulación se impide.

En relación con los caracteres morfológicos, el medio sin alcohol da un micelio consistente, escasamente esporulado en pardo; con 0,2-0,4 por ciento de isobutanol da micelio blanco sucio, tenue y no esporulado; en las demás concentraciones no se forma micelio.

c) Medio de melazas de caña; sus resultados se expresan en la figura 10. El pH tiende a elevarse; la cantidad de micelio y el consumo de azúcar disminuyen lentamente, y el ácido cítrico disminuye rápidamente a partir de la adición de 0,4 por ciento de isobutanol.

En lo relativo a los caracteres morfológicos, el medio sin alcohol da un micelio totalmente esporulado en pardo oscuro; con 0,2 por ciento de isobutanol da lo mismo; con 0,4-0,6 por ciento de isobutanol da micelio blanco, liso, ligeramente consistente y no esporulado; con 0,8 por ciento de isobutanol no se produce micelio.

d) Medio también con melazas de caña, pero tratadas con ferrocianuro; sus resultados se expresan en la *figura 11*. El pH tiene ten-

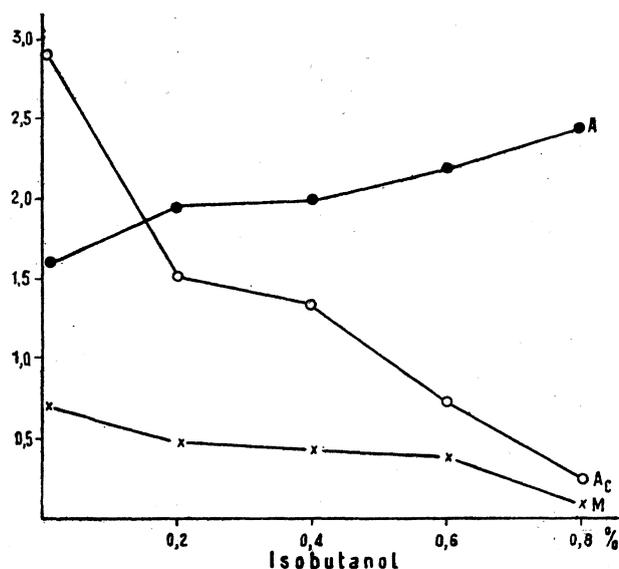


Figura 11

A, $\times 3$. Ac, $\times 10$

dencia a elevarse; la cantidad de micelio baja lentamente, así como el consumo de azúcar; en cambio, la producción de ácido cítrico disminuye rápidamente hasta anularse, con 0,8 por ciento de isobutanol.

En relación con los caracteres morfológicos, el medio sin alcohol da un micelio blanco, consistente, ligeramente rugoso, totalmente esporulado en pardo; con 0,2 por ciento de isobutanol da micelio blanco sucio, liso, no esporulado; con 0,4 por ciento de isobutanol da lo mismo, y con mayor cantidad no se forma micelio.

Influencia del pH en medio de melazas con metanol

Para esta experiencia se siguen las técnicas generales antes mencionadas, con medios con melazas de remolacha y caña, a los que se adiciona 6 por ciento de metanol. Se prueba la acción del pH inicial entre 3,5-6,5.

En el caso de medios con melazas de remolacha, sus resultados se expresan en la *figura 12*. Se observa que, tanto la cantidad de micelio

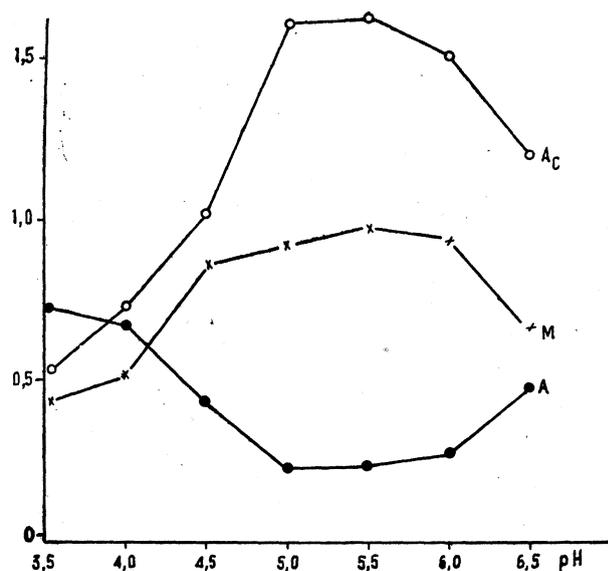


Figura 12

A, $\times 10$. Ac, $\times 50$

como el consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, se van elevando a medida que se sube el pH hasta 5,5, en que se produce 81,6 por ciento de conversión de azúcar en ácido cítrico. El pH no influye ni en el crecimiento ni en la esporulación, la cual se inhibe por debajo de pH 5,0.

En el caso de medios con melazas de caña no se encuentra que el pH afecte a la fermentación en alguno de los factores estudiados.

En cuanto a los caracteres morfológicos, a los tres días no hay di-

ferencias entre todos los medios; a los seis días, en medios de melazas de remolacha y hasta pH 4,5, se produce micelio blanco, y a más pH, es amarillo; en los medios con melazas de caña, el micelio es blanco, ligeramente rugoso, hasta un pH 7,5, en que el micelio se hace poco consistente y liso.

Influencia de las complexonas en medio de melazas con metanol

Para esta experiencia se siguen las técnicas generales antes señaladas, con medios de melazas de remolacha y caña; se adiciona 1-4 por ciento de metanol y 0,1589 por ciento de complexona IV² (ADCT)

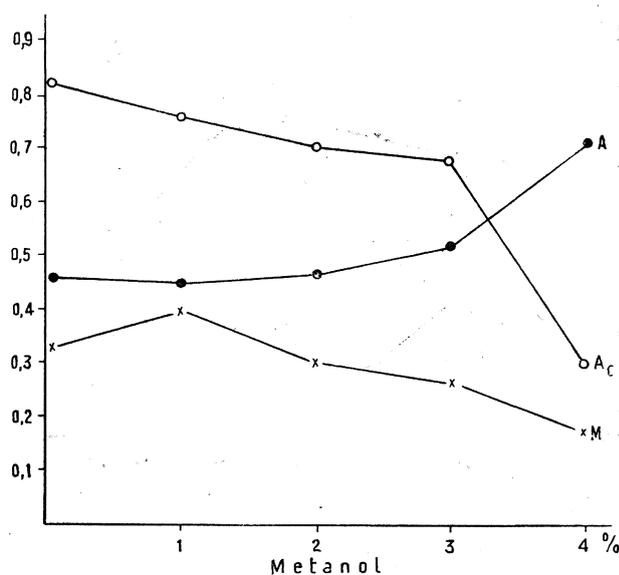


Figura 13

A, $\times 10$. Ac, $\times 50$

a las melazas de remolacha, y 0,2932 por ciento de la misma complexona a las melazas de caña.

En el caso de las melazas de remolacha y hasta 4 por ciento de metanol, no hay variaciones en el pH, cantidad de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico (da 80 por ciento con 3 por

ciento de metanol). Si se añade 5 por ciento de metanol, disminuyen rápidamente todos los factores. El crecimiento tiende a disminuir y la esporulación se impide con 5 por ciento de metanol.

En cuanto a los caracteres morfológicos, a los ocho días de fermentación, hasta 2 por ciento de metanol, el micelio es consistente y esporulado en pardo oscuro; con 3-4 por ciento de metanol, es amarillo, poco consistente y parcialmente esporulado; con más, no se forma micelio.

En el caso de melazas de caña, sus resultados se expresan en la *figura 13*. Se observa una disminución de cantidad de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico.

En relación con los caracteres morfológicos, a los ocho días de fermentación, hasta 1 por ciento de metanol, el micelio es poco consistente y parcialmente esporulado en pardo oscuro; con 2-3 por ciento de metanol, el micelio es amarillo, liso, tenue, apenas esporulado en pardo; con más metanol no se forma micelio.

Influencia de la morfolina

Para esta experiencia se siguen las técnicas generales antes mencionadas, con medios de melazas de remolacha y caña a los que se adiciona hasta 0,10 por ciento de morfolina.

En ninguno de los dos casos se observa influencia apreciable en los factores pH, cantidad de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico. Esto mismo ocurre en cuanto a los caracteres morfológicos.

Influencia del medio de esporulación en medio de melazas-metanol

Para esta experiencia se siguen las técnicas generales antes señaladas, con medios de melazas de remolacha (con 6 por ciento de metanol) y melazas de caña (con 4 por ciento de metanol). Como inóculos, se emplean suspensiones de esporas en agua destilada estéril, que han esporulado en los medios siguientes: medio sintético de Johnson (Y_a), medio de melazas de remolacha I (Y_b), medio de melazas de remolacha II (Y_c) y medio de melazas de caña (Y_d). Los resultados se expresan en el *cuadro 1*.

Cuadro 1

Inóculo	Melazas de remolacha					Melazas de caña				
	pH	Micelio Gramos	Gramos de azúcar/100 ml de medio	Gramos de ácido cítrico/100 ml de medio	Conversión Porcentaje	pH	Micelio Gramos	Gramos de azúcar/100 ml de medio	Gramos de ácido cítrico/100 ml de medio	Conversión Porcentaje
Y _a	2,0	0,823	2,95	8,132	81,3	1,7	0,665	3,55	3,806	38,0
Y _b	1,9	0,861	2,75	8,379	83,8	1,7	0,688	3,70	3,446	34,5
Y _c	4,5	0,108	8,30	0,625	6,2	1,8	0,679	3,60	3,366	33,6
Y _d	3,0	0,615	5,25	3,680	36,8	1,8	0,709	3,00	3,563	35,6

DISCUSION

Ya dijimos al principio que quien estudió con más intensidad el efecto de los alcoholes sobre la producción de ácido cítrico por fermentación fue Moyer (4). Esto también fue estudiado con más extensión por Malo y Regueiro (2) en medio sintético.

Aquí estudiamos la acción de los alcoholes en medios de melazas de remolacha y caña, tratados o sin tratar por ferrocianuro. Estudiamos la acción sobre pH, cantidad de micelio, consumo de azúcar, producción de ácido cítrico y caracteres morfológicos, todos en fermentación en superficie.

El alcohol que más influencia posee en la producción de ácido cítrico por fermentación de melazas de remolacha y caña, sin tratar y tratadas por ferrocianuro, es el metanol. En todos los casos, al aumentar la cantidad de metanol el crecimiento se hace cada vez más lento, y en todos los casos se inhibe la esporulación. En medios con melazas de remolacha, la cantidad de micelio tiende a disminuir a medida que aumental el metanol; en cambio, en medios con melazas de caña, varía muy poco. En todos los casos, el consumo de azúcar tiende a disminuir con la cantidad de metanol y al tiempo aumenta la producción de ácido cítrico, hasta determinado nivel de metanol.

El etanol, por regla general, influye poco en la producción de ácido cítrico por fermentación de melazas, produciendo solamente aumento del mismo en el caso de las melazas de remolacha. Sin embargo en todos los casos retrasa algo el crecimiento, aunque no impide la esporulación. La presencia de diferentes cantidades de etanol hace variar, en cambio, los caracteres morfológicos del cultivo.

El propanol, por regla general, influye en medios preparados con melazas de remolacha, pero no en los preparados con melazas de caña. En todos los casos, el aumento de propanol en el medio retrasa el crecimiento, pero no impide la esporulación. La presencia de propanol hace sufrir cambios a los caracteres morfológicos, como se describe en la parte correspondiente.

El isopropanol ejerce muy poca influencia en los medios de melazas de remolacha o caña. En todos los casos, el aumento de isopropanol hace retrasar el crecimiento, pero no impide la esporulación.

Hay variaciones en caracteres morfológicos, según la cantidad de alcohol añadido.

El butanol, por regla general, influye en medios preparados con melazas de caña, pero muy poco en los preparados con melazas de remolacha. En todos los casos, al aumentar la cantidad de butanol se retrasa el crecimiento y también se impide la esporulación (a excepción de los medios de melazas sin tratar). Se producen variaciones morfológicas, según la cantidad de alcohol añadida al medio.

Por último, el isobutanol, en todos los casos, tiende a retrasar el crecimiento e impedir la esporulación. Al aumentar la cantidad en los medios, inhibe el desarrollo y, por tanto, la producción de ácido cítrico. Se encuentran variaciones en los caracteres morfológicos, según la cantidad de alcohol añadido.

Podemos esquematizar la producción de ácido cítrico, en cuanto al aumento de la misma por adición de alcoholes (donde no se pone es que la potencia disminuye en relación con el testigo). Se da el *cuadro 2*.

Cuadro 2

Alcoholes		Melazas de remolacha		Melazas de caña	
		Concentración Porcentaje	Conversión Porcentaje	Concentración Porcentaje	Conversión Porcentaje
	Testigo		50,0		25,0
Metanol		6,0	79,6	4,0	40,0
Etanol		4,0	50,4		
Propanol					
Isopropanol					
Butanol		0,4	61,0		
Isobutanol		0,4	54,6		
	Testigo		40,0		30,0
Con ferrocianuro	Metanol	4,0	69,6	5,0	32,6
	Etanol	4,0	54,6		
	Propanol	0,4	57,9		
	Isopropanol	0,6	47,5		
	Butanol				
	Isobutanol				

De estos resultados se deduce que la adición de metanol es conveniente en los medios de melazas de remolacha, tratados o sin tratar.

Concretándonos, pues, a los medios de melazas adicionados de metanol, estudiamos la influencia posible del pH inicial del medio, encontrándose que cuando éste es de 5,5, la producción se eleva a 81,6 por ciento de conversión en ácido cítrico.

Derivado de un trabajo anterior de Puente y Regueiro (4), se prueba la acción de las complexonas en los medios de melazas con metanol. Probamos la complexona IV (ADCT) y vemos que con un 3 por ciento de metanol la producción sube a 80 por ciento de ácido cítrico, en melazas de remolacha; en las de caña disminuye la producción.

Al contrario que Schweiger y Snell (5), no encontramos que la morfolina posea acción sobre la fermentación cítrica de melazas en superficie, en las cantidades por nosotros empleadas.

Cuando el medio de melazas de caña con metanol se inocula con esporas procedentes de medios de esporulación diferentes, no se notan diferencias de producción de cítrico; pero cuando se trata de melazas de remolacha se observan grandes diferencias, por lo cual es necesario probar este factor en las fermentaciones en gran escala.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la influencia de los alcoholes de bajo peso molecular sobre la producción de ácido cítrico por fermentación en superficie de melazas de remolacha y caña, por una raza mutante de *Aspergillus niger*, obtenida por selección natural en nuestro laboratorio.

Se prueban los alcoholes metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol en medios de melazas de remolacha y caña, tratados y sin tratar por ferrocianuro, encontrándose que el metanol es el que mejor efecto produce en todos los casos y en cantidad del 6 por ciento para melazas de remolacha, y del 4 por ciento para las de caña. En los medios tratados por ferrocianuro la cantidad es de 4 y 5 por ciento, respectivamente.

Un pH inicial de 5,5 es el más conveniente (con 6 por ciento de metanol se produce 81,6 por ciento de ácido cítrico). También se encuentra beneficiosa la adición de complexona IV en cantidad del

0,16 por ciento, en melazas de remolacha (con 3 por ciento de metanol se produce 80 por ciento de ácido cítrico).

Encontramos que es importante el estudiar el efecto del medio de esporulación en la producción de ácido cítrico, pues varía, según la composición de las melazas utilizadas en dicho medio.

SUMMARY

In this paper we study the influence of alcohols of a low molecular weight on the production of citric acid by fermentation of molasses by a mutant strain of *Aspergillus niger* obtained by natural selection in our laboratory.

We tried the alcohol: methanol, ethanol, propanol, isopropanol, butanol and isobutanol in mediums with beet and cane molasses, with or without treatment by ferrocyanide. We see that the methanol it is the best in all the mediums and we use a amount of 6 per cent for beet molasses and 4 per cent for cane molasses. In the mediums with ferrocyanide, are 4 and 5 per cent.

A initial pH of 5.5, it is the most convenient (with 6 per cent of methanol, there are 81.6 per cent of conversion). It is also convenient, the addition of complexone IV (0.16 per cent in beet molasses), because with 3 per cent of methanol we obtain 80 per cent of citric acid.

It is very important to study the effect of the sporulation medium in the production of citric acid, because there are variations, depending of the composition of molasses utilised in that medium.

BIBLIOGRAFIA

1. MALO, J. L., y REGUEIRO, B. 1957. Microbiol. Españ., 10, 425.
2. MALO, J. L., y REGUEIRO, B. 1959. Microbiol. Españ., 12, 139.
3. MOYER, A. 1953. J. Appl. Microbiol., 1, 7.
4. PUENTE, A., y REGUEIRO, B. 1961. Microbiol. Españ., 14, 209.
5. SCHWEIGER, L. B., y SNELL, R. L. 1949. U. S. Patent. 2.476.159.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE ACIDO CITRICO POR FERMENTACION

VII. Influencia de algunos factores en medios de fermentación de melazas y tratamiento de éstas en fermentación sumergida

POR
A. PUENTE y B. REGUEIRO

INTRODUCCION

En un trabajo anterior sobre producción de ácido cítrico por fermentación, Malo y Regueiro (2) utilizan el método de fermentación sumergida, introducido por Perquin (3) hacía algunos años. En aquel trabajo se hacía la fermentación con un medio sintético.

En las fermentaciones comerciales se emplean medios más complejos, del tipo de residuos agrícolas o industriales. Para la producción de ácido cítrico se emplean, casi en general, las melazas de azúcar. Puente y Regueiro (4) realizan trabajos con medios de melazas de remolacha y caña, para ver factores favorables para la producción de ácido cítrico por fermentación en superficie.

Los problemas que se presentan en la fermentación en superficie también se presentan en la sumergida, aparte de otros, que afectan a la aireación. Por tanto, es necesario volver a estudiar dichos factores para adaptarlos a la nueva técnica de crecimiento y a las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio.

En el trabajo mencionado anteriormente, Malo y Regueiro (2) hacían una revisión bibliográfica de la fermentación cítrica en sumergido, por lo cual no vamos a repetirla en este lugar.

En el presente trabajo se estudian algunos factores relacionados con la preparación del medio de fermentación, así como la influencia

de los mismos en medios tratados por ferrocianuro. Por último, se estudia la influencia de las complexonas en éstos medios.

MÉTODOS

Las técnicas generales son las descritas por Malo y Regueiro (1) y Puente y Regueiro (4). Se emplea el mutante de la raza de *Aspergillus niger* 72-4 Wiss., obtenido en este laboratorio.

Con relación a la técnica específica de fermentación sumergida, se sigue la técnica de Malo y Regueiro (2), de agitación de vaivén a 28 °C.

Se hacen determinaciones de pH, volumen de micelio (centrifugación), azúcar remanente, acidez titulable, ácido cítrico (colorimetría) y ácido oxálico.

RESULTADOS

A) Factores relacionados con el medio de fermentación

En todas las experiencias realizadas se comparan resultados de medios preparados con melazas de remolacha y con melazas de caña. Los factores estudiados y los resultados obtenidos fueron los siguientes.

a) Concentración óptima de melazas

El primer punto que hay que estudiar en la producción de ácido cítrico por fermentación sumergida de melazas es la concentración óptima de éstas que se debe añadir al medio. Se prepara éste diluyendo las melazas a diferentes concentraciones y se sigue la técnica general de esterilización, inoculación y fermentación.

En el caso de melazas de remolacha se obtiene un óptimo de 28,9 por ciento de ácido cítrico, con un 12 por ciento de azúcar en melazas. En las melazas de caña, con más de un 10 por ciento de azúcar, baja el pH, el consumo de azúcar y el ácido cítrico, aumentando el micelio. Da un óptimo de 7,9 por ciento de ácido cítrico, con 12 por ciento de azúcar en melazas.

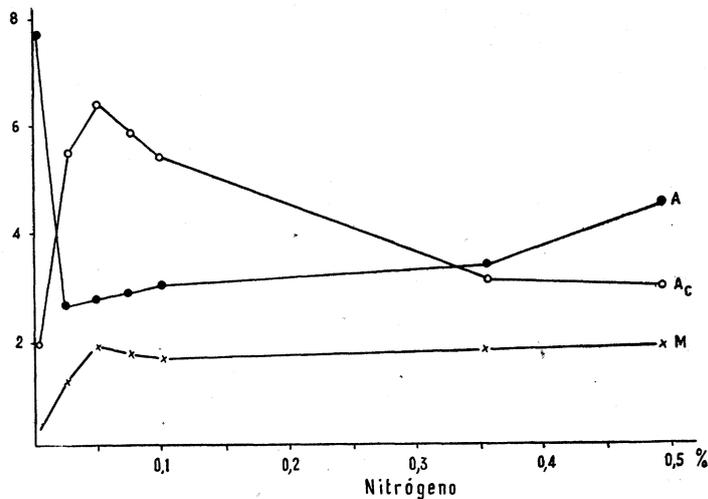
b) Influencia del pH en melazas

Se preparan los medios con un 12 por ciento en melazas y se ponen a un pH inicial entre 3-7. En el caso de emplear melazas de remolacha, el micelio y el consumo de azúcar casi no se afectan, y la producción de ácido cítrico sube ligeramente, a un 20,9 por ciento, a pH 5,5. En el caso de las melazas de caña, se produce un óptimo de 17,8 por ciento de ácido cítrico, a pH 6,0.

En todos los casos, los caracteres morfológicos de los cultivos son los de pellas, grandes en su mayoría, y una pequeña proporción de fibras largas y gruesas.

c) Influencia de la concentración de nitrógeno

Al observar por las experiencias anteriores que el rendimiento en ácido cítrico es más bajo en las melazas de caña que en las de remolacha, se estudia la influencia de la adición de nitrógeno (en forma de nitrato amónico) a las primeras.



A = Azúcar, porcentaje. Ac = Acido cítrico, porcentaje. M = Micelio (volumen), porcentaje

Figura 1

Ac, × (*) 3. M, × 20

(*) En cada caso, la cifra exacta se obtiene multiplicando la de la escala por el número que va detrás de este signo.

Se prepara medio de melazas de caña (12 por ciento de azúcar total) y se añaden diferentes cantidades de nitrato amónico; los resultados se expresan en la *figura 1*. Se observa que la cantidad óptima de adición es de 0,05 por ciento de nitrógeno, en que se produce un máximo de 19,1 por ciento de ácido cítrico. Al mismo tiempo, también se favorece el aumento de micelio y de consumo de azúcar, formación de pellas, sobre todo de tipo pequeño. Cuando baja el nitrógeno, el micelio es más de tipo fibroso.

d) Influencia de la concentración de fósforo

Se hace por las técnicas generales en medios de melazas de remolacha y caña. En el primer caso, la adición de fosfato (0,01-0,03 por ciento) es perjudicial, pues a pesar de dar mayor consumo de azúcar y más cantidad de micelio, la producción de cítrico disminuye.

En el caso de melazas de cada, adicionadas de 0,05 por ciento de nitrógeno y fosfato (0-0,2 por ciento), la presencia de éste no influye en la cantidad de micelio, pero aumenta el consumo de azúcar y hace disminuir la producción de ácido cítrico. El fosfato favorece la formación de fibras en vez de pellas.

En todos los casos tiene poca influencia que el medio de fermentación se prepare con agua corriente o agua destilada.

e) Influencia de la adición de sacarosa

Se preparan medios con diferentes concentraciones de melazas de remolacha y se completan con sacarosa al 12 por ciento de azúcar. Los resultados se expresan en la *figura 2*. Se observa aquí: disminución del pH final, de la cantidad de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, favoreciéndose, en cambio, la formación de pellas pequeñas hasta la adición de 8 por ciento de sacarosa; después, se forman grandes.

En una experiencia complementaria, se mezclan diferentes cantidades de melazas de remolacha y caña hasta un total de 12 por ciento de azúcar. Los resultados se expresan en la *figura 3*. No se observa acción en el pH final; el consumo de azúcar y la producción de ácido cítrico bajan progresivamente al aumentar la cantidad de melazas de caña; la máxima cantidad de micelio se produce en la mezcla de melazas de 2-10, pasando de fibroso a pellas grandes.

En un estudio de los factores de temperatura y tiempo de esteri-

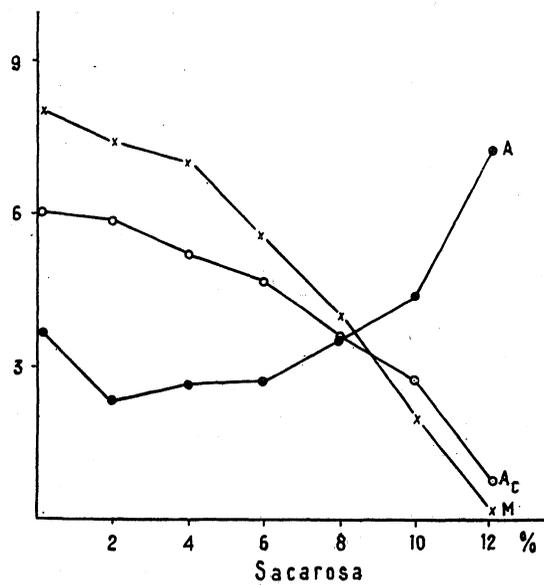


Figura 2
A₀, × 5. M, × 5

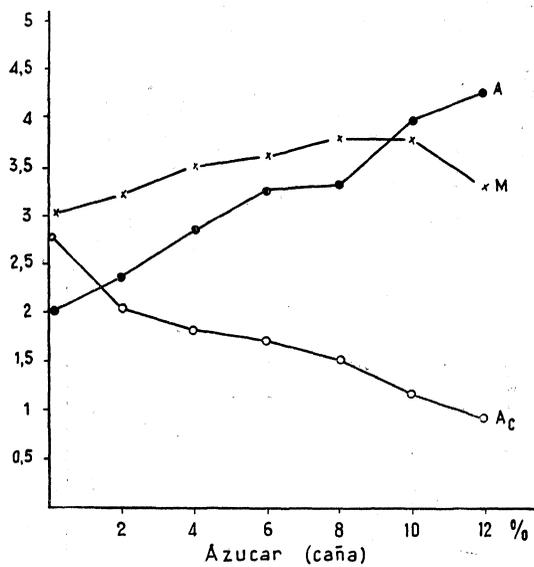


Figura 3
A₀, × 10. M, × 10

Cuadro 1

Núm.	Cenizas Porcentaje	Melazas de remolacha				Melazas de caña					
		pH	Micelio (volumen) Porcentaje	Gramos de azúcar/100 ml de medio	Gramos de ácido cítri- co/100 ml de medio	Conver- sión Porcentaje	pH	Micelio (volumen) Porcentaje	Gramos de azúcar/100 ml de medio	Gramos de ácido cítri- co/100 ml de medio	Conver- sión Porcentaje
1	Testigo, sin cenizas	3,0	28	2,05	3,408	28,3	3,0	30	2,55	1,744	14,5
2	Solubles, 0,157	3,1	30	1,90	3,171	26,4	3,2	30	2,80	1,664	13,9
3	Solubles, 0,314	3,1	32	1,90	3,091	25,7	3,1	34	2,10	1,505	12,5
4	Totales, 0,160	3,1	36	2,40	3,011	25,0	3,1	36	2,00	1,267	10,5
5	Totales, 0,320	3,2	39	2,45	2,616	21,7	3,3	36	2,90	1,030	8,5
6	Solubles, 0,149	3,1	28	2,05	3,171	26,4	3,0	32	2,30	1,585	13,2
7	Solubles, 0,298	3,4	28	2,30	1,822	15,1	3,2	34	2,50	1,267	10,5
8	Totales, 0,160	3,8	28	2,55	1,108	9,2	3,7	30	3,20	0,663	5,5
9	Totales, 0,320	4,5	28	2,80	0,395	3,3	4,6	24	2,90	0,165	1,3

Remolacha

Caña

lización se demuestra como más conveniente para los medios de fermentación sumergida, la temperatura de vapor fluente durante cuarenta y cinco minutos.

f) Influencia de las cenizas de melazas

Las cenizas de melazas se obtienen por incineración a 1.000 °C, dividiéndose en totales (solubles en agua regia) y solubles (en ácido clorhídrico). Se realizan los métodos generales de fermentación sumergida y únicamente añadiendo a los medios las cantidades de cenizas que se indican en el *cuadro 1*.

En todos los casos se observa que la adición de cenizas produce una disminución rápida en la producción de ácido cítrico, sobre todo en el caso de cenizas de melazas de caña.

En el caso de melazas de remolacha, el micelio es de tipo fibroso, mientras que en el de melazas de caña es del tipo de pellas.

B) Tratamiento de melazas por ferrocianuro

Se estudian varios factores en relación con la adición de ferrocianuro a los medios con melazas de remolacha y caña. Los resultados obtenidos en cada caso se dan a continuación.

a) Adición antes de la esterilización del medio

Se preparan los medios con melazas de remolacha y caña, al 12 por ciento de azúcar. Se añaden diferentes cantidades de ferrocianuro potásico y se esteriliza a vapor fluente durante cuarenta y cinco minutos. Los resultados se dan en las *figuras 4-5*.

En los medios de melazas de remolacha se observa que disminuye la cantidad de micelio y el consumo de azúcar en proporción a la cantidad de ferrocianuro; en cuanto a la producción de ácido cítrico, hay un óptimo de 44,9 por ciento con un 0,08 por ciento de ferrocianuro.

En los medios de melazas de caña no se observa mucha variación en cuanto al pH final, cantidad de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, hasta la adición de 0,06 por ciento de ferrocianuro. A partir de aquí disminuye el consumo de azúcar y se produce más ácido cítrico, llegando a 20,8 por ciento con 0,07 por ciento de ferrocianuro. La concentración elevada de ferrocianuro favorece la formación de micelio en fibras.

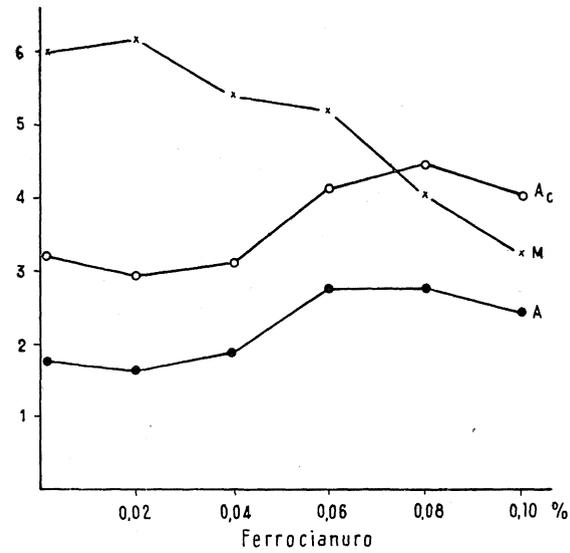


Figura 4

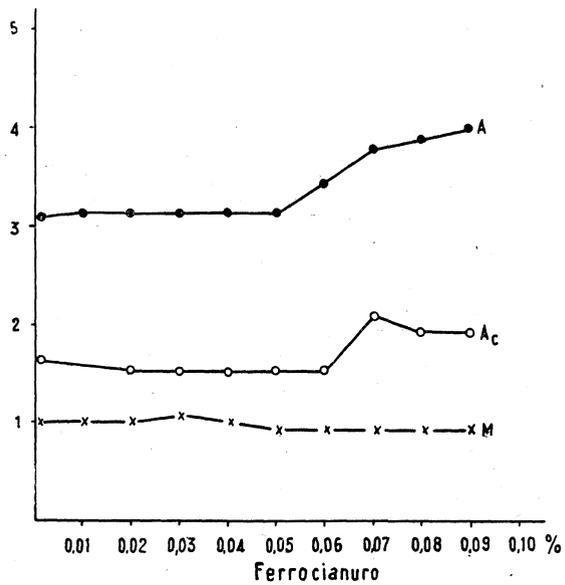
 $A_e, \times 10. M, \times 5$ 

Figura 5

 $A_e, \times 10. M, \times 30$

El micelio en medio de melazas de remolacha es fibroso (fibras cortas y finas) hasta un 0,02 por ciento de ferrocianuro; después se forman pellas grandes, las cuales se forman también en medio de melazas de caña; aquí, al aumentar el ferrocianuro, se forman fibras cortas y finas.

b) Adición después de la esterilización del medio

Se hace como en la experiencia anterior, únicamente que el ferrocianuro se añade después de esterilizar el medio a vapor fluente durante cuarenta y cinco minutos. Si la edición se realiza una vez completamente frío el medio, se observa una disminución progresiva del pH y del volumen del micelio al aumentar el ferrocianuro; pero el consumo de azúcar y la producción de ácido cítrico casi no varían. El micelio es del tipo de pellas pequeñas y escasas fibras.

Cuando el ferrocianuro se añade estando el medio aún caliente (remolacha y caña), en general, se observa poca influencia en la marcha de la fermentación. Únicamente, en cuanto al volumen de micelio, el aumento de ferrocianuro produce disminución, sobre todo en los medios de melazas de remolacha.

El tratamiento favorece la formación de pellas pequeñas al aumentar la cantidad de ferrocianuro.

c) Influencia del tiempo y temperatura de esterilización

Se hace, como en técnicas anteriores, en medio de melazas de remolacha, adicionando ferrocianuro entre 20°-100 °C. Se observa que estas temperaturas no afectan al pH final; micelio y consumo de azúcar bajan lentamente al subir la temperatura; en cuanto a la producción de ácido cítrico, el óptimo se produce cuando el ferrocianuro (0,03 por ciento) se adiciona a 100 °C. En todos los casos, las pellas son pequeñas y hay escasas fibras.

Se estudia la influencia de la esterilización en medios de melazas de remolacha adicionados con 0,03 por ciento de ferrocianuro; se esteriliza según los tiempos y temperaturas indicados en la *figura 6*. La máxima producción se consigue a 100 °C durante cuarenta y cinco minutos, pues en general la esterilización con presión no es conveniente. El micelio es en forma de pellas grandes, excepto en el testigo sin esterilizar, que es fibroso.

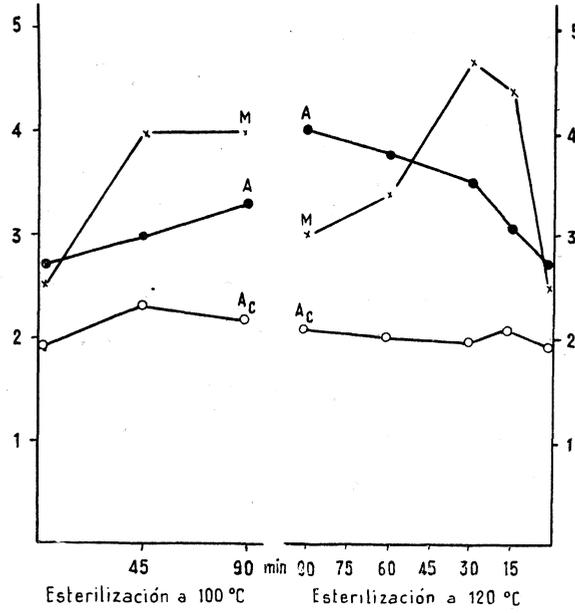


Figura 6
 $A_o, \times 10. M, \times 10$

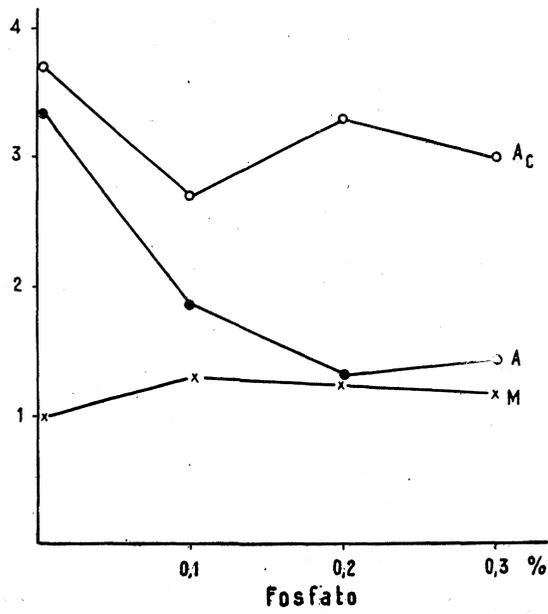


Figura 7
 $A_o, \times 5. M, \times 30$

d) Influencia del fosfato en medios tratados

Se preparan experiencias como en casos anteriores, en medios de melazas de remolacha y caña y con adición en caliente de 0,03 por ciento de ferrocianuro. En el caso de medios con melazas de remolacha, la adición de fosfato (0,01-0,03 por ciento), origina pocas variaciones y tendencia a disminuir la producción de ácido cítrico. Se forman pellas de tipo pequeño.

En el caso de medios con melazas de caña, sus resultados se dan en la *figura 7*. Se observa ligero aumento del micelio, disminución del consumo de azúcar y producción de ácido cítrico; el fosfato favorece la formación de fibras.

e) Influencia del hierro en medios tratados

Se preparan experiencias como en el caso anterior, con medios de melazas de remolacha y caña, tratadas por 0,08 y 0,07 por ciento, respectivamente, de ferrocianuro. Se añaden diferentes cantidades de hierro (hasta 10 mg/100 ml de medio) y se observa que hay un ligero aumento del volumen del micelio, consumo de azúcar y disminución de ácido cítrico.

En cuanto a los caracteres morfológicos, el hierro en medios de melazas de remolacha aumenta el tamaño de las pellas, mientras que en los de melazas de caña produce fibras largas y gruesas.

f) Influencia del tratamiento después de la inoculación

Se prepara medio de melaza de remolacha como en casos anteriores; se esteriliza e inocula con 2 ml de suspensión de esporas. A continuación y en tiempos diferentes, se añade un 0,03 por ciento de ferrocianuro y se estudian los resultados que se expresan en la *figura 8*.

Se observa que, en general, la adición de ferrocianuro después de la inoculación no es conveniente. El micelio está formado por pellas grandes, salvo el testigo sin ferrocianuro, que presenta micelio fibroso.

g) Influencia del número de esporas inoculadas

Se prepara medio de melaza de remolacha como en casos anteriores. Se adiciona 0,03 por ciento de ferrocianuro y se inocula con suspensión de esporas, conteniendo de 200-2.000.000/ml, observándose que con menos de 2.000 esporas/ml disminuye rápidamente la pro-

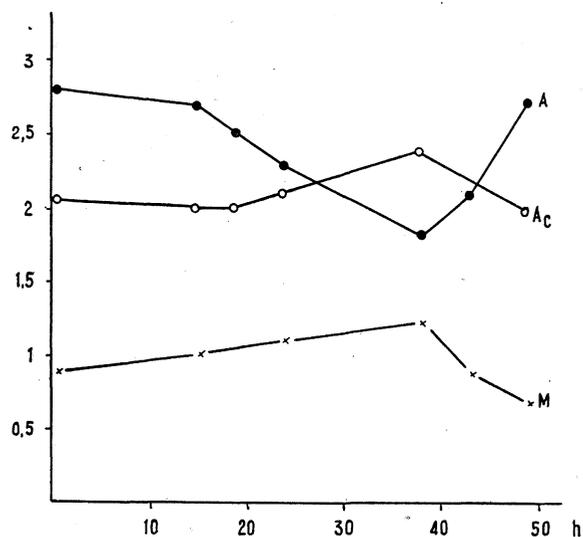


Figura 8

A, $\times 10$. M, $\times 30$

ducción de ácido cítrico y baja la cantidad de micelio, que en todos los casos es del tipo de pellas pequeñas.

h) *Influencia de inóculo vegetativo o inóculo de esporas*

Se preparan medios de melazas de remolacha y caña, tratados por 0,08 y 0,07 por ciento de ferrocianuro, respectivamente. Los inóculos son de los tipos siguientes: Y_a , 500.000 esporas/ml; Y_b , 5 por ciento de inóculo vegetativo de veinticuatro horas; Y_c , 5 por ciento de inóculo vegetativo de cuarenta horas. Los resultados se dan en el cuadro 2.

Se observa que los resultados o diferencias por inóculo, a los diez días de fermentación, apenas son ligeros; aunque en el caso de las melazas de remolacha hay un ligero aumento de producción de ácido cítrico, utilizando inóculo vegetativo de cuarenta horas.

En las melazas de remolacha el micelio es de pellas pequeñas, y en las de caña es fibroso, con fibras cortas y finas, escasas pellas grandes.

Cuadro 2

Inóculo	Melazas de remolacha					Melazas de caña				
	pH	Micelio (volumen) Porcentaje	Gramos de azúcar/100 ml de medio	Gramos de ácido cítrico/100 ml de medio	Conversión Porcentaje en gramos	pH	Micelio (volumen) Porcentaje	Gramos de azúcar/100 ml de medio	Gramos de ácido cítrico/100 ml de medio	Conversión Porcentaje en gramos
Y _a	3,1	28	2,65	4,438	36,9	3,1	34	2,55	2,457	20,4
Y _b	3,1	26	2,80	4,360	36,3	3,0	32	2,90	2,377	19,8
Y _c	3,0	28	2,80	4,756	39,6	3,0	40	2,95	2,297	19,1

C) Tratamiento de melazas con complexonas

Sabiendo que las complexonas complejan metales y evitan su acción, es natural que probáramos también su actividad en la producción de ácido cítrico por fermentación de melazas en sumergido. Estudiamos la acción de las complexonas IV (ADCT) y V (AEGT).

a) Tratamiento con complexona IV

Se emplean las técnicas generales de las experiencias anteriores. Para complejar la totalidad de los metales pesados, se tratan 100 ml de medio con 0,76285 g de complexona, las melazas de remolacha, y con 1,43988 g, las melazas de caña. Los resultados en ambos casos se expresan en las *figuras 9-10*.

En el caso de melazas de remolacha se ve que al aumentar la cantidad de complexona bajan el volumen de micelio y el consumo de azúcar y aumenta la producción de ácido cítrico a un 34,6 por ciento con 0,25 por ciento de complexona, para luego bajar rápidamente.

En el caso de melazas de caña bajan rápidamente el volumen de micelio y el consumo de azúcar, subiendo al mismo tiempo la producción de ácido cítrico a un 30,9 por ciento con un 0,96 por ciento de complexona.

Los micelios de todos los matraces son de pellas grandes y escasas fibras de tipo largo y fino y otras cortas y gruesas.

b) Tratamiento con complexona V

Se emplean las técnicas generales de experiencias anteriores. Para complejar la totalidad de los metales pesados se tratan 100 ml de medio con 0,83358 g de complexona, las melazas de remolacha, y con 1,51741 g, las de caña.

En el caso de las melazas de remolacha, el micelio tiende a bajar ligeramente, varía poco el consumo de azúcar y la producción de ácido cítrico, dando un 32,6 por ciento por adición de 0,21 por ciento de complexona.

En el caso de las melazas de caña no se encuentran variaciones apreciables en el volumen del micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, que da un óptimo de 24,3 por ciento con 0,30 por ciento de complexona.

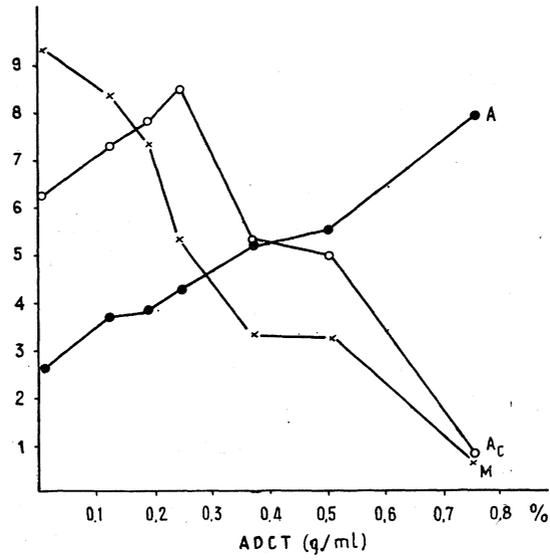


Figura 9

Ac, $\times 4$. M, $\times 3$

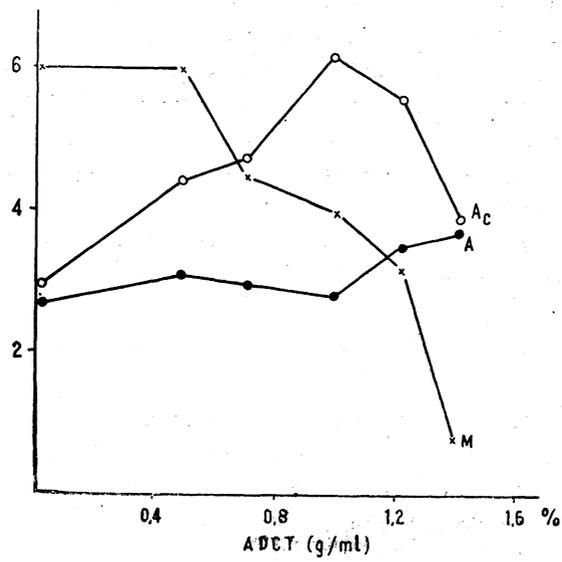


Figura 10

Ac, $\times 5$. M, $\times 5$

Los micelios que son fibrosos, en ausencia de complexona, se hacen en pellas pequeñas, con una pequeña proporción de fibras.

DISCUSION

Trabajos anteriores se concretaban al estudio de la fermentación cítrica de melazas de remolacha y caña en superficie; los factores que se estudiaban para lograr un máximo de producción y un mayor conocimiento de la fermentación, varían en cuanto se cambia la técnica de fermentación. Por esta razón estudiamos en el presente trabajo factores ya conocidos, pero desde otro punto de vista; así podremos establecer relaciones y diferencias.

En primer lugar, se estudian algunos factores relacionados con el medio de fermentación. Estudiamos la cantidad óptima de melazas que se debe añadir al medio de fermentación y encontramos que una cantidad de 12 por ciento de azúcar da los mejores resultados. Como se observa, la cantidad es algo superior a la de la fermentación superficial, y esto se debe seguramente a un mayor consumo de azúcar por influencia de la aireación. Así, bajo la influencia de este solo factor, el rendimiento en ácido cítrico es en las melazas de remolacha de 18,7 por ciento, y en las melazas de caña, de 3,2 por ciento.

Después de esto, un factor interesante es el del pH inicial del medio: en sumergido y con melazas de remolacha, el óptimo de producción se logra a pH 5,5, mientras que en las de caña es de pH 6,0, observándose un nivel más cercano que en el caso de la fermentación en superficie.

Vemos en los casos anteriores que hay diferencia entre la producción en melazas de remolacha y melazas de caña; pensando que esto podría ser por las diferencias en contenido de nitrógeno, añadimos diferentes cantidades a un medio de melazas de caña, lográndose una producción parecida a la de melazas de remolacha, con un 0,05 por ciento de nitrógeno (en forma de nitrato amónico).

Por el contrario, la adición de fosfato es perjudicial a la fermentación sumergida de melazas, tanto de remolacha como de caña.

Para estudiar la acción específica del azúcar de melazas se sustituye parte de éste por sacarosa, observándose una disminución pro-

gresiva de ácido cítrico a medida que aumenta la sustitución. Lo mismo ocurre si tal sustitución se realiza con melazas de caña.

A pesar de todos los factores estudiados, vemos que todavía hay diferencias entre los rendimientos obtenidos con melazas de remolacha o de caña. Como hemos visto en anteriores trabajos, esto puede ser debido al contenido en cenizas (cualitativo o cuantitativo) de las respectivas melazas. Estudiando este factor, vemos una reducción del rendimiento, tanto con cenizas totales como con cenizas solubles y tanto de remolacha como de caña.

Es por estas últimas razones, sobre todo, por las que a continuación tratamos de estudiar el efecto de inhibidores de estas cenizas, por tratamiento de melazas con ferrocianuro o complexonas.

Tratamiento de melazas por ferrocianuro. Como vimos en otro lugar, este es el método más empleado en escala industrial y por el que se logra aumentar de modo notable la producción de ácido cítrico por fermentación de melazas.

Estudiando el efecto de los diferentes métodos de adición de ferrocianuro no se encuentran grandes diferencias entre hacerlo antes o después de esterilizar. El nivel máximo de producción, de un 44,9 por ciento de ácido cítrico, se logra por adición de 0,08 por ciento de ferrocianuro a melazas de remolacha, y de un 20,8 por ciento de ácido cítrico por adición de 0,07 por ciento de ferrocianuro a melazas de caña.

En los casos de fermentaciones tratadas por ferrocianuro es perjudicial también la adición de fosfato o de hierro. Otro dato que se debe tener en cuenta es que la adición de ferrocianuro no es conveniente después de la inoculación.

Un factor muy interesante en la fermentación por sumergido es el del inóculo. Si éste se hace directamente con esporas, encontramos que no es conveniente añadir menos de 2.000 esporas/ml de medio; también vemos que es mejor inocular con inóculo vegetativo de cuarenta horas de edad.

Tratamiento de melazas por complexonas. Probamos el efecto de las complexonas en fermentación sumergida de melazas. Encontramos que la adición de un 0,25 por ciento de ADCT produce un rendimiento de 34,6 por ciento de ácido cítrico en el caso de medio con melazas

de remolacha, y con 0,96 por ciento de ADCT da un 30,9 por ciento en el caso de medio con melazas de caña.

Cuando se emplea la complexona V (AEGT) en medio de melazas de remolacha, con un 0,21 por ciento de complexona da un 32,6 por ciento de ácido cítrico; con 0,30 por ciento en medio de melazas de caña, se obtiene 24,3 por ciento de ácido cítrico.

RESUMEN

En esta serie de trabajos, sobre producción de ácido cítrico por fermentación de melazas, estudiamos aquí los factores relacionados con la fermentación sumergida. Vemos que la cantidad óptima de melazas es de 12 por ciento de azúcar, debiendo añadirse un 0,05 por ciento de nitrógeno y un pH inicial de 5,5-6,0. El aumento de cenizas es causa de baja de rendimientos en la producción.

La producción de ácido cítrico por fermentación de melazas en sumergido se mejora tratando éstas por ferrocianuro. Se hace por adición de 0,08 por ciento a melazas de remolacha, y de 0,07 por ciento a melazas de caña, después de esterilizar a vapor fluente durante cuarenta minutos. Se encuentra conveniente añadir más de 2.000 esporas/ml de medio.

También probamos mejorar el rendimiento por adición de complexonas, encontrándose favorable la adición de 0,25 por ciento de ADCT y AEGT en melazas de remolacha, y de 0,96 por ciento de ADCT y 0,30 por ciento de AEGT en las melazas de caña.

SUMMARY

The authors study the production of citric acid by fermentation of molasses, by submerged technique and with a mutant of *Aspergillus niger* 72-4 Wiss.

We study several factors to increase the production of citric acid and also factors in relation with the treatment of molasses with ferrocyanide and complexones.

BIBLIOGRAFIA

1. MALO, J. L., y REGUEIRO, B. 1957. *Microbiol. Españ.*, 10, 425.
2. MALO, J. L., y REGUEIRO, B. 1959. *Microbiol. Españ.*, 12, 243.
3. PERQUIN, L. H. C. Tesis.
4. PUENTE, A., y REGUEIRO, B. 1961. *Microbiol. Españ.*, 14, 209.
5. PUENTE, A., y REGUEIRO, B. 1962. *Microbiol. Españ.*, 15, 35.

DEPÓSITO LEGAL: M. 702.-1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15 - Madrid