

**BOLETIN**  
**del**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS**

**DEPARTAMENTO DE GANADERIA**  
**DIRECCION GENERAL DE AGRICULTURA**  
**MINISTERIO DE AGRICULTURA**  
**CASILLA 4527 — CORREO 2 — SANTIAGO, CHILE**

Vol. I

Octubre de 1952

Fascículo 8.

**DETERMINACION MICROBIOLÓGICA DE HISTIDINA, METIONINA,  
FENILALANINA Y LISINA EN ALFALFA Y HENO DE ALFALFA (\*)**

Irma Pennacchiotti M. y Marta Vargas U.

Carlos Flores del F. \*\*

Químicas Farmacéuticas de la Sección Químico Veterinario de la Sección Micología y Zimología.

Química y Forrajes.

Marco Ferreta P.

Químico Farmacéutico

La intención del presente trabajo, ha sido la valoración microbiológica de los aminoácidos esenciales contenidos en la proteína de la alfalfa común (*Medicago sativa*): histidina, metionina, fenilalanina y lisina, los cuales constituyen un grupo unitario desde el punto de vista de la metódica de su determinación.

**MATERIAL Y METODO**

A.—Material: Se analizaron 49 muestras, correspondiendo 13 a alfalfa fresca y el resto a heno de alfalfa. Su recolección se efectuó por el método "al azar".

La cepa usada en las determinaciones fué el *Leuconoctoc mesenteroides* P 60, cultivo N° 8042 procedente de la "American Type Culture Collection" (EE. UU.).

Antes de iniciar los trabajos se efectuó una comprobación de pureza de la cepa mediante exámenes microscópicos y estudio de sus caracteres culturales y fermentativos. (2).

Como medio de conservación de la cepa se usó el Agar Jugo de Tomate "Difco" (3), en el cual se sembraba por picadura y traspasaba cada 15 días. Con el mismo objeto se empleó el medio glucosado con extracto de levadura indicado por Barton (1).

B.—Método.— 1. Preparación del medio basal: Para la preparación del

(\*) Tesis de prueba del Sr. M. Ferreta P., para optar al título de Químico Farmacéutico de la Universidad de Chile.

\*\* Los AA agradecen al Prof. Dr. Hermann Schmidt Hebbel de la Cátedra de Bromatología y Toxicología de la Fac. de Química y Farmacia de la U. de Chile, por la colaboración prestada durante el desarrollo de este trabajo, como asimismo a las personas que directa o indirectamente contribuyeron a su realización.

medio basal se pesaron exactamente diferentes cantidades de aminoácidos, vitaminas y sales minerales de acuerdo con las indicaciones de Barton Wright. (1).

Después de la adición de todos los componentes de este medio sintético se ajusta el pH a 6.8 con hidróxido de sodio y se lleva a volumen. Se distribuye 5 cc de este medio en tubos de ensayo escrupulosamente limpios, se taponan con algodón no hidrófilo, se esteriliza a 115° C (10 libras de presión) y se conserva en cámara frigorífica hasta su utilización.

2.—Preparación de la solución standard de metionina. Se prepara una solución de d-l-metionina al 0.1% la cual se diluye de modo que cada cc contenga 10 gamas del aminoácido.

3.—Curva standard. Para la obtención de la curva standard de metionina se prepara una serie de tubos con cantidades crecientes del aminoácido: 0-5-10-20-25 y 30 gamas, para lo cual se prepara la escala que a continuación se indica:

Tubo N°	Medio basal	Sol. standard de metionina	Agua	Gamas de metionina
1	5 cc	0.0 cc	5 cc	0
2	5 cc	0.5 cc	4.5 cc	5
3	5 cc	1.0 cc	4.0 cc	10
4	5 cc	1.5 cc	3.5 cc	15
5	5 cc2	2.0 cc	3.0 cc	20
6	5 cc	2.5 cc	2.5 cc	25
7	5 cc	3.0 cc	2.0 cc	30

El volumen final de cada tubo será de 10 cc. Se esteriliza a 115° C por 10 minutos. Las series de tubos se preparan por triplicado o cuadruplicado a objeto de evitar errores y obtener así resultados más precisos.

Para la preparación de las curvas standards de Histidina, Lisina y Fenilalanina se procede en la misma forma y sus rangos deben estar comprendidos entre 5-25 gamas, 20-200 gamas y 10-50 gamas, respectivamente.

4.—Preparación del Inoculum. Un asa del cultivo de 24-48 horas de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* P 60 se siembra en un tubo que contiene 5 cc de medio basal para determinar riboflavina al cual se ha adicionado riboflavina (1) y 5 cc de agua destilada estéril. Se incuba por 18 a 20 horas a 37° C. Después se centrifuga asepticamente y el líquido sobrenadante se elimina y se vuelve a centrifugar con 10 cc de suero fisiológico. Nuevamente el sobrenadante se elimina y el depósito se suspende en 30 cc de suero fisiológico estéril y esto constituye el inoculum.

Siembra.— Una gota de esta suspensión se agrega a cada uno de los tubos de la escala con una pipeta estéril y se incuba por espacio de 70 a 72 hrs. a 37° C. A continuación se enfrían y se procede a efectuar las lecturas al potenciómetro.

Tanto la cantidad del aminoácido empleado, como los pH resultantes se inscriben en un sistema de coordenadas para obtener así la curva standard donde se efectuarán las lecturas de los pH problemas.

5.—Preparación de las muestras. De la muestra de alfalfa secada a la estufa a 105° C, molida y homogenizada en un Waring Blendor, se pesa 1 g. y se suspende en 25 cc de HCl 2.5 N y luego se hidroliza durante 6 horas a 121° C (15 libras de presión). Se enfría y se agrega 2 cc de solución de acetato de sodio 2.5 N, ajustando luego el pH a 4.5 con solución de hidróxido de sodio concentrado; se filtra, se lava el filtro y se reajusta el pH a 6.8, óptimo para el desarrollo del germen.

Se enrasa a un volumen de modo que 1 cc del hidrolizado corresponda a 2 mg de alfalfa (500 cc). El hidrolizado se mantiene en el refrigerador hasta el momento de su utilización.

Para proceder a efectuar la determinación del aminoácido en estudio, se toma un grupo de tres tubos por muestra que contienen el medio basal sin el aminoácido a valorar, a cada uno de los cuales se le agrega 1 cc del hidrolizado (2 mg). Finalmente se enrasa a 10 cc con agua destilada, tal como en el caso de la curva standard. Los tubos se autoclavan a 115° C durante 10' y se guardan en refrigerador hasta el día siguiente para la inoculación, procediéndose en la forma señalada para la curva standard.

## RESULTADOS

Se trabajó con 36 muestras de heno de alfalfa y 13 muestras de alfalfa verde. El cuadro N° 1 indica porcentaje de humedad, proteína expresada en (N x 6.25), y los aminoácidos con sus rangos y desviaciones standard en alfalfa y heno de alfalfa.

La humedad se determinó por desecación a 105° C durante 3 horas y la proteína por el método de Kjeldahl, utilizando como catalizador selenio en polvo.

Para hacer los cálculos de la desviación standard se empleó la fórmula siguiente:

$$E = \sqrt{\frac{Ed^2}{(n-1)}}$$

donde  $Ed^2$  significa: la suma de los cuadrados de las diferencias de cada resultado con el promedio aritmético, y  $n$  = número de resultados parciales.

**Lectura de la curva standard.**— La determinación de la acidez en cada uno de los tubos se hizo potenciométricamente.

Como se ha dicho anteriormente, en cada muestra se practican 3 determinaciones; ahora bien, si ellas no difieren entre sí en más de un 10% se calcula el promedio aritmético y el resultado se interpola en la curva standard respectiva. En esta forma se obtienen las gamas del aminoácido contenido en 2 mg de alfalfa seca; basándose en este resultado se hace el cálculo en g %.

CUADRO N° 1

### RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE HUMEDAD, PROTEINA Y AMINOACIDOS EN HENO DE ALFALFA Y ALFALFA VERDE

#### a) Heno de Alfalfa

Dato	N° de muestras	Promedio aritmético	Rango (Min -Máx.)	Desviación standard
Humedad g/100 g	36	13.55	10.74 — 17.21	± 0.284
Proteína s. f.* (Nx6.25) g/100 g	36	19.69	17.15 — 22.94	± 0.278
Histidina g/100 g	36	0.46	0.11 — 0.81	± 0.050
Metionina g/100 g	36	0.28	0.053 — 0.52	± 0.0305
Fenilalanina g/100 g	36	0.66	0.22 — 1.10	± 0.042
Lisina g/100 g	36	1.60	0.74 — 2.73	± 0.079

(\*) Sustancia fresca.

## b).—Alfalfa verde

Dato	Nº de muestras	Promedio aritmético	Rango (Min.-Máx.)	Desviación standard
Humedad g/100 g	13	80.48	73.88 — 83.60	± 0.802
Proteína s. f. (Nx6.25) g/100 g	13	3.049	4.004 — 7.834	± 0.177
Histidina g/100 g	13	0.100	0.056 — 0.158	± 0.009
Metionina g/100 g	13	0.061	0.028 — 0.106	± 0.007
Fenilalanina g/100 g	13	0.18	0.066 — 0.278	± 0.016
Lisina g/100 g	13	0.54	0.221 — 1.240	± 0.085

## CUADRO Nº 2

## COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS Y LOS DADOS POR MORRISON

Aminoácidos	Morrison*	Instituto de Investigaciones Veterinarias	
	g/100 g s. f.**	Heno	Alfalfa verde
Histidina . . . . .	0.30	0.45	0.104
Metionina . . . . .	0.46	0.26	0.060
Fenilalanina . . . . .	0.96	0.66	0.180
Lisina . . . . .	—	1.60	0.540

(\*) Los valores dados por Morrison se expresan sobre harina de hojas de alfalfa.

(\*\*) Sustancia fresca.

## DISCUSION

a) Para la valoración de estos aminoácidos se eligió el método microbiológico, por estimarse de mayor rapidez y sensibilidad que los métodos químicos.

b) En lo que dice relación con el medio basal, la experiencia indicó que siempre que se prepara un nuevo stock, se debe confeccionar su correspondiente curva standard, porque es imposible reproducir exactamente todas las condiciones de preparación del medio (pesada, control de temperaturas, tiempo, etc.), en cada ocasión.

c) Un tiempo superior a 6 horas en la hidrólisis de la muestra, no es perjudicial, pero un tiempo inferior a 5 horas produce hidrólisis incompleta.

d) En general la literatura indica valorar la acidez láctica final con

hidróxido de sodio 0.1 N, en presencia de azul de bromotímol o bien empleando el comparador de Walpole. Sin embargo, en el presente trabajo se reemplazó el método titimétrico por el potenciométrico, por estimarse, después de una serie de experimentos que este último es más rápido y exacto.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1).—Se efectuó la valoración de cuatro de los aminoácidos esenciales contenidos en la proteína de la alfalfa común (*Medicago sativa*).
- 2).—Los resultados obtenidos son los siguientes:

### I HENO

a) Histidina	0.45 g %	± 0.051
b) Metionina	0.26 "	± 0.030
c) Fenilalanina	0.66 "	± 0.042
d) Lisina	1.60 "	± 0.078

### II ALFALFA VERDE

a) Histidina	0.11 g %	± 0.009
b) Metionina	0.05 "	± 0.007
c) Fenilalanina	0.18 "	± 0.016
d) Lisina	0.54 "	± 0.095

3).—El método potenciométrico aventaja por su rapidez y exactitud al titimétrico.

4).—De la comparación de los resultados obtenidos en el Instituto de investigaciones Veterinarias y los dados por Morrison, se deduce: que el contenido de aminoácidos de la alfalfa chilena es aparentemente inferior al de la alfalfa norteamericana. Esta diferencia de resultados se explicaría porque Morrison indica valores que tienen por base harina de hojas de alfalfa, en tanto que en el presente trabajo se analizó la alfalfa completa.

## S U M M A R Y

Alfalfa and alfalfa hay were tested for their content of four essential aminoacids: histidine, methionine, phenylalanine and lysine by means of a microbiological method. The microorganism used was *Leuconostoc mesenteroides* P 60 from The American Type Culture Collection (USA).

The pHmeter has been used instead of titrating with NaOH and that method has proved to be better because of its accuracy and speed.

The results obtained were compared with those given by Morrison and they are given in Table 2.

## R E S U M E

Les auteurs ont dosé quatre acides aminés essentiels histidine, méthionine, phényl-alanine et lysine par la méthode microbiologique en luzerne et foin de luzerne.

Le microorganisme employé fut le *Leuconostoc mesenteroides* P. 60 provenant de l' American Type Culture Collection U.S.A.

La méthode potentiométrique fut usée au lieu de la titration avec NaOH, parce qu' on a démontré qu'elle est plus rapide et plus exacte.

Les valeurs obtenues furent comparées avec les données par Morrison et indiquées dans le tableau N° 2.

## R I A S S U N T O

Gli A. A. hanno dosato per mezzo del metodo microbiologico, 4 degli aminoacidi essenziali contenuti negli idrolisati proteici dell'Erba medica e del Fieno, e sono: l'istidina, lisina, fenilalanina e metionina.

Il microorganismo adoperato fu il "*Leuconostoc mesenteroides* P 60", procedente dell'American Type Culture Collection (USA).

Si è usato il metodo potenziometrico invece di quello per titolazione con l'idrossido di sodio e si è dimostrato che, il metodo è rapido ed esatto e i valori ottenuti sono abbastanza soddisfacenti.

Questi valori vengono confrontati con quelli ottenuti da Morrison e s'indicano nella Tabella N° 2.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser stellten Quantitativ vier grundlegende Aminosäuren fest: Histidin, Methionin, Phenylalanin und Lysin und zwar mittels der mikrobiologischen Methode in Luzerne und in Luzerneenhen. Der Mikroorganismus, der hierfür benutzt wurde, war der *Leuconostoc mesenteroides* P 80 aus der American Type Culture Collection. (USA).

Man benutzte den pH-Messer statt der Titration mit NaOH, wegen seiner Genauigkeit und Schnelligkeit.

Die erhaltenen Werte wurden mit denen von Morrison verglichen und sind auf Tabelle 2 verzeichnet.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—**BARTON-WRIGHT E. C.** Practical Methods for the Microbiological Assays of the Vitamin C Complex and Essential Amino Acids. Ashe Lab. Ltd. London, 1945.
- 2.—**BERGEY'S MANUAL** of Determinative Bacteriology 6 th. Ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1948.
- 3.—**DIFCO MANUAL** of Dehydrated Culture Medio and Reagents of Microbiological and Chemical Laboratories Proc. 56-8th Ed. Difco Lab. Michigan, 1948.
- 4.—**MORRISON F. B.** Feeds and Feeding; 1190, 21st Ed. The Morrison Publ. Co. 1949.