

Nº 125
261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS EN UNA
LEVADURA AISLADA DEL AGUAMIEL (Torulopsis
hydromelitis) SUJETA A DIFERENTES
TRATAMIENTOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARITZA QUINTANILLA BRAVO



MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	1
CAPITULO 1. ANTECEDENTES.....	4
1.1 LAS LEVADURAS.....	5
1.2 PROTEINA UNICELULAR.....	7
1.3 ACIDOS NUCLEICOS.....	11
1.4 ESTUDIOS SOBRE LA ALIMENTACION CON LEVADURAS.....	19
1.5 METODOS EMPLEADOS PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE ACIDOS NUCLEICOS.....	24
1.6 ALGUNOS ASPECTOS ACERCA DEL AGUAMIEL Y EL PULQUE.....	30
1.7 GENERALIDADES SOBRE <i>Torulopsis hydromelitae</i>	31
CAPITULO 2. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
DIÁGRAMA DE TRABAJO.....	35
2.1 MATERIALES Y METODOS.....	36
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	42
3.1 RESULTADOS.....	43
3.2 DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	63
CONCLUSIONES.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	82
APENDICES.....	89

INTRODUCCION

Y

OBJETIVOS

INTRODUCCION

El creciente aumento de la población humana origina que, cada vez, sea mayor la demanda alimentaria para satisfacer las necesidades de esta población.

Por consiguiente, se hace necesario buscar nuevas fuentes de proteínas de calidad, debido a que uno de los principales aspectos de la malnutrición es la deficiencia proteica.

Entre estas nuevas fuentes de proteínas se encuentran aquéllas denominadas como de origen no convencional. A su vez, dentro de las fuentes de proteínas no convencionales está la proteína unicelular, la cual se obtiene de microorganismos con un alto contenido proteico.

El interés de estudiar levaduras del aguamiel, para su posible uso como productoras de proteína unicelular para consumo humano, es debido a varios estudios realizados (15,25,31) en los cuales se observó que estas levaduras tienen un contenido proteico y vitamínico (principalmente del complejo B) más alto que las fuentes nutritivas convencionales. Por otro lado, al ser el pulque y el aguamiel bebidas de consumo popular en México, hasta la fecha no se ha informado acerca de efectos negativos en la población que las consume, en lo referente a la microflora de estas bebidas.

Pero al hablar de la problemática de las levaduras, en particular, como fuentes de proteínas, se ha visto que uno de los principales inconvenientes es su alto contenido de ácidos nucleicos, primordialmente ácido ribonucleico; debido a que, cuando son consumidas por el hombre, y al ser metabolizadas por éste, se producen niveles de ácido úrico que exceden a los normales, este compuesto al acumularse en distintas partes del organismo puede derivar en diferentes padecimientos como la gota o la formación de cálculos renales.

OBJETIVOS

- Contribuir al conocimiento de Torulopsis hydromyces a fin de obtener proteína unicelular que pueda ser utilizada en la alimentación humana, ya que se ha demostrado que esta levadura tiene un alto porcentaje de proteínas de alta calidad y un porcentaje bajo de ácidos nucleicos (7,16,25,31).

- Determinar el efecto de tres medios de cultivo sobre el desarrollo de Torulopsis hydromyces y de algunos aspectos de la composición química del microorganismo.

- Probar siete tratamientos indicados en la literatura tendientes a reducir el contenido de ácidos nucleicos, principalmente de ácido ribonucleico.

- Comparar el efecto de estos tratamientos sobre los porcentajes de ácido ribonucleico y proteínas en Torulopsis hydromyces tratada y sin tratar.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

1.1 LAS LEVADURAS

1.1.1 Características generales

Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Pueden aislarse del suelo y de algunas plantas y frutos como la vid. También son arrastradas por el aire y algunas pueden hallarse ocasionalmente en productos animales.

Las células de levaduras son eucariotes. Generalmente, son ovales, esféricas y elipsoideas, aunque en algunas especies hay células filamentosas largas o muy ensanchadas; sin embargo, la variedad de formas en un mismo cultivo no es una prueba de contaminación del mismo. Las levaduras no poseen flagelos; tienen un núcleo bien desarrollado, globuloso, bastante voluminoso, y una pared celular gruesa, compuesta, en parte, por una sustancia parecida a la quitina. También poseen vacuolas que contienen sustancias de desecho y gránulos de alimento de diversos tipos.

Las levaduras varían considerablemente en dimensiones, según la especie, nutrición, edad y otros factores. Pueden oscilar de 1 a 9 micras de anchura y de 2 a más de 20 micras de longitud, pero pueden existir grandes diferencias, aun en un mismo cultivo. Las levaduras son gram positivas (aunque esto no se toma como una característica importante para su clasificación) y pueden teñirse también con colorantes sencillos como el azul de metileno.

1.1.2 Multiplicación de las levaduras

Asexual. La mayor parte de las levaduras se reproducen asexualmente por un proceso denominado gemación, en el cual, en lugar de formarse dos células iguales, la célula nueva al principio es mucho menor que la otra, y se denomina célula hija. Las células hijas, muchas veces, siguen adheridas a la célula madre (blastosporas); y se forman acúmulos o cadenas de células.

Sexual. Las ascosporas, o sea las esporas en sacos o ascas, son formadas durante la reproducción sexual por muchas especies de levaduras. En algunas de ellas, el núcleo de una sola célula sufre meiosis y los núcleos hijos haploides persisten en las células como ascosporas. Después se fusionan y forman células diploides que se liberan como tales en forma de células hijas. Normalmente, se forman cuatro, seis u ocho esporas por divisiones del núcleo dentro de un saco; el número tiende a ser característico de la especie. Frecuentemente, se forman ascas después de un proceso en el cual dos células haploides vecinas mandan proyecciones que se reúnen y forman un canal copulatorio, a través del cual se entremezcla el material nuclear. El núcleo diploide fertilizado se divide por meiosis para formar cierto número de ascosporas haploides. Estas pueden reproducirse indefinidamente en forma asexual, como células haploides. Se han efectuado algunos estudios interesantes sobre herencia y desarrollo de levaduras, que tienen particular importancia en procesos de fermentación.

tación (17,37).

1.1.3 Nutrición y Metabolismo

Las levaduras requieren ciertos materiales alimenticios y condiciones en el medio para sostener un crecimiento y reproducción apropiados. Algunos elementos como el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, hierro y magnesio son básicamente necesarios; los oligoelementos también desempeñan un papel importante. Además, se requieren vitaminas y otros nutrimentos orgánicos para un desarrollo satisfactorio y el funcionamiento normal de muchas especies de levaduras (37).

Metabólicamente, las levaduras son organismos predominantemente anaerobios facultativos y son capaces de emplear una gran variedad de compuestos orgánicos debido a que son organismos heterótrofos. Muchas especies son capaces de crecer en medios mínimos. Siendo mesófilas, algunas especies pueden resistir temperaturas de hasta 50°C o más; otras crecen en medios con elevada concentración de sales o azúcares o en medios muy ácidos (13).

1.1.4. Clasificación

El sistema de clasificación propuesto por Lodder, en 1970, considera a las levaduras divididas en cuatro grupos principales que comprenden 39 géneros representantes de 349 especies. Actualmente, se considera un aumento de 185 especies aceptadas y más de 10 géneros nuevos.

Para su clasificación, se toman en cuenta las siguientes características principales (16).

Características morfológicas:

- a. Forma de las células.
- b. Tamaño de las células.
- c. Aspectos de las colonias en medios sólidos.
- d. Formación de pseudomicelio.
- e. Forma de reproducción sexual.
- f. Forma de reproducción asexual.

Características fisiológicas:

- a. Aspectos de los cultivos en medios líquidos.
- b. Asimilación de los compuestos de carbono.
- c. Asimilación de los compuestos de nitrógeno.

También pueden considerarse otras características que tienen un valor secundario, como son:

- Presencia de compuestos carotenoides.
- Degradación de arbutina y otros beta-glucósidos.
- Producción de ácidos.
- Requerimientos vitamínicos.
- Degradación de grasas.
- Actividad de la ureasa.

Características evolutivas:

- a. asociación con diferentes organismos superiores;
- b. diferencias estructurales de la pared celular, y
- c. diferencias estructurales de las enzimas respiratorias.

Características del genoma celular:

- a. estudio detallado de la reproducción sexual;
- b. composición básica del ADN (Guanina + Citosina), y
- c. hibridaciones de ácidos nucleicos.

1.2 PROTEINA UNICELULAR

1.2.1 Definición y Aspectos históricos

En las últimas décadas, el término proteína unicelular (PUC) designa a las proteínas de microorganismos unicelulares (bacterias, levaduras, algas) que son cultivados para ser usados en alimentación humana o animal. También se conoce como proteína o biomasa microbiana. Dicho término se acuñó debido a que las palabras bacteria o microbio no se aceptan bien al relacionarlas con los alimentos (14,24,39,47).

Por siglos, los microorganismos han estado presentes en la dieta humana desde que el hombre desarrolló métodos caseros para producir quesos, yoghurt, pan, pozol, tempeh, pulque, cerveza y otros alimentos fermentados. En Occidente, se han consumido como fuentes de proteínas, vitaminas y minerales por muchos años. En Alemania, a principios de este siglo, se desarrollaron procesos industriales para la producción de levaduras. Durante las dos guerras mundiales, en Alemania y Japón, alimentaron al ejército, prisioneros de guerra y población civil con levaduras. En otras comunidades el consumo de levaduras es habitual.

En México en 1945, ya se pensaba acerca de la producción de PUC a base de levaduras a partir de mieles incristalizables, de caña de azúcar, para solucionar la crisis alimentaria en éste y en otros países cuya dieta diaria de proteínas de calidad es sumamente baja.

En la actualidad, se ha renovado el interés en la producción de levaduras y otros microorganismos para obtener PUC, porque una de las consecuencias más graves de la sobreproducción mundial es la deficiencia alimentaria. Entre los principales productores de PUC están: Alemania, URSS, Polonia, Hungría, Rumania, Checoslovaquia, EU, Inglaterra, Cuba, Japón, Taiwan, Francia, China, Suecia, Finlandia y Suiza (14,34,41,44,47).

Los microorganismos que más se han usado para la obtención de PUC son las levaduras porque se tiene mejor conocimiento sobre las técnicas de producción, y porque presentan las características más favorables para usarlas como alimento (5,47).

El término levadura alimenticia se emplea para designar, en especial, a la levadura cultivada expresamente para consumo humano la cual es diferente de aquella obtenida como subproducto

de la industria cervecera. La levadura alimenticia está sujeta a controles químicos y microbiológicos más estrictos que la levadura forrajera (34).

1.2.2 Especies útiles

De todas las especies de levaduras, pocas han sido útiles comercialmente y aún menos se han propuesto como posibles fuentes de PUC. Las especies más ampliamente usadas son: *Candida utilis* y *Saccharomyces carlsbergensis*, pero también se han empleado *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fragilis*, *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces fragilis* y *Rhodotorula gracilis*.

1.2.3 Ventajas de la PUC

Se considera que la PUC podría competir económicamente con las fuentes tradicionales de proteínas provenientes de animales y plantas superiores debido a las siguientes ventajas:

- a. Tiempos de generación de células cortos.

Tiempo de duplicación de masa de diferentes organismos (36)

Organismo	Tiempo de duplicación de masa
Bacterias y levaduras	10 - 120 min.
Hongos y algas	2 - 6 hr.
Pastos y algunas otras plantas	1 - 2 semanas
Aves	2 - 4 semanas
Ganado porcino	4 - 6 semanas
Ganado vacuno	1 - 2 meses
Humanos	2 - 6 meses

- b. Susceptibilidad de mejoramiento genético.
- c. Alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales.
- d. Control de las condiciones de cultivo.
- e. Porcentaje de conversión de sustrato elevado.

f. Requerimientos nutritivos simples (16,24,39,47).

Producción relativa de alimentos a partir de azúcar

Alimentos	g alimento/100 g azúcar
Carne de res	8 - 12
Carne de pollo	10 - 15
Leche	15 - 20
Levadura	45 - 50

1.2.4 Desventajas de la PUC

Para que un nuevo producto pueda ser usado como alimento, en especial si se dirigirá al consumo humano, debe someterse a controles estrictos para evaluar su seguridad y buenas características nutricionales para el hombre. Al estudiar la PUC como fuente de proteínas se ha visto que presenta algunas desventajas:

a. Alto contenido de ácidos nucleicos. Las células con altas tasas de crecimiento tienen un contenido alto de ácidos nucleicos, sobretodo de ácido ribonucleico (ARN). Al comparar a los microorganismos con los alimentos convencionales, se observa que los primeros tienen una cantidad mayor de ácidos nucleicos: el hígado contiene aproximadamente 4 %, las sardinas 2.2 %, la harina de trigo 0.14 %, la harina de centeno 0.4 %; en la carne y el pescado se forman nucleótidos libres postmortem, en cantidades de 150 miligramos y de 200 a 300 miligramos por 100 gramos, respectivamente; un litro de cerveza contiene de 35 a 70 miligramos de purinas, que se liberan de las células durante la fermentación, y equivalen de 0.1 a 0.3 gramos de ácidos nucleicos.

Porcentajes de ácidos nucleicos en algunas fuentes de PUC (41)

<i>Candida lipolytica</i>	9.0 - 11.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6.0 - 8.0
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	6.0 - 7.5

<i>Candida tropicalis</i>	8.5 - 9.7
<i>Candida utilis</i>	7.5 - 10.5
<i>Pseudomonas</i> sp.	17.0 - 18.5
<i>Scirulina</i> sp.	3.3 - 4.6

En los humanos, la ingesta de alimentos con alto contenido de ácidos nucleicos ocasiona un aumento en la concentración sanguínea de ácido úrico, que es el producto final del metabolismo de las purinas de los ácidos nucleicos. Disminuir el contenido de ARN puede resolver esta situación.

b. Baja digestibilidad de la pared celular. La pared celular de los microorganismos disminuye la digestibilidad de la PUC al impedir la acción de hidrolasas intestinales; además, la pared celular puede causar efectos alérgicos, reacciones toxicológicas, disturbios gastrointestinales, etc. Sin embargo, la digestibilidad aumenta al romper las células para eliminar la pared celular, sin que por ello se alteren sus características nutricionales. Se pueden evitar los problemas de digestibilidad al usar lisados, autolisados y extractos de levadura para aprovechar su valor nutritivo.

c. Aceptación en el mercado. Quizá, el principal problema que enfrenta el uso de PUC es su aceptación por parte de los consumidores, debido a las especiales características organolépticas que posee: sabor, apariencia y textura; esto evitaría su introducción al comercio. Pero si se considera que la PUC son células cosechadas y secadas, al igual que los granos de cereales, puede ser usada como materia prima para preparar alimentos agradables al paladar después de procesarla, porque puede ser mejorada con saborizantes y colorantes artificiales, de la misma manera como se hace con los alimentos procesados.

Como se mencionó, una vez que se obtiene un nuevo alimento, debe ser cuidadosamente evaluado. Otros alimentos también presentan problemas de toxicidad: pescado (harina: extracción con 1,2-dicloroetano), cacahuates (afatoxinas), soya (antes de procesarla contiene un inhibidor de la tripsina, hemaglutinina y otros compuestos), etc. Además, se ha visto que muchos de los alimentos tradicionales "naturales y seguros" contienen sustancias dañinas y, seguramente, no pasarían las rigurosas pruebas toxicológicas que se aplican a nuevos alimentos como la PUC (5,24,41,47).

1.2.5 Usos de la PUC

Las levaduras han sido usadas para complementar harinas de trigo y maíz, porque aumentan su valor biológico, debido,

principalmente, al alto contenido de lisina de las levaduras, y también a que proveen nutrimentos en términos de proteína total y otros factores alimenticios.

La levadura alimenticia puede usarse para mejorar el valor nutricional de otros alimentos: panes, pastas, cereales, aderezos, postres, etc. Puede usarse como suplemento dietético en forma de polvos, cápsulas y comprimidos para mejorar la ingesta de proteínas y vitaminas. También se usa para obtener sustancias como enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos y sus derivados, ergosterol (precursor de la vitamina D), etc.

La PUC puede usarse como complemento alimenticio en la nutrición de ganado doméstico mayor, de manera tal, que sea aprovechada indirectamente para consumo humano, a través de la carne y la leche obtenidos de este tipo de ganado (5,31,34).

1.3 ACIDOS NUCLEICOS

1.3.1 Estructura

Los ácidos nucleicos son el ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN). Forman el material principal de los cromosomas de los núcleos de las células; contienen y transmiten la información genética de los seres vivos.

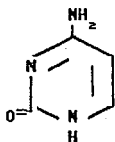
Las unidades estructurales que se repiten en todos los ácidos nucleicos son ocho nucleótidos diferentes, cuatro constituyen al ADN y cuatro al ARN. Cada nucleótido, a su vez, contiene tres unidades menores: 1) una base orgánica nitrogenada, 2) un azúcar de cinco carbonos, y 3) ácido fosfórico.

Las bases nitrogenadas, que forman parte de los nucleósidos y los nucleótidos, derivan de las sustancias precursoras purina y pirimidina. Las tres principales bases pirimidínicas son citosina, timina y uracilo. Las bases purínicas son adenina y guanina.

Un nucleósido está compuesto por una base purínica o pirimidínica, a la cual va unido el azúcar, D-ribosa en el ARN y 2-desoxirribosa en el ADN. Así, los ribonucleósidos son: adenosina, guanosina, citidina y uridina; en tanto que, los 2-desoxirribonucleósidos son: 2-desoxiadenosina, 2-desoxiguanosina, 2-desoxicitidina y 2-desoxitimidina.

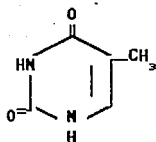
Los nucleótidos son nucleósidos fosforilados en uno o más de los grupos hidroxilo del azúcar.

Los nucleótidos participan en una amplia gama de procesos bioquímicos. Existen en todas las células vivas, donde realizan numerosas funciones importantes, como la incorporación de los ácidos nucleicos como monofosfatos de ribosa (en el ARN) o de desoxirribosa (en el ADN) (26,32).



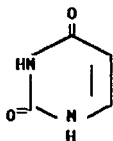
Citosina

(2-oxi-4-aminopirimidina)



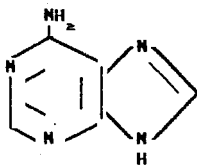
Timina

(2,4-dioxi-5-metilpirimidina)



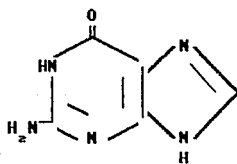
Uracilo

(2,4-dioxipirimidina)



Adenina

(6-aminopurina)



Guanina

(2-amino-oxipurina)

Bases purínicas y pirimidínicas presentes en los nucleótidos

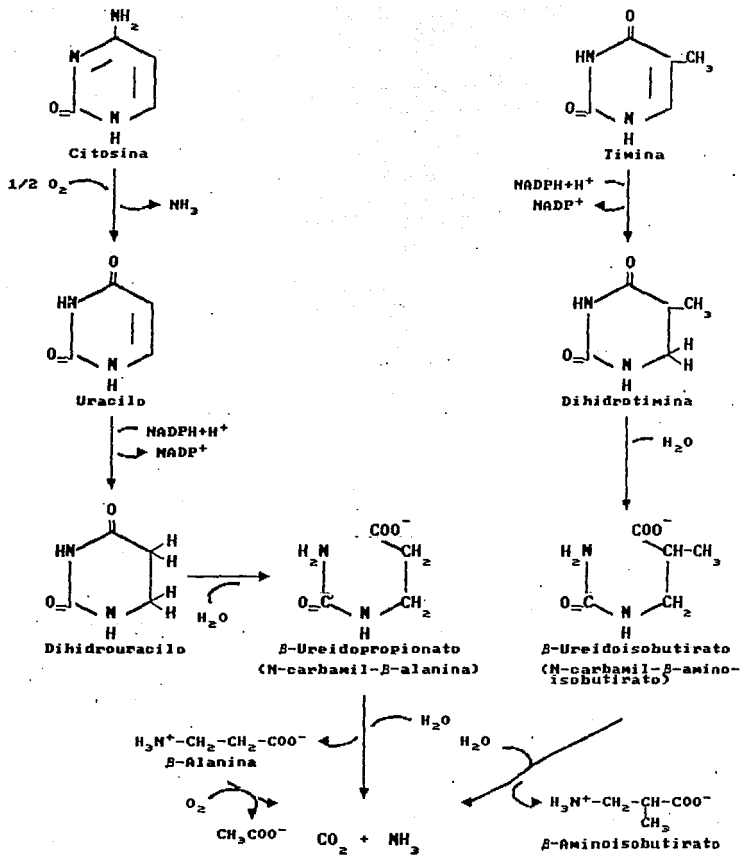
1.3.2 Aspectos acerca de su metabolismo

Ni los nucleótidos ni las bases purínicas y pirimidínicas precursoras que se ingieren en la dieta son incorporados a los ácidos nucleicos del tejido humano o a las coenzimas purínicas o pirimidínicas. Aun cuando se ingiera una dieta rica en nucleoproteínas, los humanos forman los constituyentes de los ácidos nucleicos tisulares a partir de los intermediarios anfíbios.

Los mamíferos y la mayor parte de los vertebrados inferiores son "prototróficos" para las purinas y pirimidinas, esto es, sintetizan nucleótidos purínicos y pirimidínicos de novo. Aunque los mamíferos consuman cantidades importantes de ácidos nucleicos y nucleótidos en sus alimentos, su supervivencia no depende de la absorción de estos compuestos o de sus productos de degradación. La mayor parte de los ácidos nucleicos de la dieta son ingeridos en forma de nucleoproteínas, de las que son liberados los ácidos nucleicos en el intestino por la acción de enzimas proteolíticas. El jugo pancreático contiene ribonucleasas y desoxirribonucleasas que degradan a los ácidos nucleicos hacia nucleótidos. Las polinucleotidasas intestinales, o fosfoesterasas, completan la acción de las nucleasas pancreáticas al producir mononucleótidos a partir de los ácidos nucleicos. Los mononucleótidos son subsiguientemente hidrolizados a nucleósidos por nucleotidasas y fosfatasa y, de este modo pueden ser absorbidos directamente o bien, degradados aún más por la fosforilasa intestinal hasta bases purínicas y pirimidínicas. Las bases pueden ser oxidadas. Así, poco o nada de los ácidos nucleicos de la dieta sirven como precursores directos de los ácidos nucleicos de los tejidos.

1.3.2.1 Catabolismo de las pirimidinas

Ocurre principalmente en el hígado y tiene como resultado productos finales altamente solubles. Por el contrario, se obtienen productos finales poco solubles del catabolismo de las purinas. La liberación del dióxido de carbono respiratorio del núcleo pirimidínico representa una vía importante para el catabolismo del uracilo, de la citosina y de la timina. La beta-alanina y el beta-aminoisobutirato son los principales productos finales del catabolismo de la citosina, del uracilo y de la timina, respectivamente (32).



Catabolismo de las pirimidinas

1.3.2.2 Catabolismo de las purinas

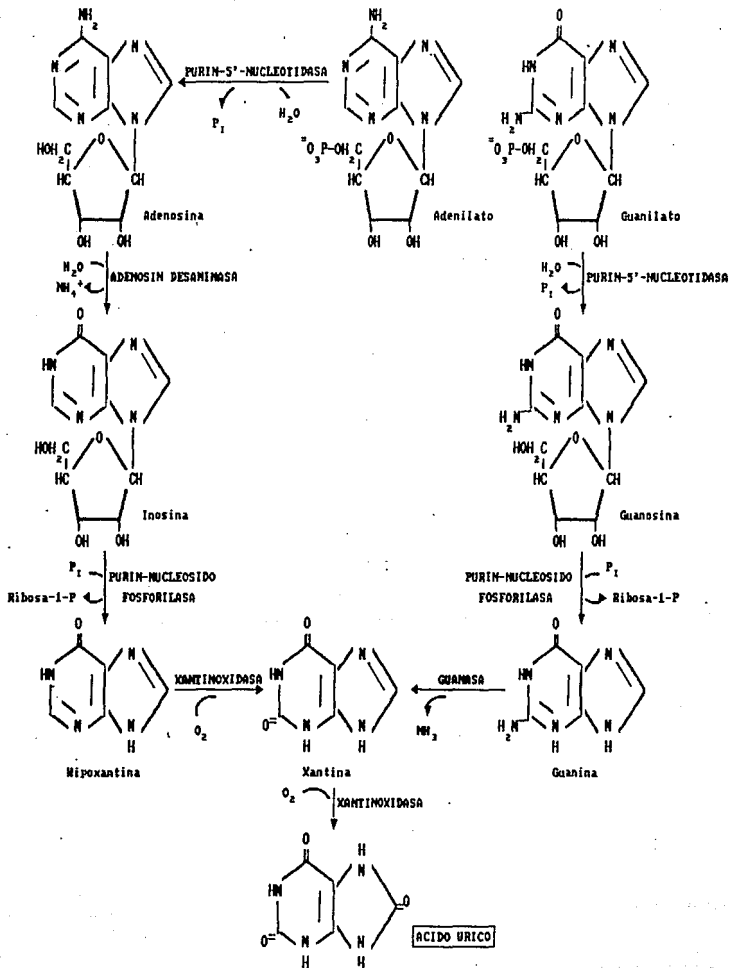
En la especie humana y otros mamíferos, los nucleótidos son sintetizados para satisfacer las necesidades del organismo de precursores monoméricos de los ácidos nucleicos. En algunos organismos (aves, anfibios y reptiles), la síntesis de los nucleótidos purínicos tiene una función adicional, la cual es servir de vehículo químico para excretar productos nitrogenados de desecho, como el ácido úrico. Tales organismos son referidos como uricotelicos, en tanto que los que se deshacen de los productos nitrogenados en forma de urea, como lo hacen los humanos, son denominados ureotelicos. Debido a que los organismos uricotelicos deben deshacerse de sus desechos nitrogenados en forma de ácido úrico, sintetizan nucleótidos purínicos a una velocidad relativamente mayor que los organismos ureotelicos. Sin embargo, los pasos seguidos en la síntesis de novo de nucleótidos purínicos en los mamíferos (ureotelicos) son análogos a los que ocurren en las aves (uricotelicos).

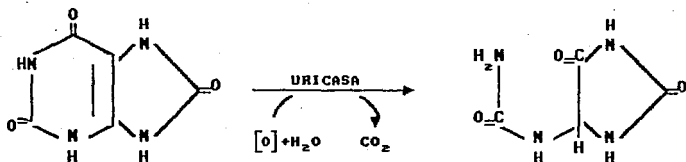
Existen dos rutas por las que pueden sintetizarse los nucleótidos de purinas: a) la ruta de novo, que construye el sistema de purina de modo escalonado a partir de glicina, glutamina, aspartato, dióxido de carbono respiratorio y formiato; y b) la ruta de recuperación, que únicamente recompona los nucleótidos de purina a partir de las purinas libres, formadas constantemente en las células, provenientes de la degradación de los nucleótidos de la célula (26).

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en el hombre, en los monos antropoides y en el perro dalmata. En base a las observaciones hechas en sujetos con deficiencias enzimáticas hereditarias, parece que más del 99 % del ácido úrico se deriva de sustratos de la purin-nucleosidofosforilasa, un componente de la vía de recuperación de las purinas; los productos purínicos de esta enzima son guanina e hipoxantina.

Los nucleótidos de purina se degradan por una ruta en la que el grupo fosfato se pierde por acción de la purin-5'-nucleotidasa. El adenilato rinde adenosina que se desamina posteriormente y da inosina; esta última se hidroliza y libera su base púrica, la hipoxantina, y D-ribosa. La hipoxantina se oxida sucesivamente a xantina y a ácido úrico. El guanilato rinde guanosina que se degrada a guanina, la cual experimenta la eliminación hidrolítica de su grupo amino y rinde xantina, que es oxidada a ácido úrico. Estas reacciones se realizan en el hígado, el intestino delgado y el riñón.

Otros mamíferos y los primates inferiores no excretan ácido úrico; son capaces de oxidarlo a una etapa posterior por acción de la enzima uricasa del hígado (perdida por el hombre durante su evolución) transformándolo en alantoína, altamente hidrosoluble, que aparece como producto final en la orina. Debido a esto, no es importante el contenido de ácidos nucleicos cuando se usan los microorganismos, de la PUC, como forraje.





Acido Úrico

Allantoína

Una gran parte del ácido úrico urinario proviene, en el hombre, de las purinas ingeridas en la dieta; pero aun cuando la dieta no contenga purinas o contenga muy pocas, se sigue excretando ácido úrico en la orina. Deriva, aparentemente, de la destrucción de las nucleoproteínas tisulares, pero también una pequeña cantidad puede ser sintetizada en el organismo a partir de urea y otros productos (4,26,32).

El cuerpo humano del adulto sano contiene aproximadamente 1.1 gramos de ácido úrico, y alrededor de la sexta parte de esta cantidad está presente en la sangre, mientras el resto se encuentra en otros tejidos. Normalmente, alrededor de la mitad del ácido úrico total es eliminada y remplazada cada día. Aproximadamente, dos terceras partes del ácido úrico formado se eliminan por el riñón; el resto se dispone, principalmente, vía secreciones gastrointestinales, el cual, rápidamente, es degradado por bacterias del tracto intestinal, por lo que poco o nada se encuentra en heces.

El ácido úrico es uno de los componentes de la fracción de nitrógeno no proteínico del plasma. Es filtrado por los glomérulos y subsiguientemente resorbido por los túbulos del riñón en proporción aproximada de 90 %. Las concentraciones de ácido úrico en suero se afectan mucho por factores extrarrenales igual que renales. Los niveles de ácido úrico en orina son, en general, un reflejo de la descomposición de los ácidos nucleicos endógenos y de la cantidad de purinas ingeridas en la dieta. A menos que el aumento de ácido úrico en suero se deba a la disminución en la eliminación, generalmente, va acompañado de un aumento en los niveles de ácido úrico en orina (40,50).

Valores de referencia de ácido úrico

Plasma o suero (mg/dl)	Orina (mg/24 hr)
Hombres 2.5 - 7.0	Dieta media 250 - 750
Mujeres 1.5 - 6.0	Dieta baja en purinas menos de 450
	Dieta rica en purinas más de 1000

1.3.3 Trastornos del metabolismo de las purinas

1.3.3.1 Hiperuricemia y gota

La forma predominante del ácido úrico está determinada por el pH de su medio (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo). En condiciones fisiológicas, es decir, al pH usual de los líquidos corporales, sólo se encuentran ácido úrico y su sal monosódica, urato de sodio. En un líquido cuyo pH sea inferior a 5.75, la especie molecular predominante será el ácido úrico; en un líquido de pH 5.75, la concentración de urato de sodio igualará a la de ácido úrico; a un pH superior a 5.75, el urato de sodio predominará en la solución.

La confluencia de urato miscible en el cuerpo se refleja por la concentración de urato de sodio en suero. Cuando este valor exceda la solubilidad del urato de sodio en el suero (hiperuricemia) pueden precipitar cristales de urato de sodio. Estos se pueden reunir y depositar en los tejidos blandos, particularmente en las articulaciones. Estos depósitos se denominan tofos.

La gota es una enfermedad que se caracteriza por episodios recurrentes de artritis violenta asociada con la presencia de cristales de urato de sodio en el líquido sinovial y, en muchos casos, la aparición de tofos en y cerca de las articulaciones. La artritis gotosa representa una complicación de hiperuricemia prolongada, cuyo origen es marcadamente diverso. El término gota secundaria se refiere a aquellos casos en los que la hiperuricemia responsable del desarrollo de la enfermedad está directamente relacionada a un desorden adquirido. La gota se presenta más comúnmente en hombres (85-90 % de los pacientes) que en mujeres.

Todos los pacientes con gota, excepto los que están sujetos a tratamiento, tienen una cantidad aumentada de urato disuelto en su fluido extracelular. Esto se manifiesta por un nivel elevado de ácido úrico en suero. El nivel de urato sérico es el resultado de una herencia multifactorial compleja y está asociado a varios factores que incluyen dieta, peso corporal, hemoglobina, concentración sérica de proteínas, etc. En un largo estudio de hiperuricemia y gota en una población adulta, se encontró que 4.8 % de los individuos tenían niveles de urato sérico mayores a 7.0 mg/dl alguna vez o durante los 14 años de seguimiento del periodo de prueba. La prevalencia de la gota estuvo estrechamente relacionada con el nivel de urato sérico, 7.3 % perteneció a aquellos con niveles de 6.0 a 6.9 mg/dl, 19.7 % a niveles de 8.0 a 8.9 mg/dl y, 8.3 % en aquéllos con valores mayores a 9.0 mg/dl. Durante dicho estudio, 2.8 % de los hombres y 0.4 % de las mujeres desarrollaron artritis gotosa.

La interacción de factores genéticos y ambientales en la determinación de hiperuricemia se ilustra por la observación de un valor de urato sérico medio significativamente más alto en los filipinos que viven en EU comparados con individuos racialmente idénticos que viven en Filipinas. La base de esta diferencia

Parece deberse a la capacidad limitada a excretar ácido úrico y que no puede compensar el contenido de purinas más alto en la dieta usual americana.

Los tofos rara vez son aparentes al mismo tiempo que el ataque inicial de artritis gotosa. Histológicamente, los tofos consisten en un núcleo nodular de cristales de urato de sodio fagocitados por leucocitos polimorfonucleares en los espacios articulares que puede conducir a una reacción inflamatoria aguda llamada artritis gotosa aguda.

Aunque la hiperuricemia puede ser producida, teóricamente, por varios mecanismos diferentes, en la gran mayoría de los casos es el resultado de un aumento en la biosíntesis endógena de las purinas o de una reducción en la excreción de ácido úrico, o ambos. Alteraciones en la ingesta de purinas y la excreción extrarrenal de ácido úrico, generalmente, tienen poca influencia en el nivel de urato sérico.

La hiperuricemia no está generalmente asociada con la gota, ya que puede deberse a otras causas: deficiencias genéticas; enfermedades mieloproliferativas, donde hay un aumento en el metabolismo de las nucleoproteínas tisulares; disminución de la función renal, etc.

1.3.3.2 Cálculos renales

Debido a que el pH de la orina de personas normales, por lo general, es menor a 5.75, la forma predominante es el ácido úrico, que es sumamente insoluble. El ácido úrico se vuelve a esta forma predominante una vez que la orina se acidifica a un pH menor a 5.75, proceso que ocurre en el túbulo distal y los conductos colectores del riñón. Si en el aparato urinario se forman cristales, serán de urato de sodio en cualquier sitio proximal al lugar de acidificación de la orina; en cualquier sitio distal al de acidificación se formarán cristales de ácido úrico.

Los cálculos son sustancias químicas depositadas en forma compacta; aunque no se conoce bien la causa de la formación de cálculos se cree que está relacionada con la solubilidad de los diversos cristaloides hallados en secreciones o líquidos eliminados del cuerpo. Casi todos los cálculos del sistema colector urinario son de ácido úrico y pueden ocurrir en algunos casos en los cuales hay una eliminación excesiva de ácido úrico. Esto puede deberse a un exceso en la dieta o a la destrucción de tejidos, como consecuencia de un trastorno metabólico (32,40,50).

1.4 ESTUDIOS SOBRE LA ALIMENTACION CON LEVADURAS

Una vez que se obtiene un producto nuevo, debe ser probado en animales y en el hombre para evaluar su calidad nutritiva, tolerancia, propiedades organolépticas, etc.

Se han realizado evaluaciones de las levaduras en animales y se ha demostrado que tienen un buen valor nutricional, por su

alto contenido de proteínas y vitaminas.

1.4.1 Pruebas de tolerancia

No se han hecho estudios suficientes y en forma estandarizada para poder determinar los niveles de tolerancia en el consumo de levaduras, ya que mucho depende del microorganismo usado y de las condiciones en que fue cultivado; así como de la duración del periodo de prueba, generalmente corto; además las dosis administradas varían en cada prueba.

Aun empleando al mismo microorganismo, no hay acuerdo general concerniente a la cantidad tolerada. En un estudio se observaron disturbios digestivos en el consumo de tres gramos de levadura por día, sin embargo en ese mismo estudio indican que pueden consumirse hasta 100 gramos diarios sin efectos indeseables. En otro estudio 18 jóvenes, inicialmente, y después 12, de edades entre siete y 12 años recibieron dosis de siete gramos de levadura alimenticia por día durante tres años, sin que se observaran efectos adversos (24).

En otro ensayo, estudiantes saludables de 18 a 27 años fueron alimentados durante nueve días, con 45, 90 y 135 gramos de levaduras cada día, sin experimentar disturbios gastrointestinales (15).

Otra investigación estudió el efecto de la alimentación con *Candida utilis* crecida en medios con glucosa o licores sulfúricos, en diferentes experimentos: no se observaron disturbios gastrointestinales en 72 individuos alimentados con dosis de 45 a 135 gramos diariamente durante 60 días. Mientras que de 12 a 23 individuos que consumieron la levadura crecida en licores sulfúricos desarrollaron una descamación indolora, en las palmas de las manos y en las plantas de los pies, que desapareció al discontinuar la alimentación con levadura; pero al administrar un antígeno preparado con la misma levadura no se observaron reacciones dérmicas, por lo que se concluyó que algunas impurezas del medio de cultivo causaron el efecto (41).

Un grupo con 50 sujetos fue alimentado con levaduras crecidas usando etanol como sustrato. Se les administraron dosis de 20 gramos diariamente. 80 % de los sujetos que consumieron las levaduras durante seis meses no experimentaron consecuencias, pero el 20 % restante desarrolló náusea, vómito, diarrea y post-tracción repentinos después de varios días o semanas del inicio del ensayo (41).

Se realizó un estudio durante seis semanas con 20 sujetos que también recibieron diariamente 20 gramos de levadura crecida en etanol. Sólo uno experimentó diarrea y náusea durante la sexta semana (41).

En algunos estudios realizados con ratas, se vio que algunas de ellas desarrollaban necrosis hepática al alimentarlas con dietas con una cantidad limitada de alfa-tocoferol y levadura

de panificación británica, pero no se desarrollaban las lesiones con levadura panadera americana. Posteriormente, se encontró que eso se debía a la presencia de selenio como contaminante en el medio de cultivo de la levadura americana (la levadura británica no contenía este elemento). Así, la necrosis no se desarrolla por la levadura en si, sino por la deficiencia de selenio y de alfa-tocopherol, que son factores protectores que previenen la aparición de lesiones hepáticas (24).

1.4.2 Evaluaciones acerca del efecto del consumo de ácidos nucleicos

Se ha observado un aumento en el nivel de ácido úrico en plasma y orina en ensayos clínicos con dietas con alto porcentaje de ácidos nucleicos. Un consumo de 75 gramos de levadura durante cinco días aumentó el nivel de ácido úrico plasmático de 3.0 a 5.3 mg/dl, y 130 gramos de levadura por siete días lo elevó de 4.8 a 8.3 mg/dl y más del doble de ácido úrico en orina.

Un consumo moderado de 10 gramos de levadura cada día, durante tres meses, no provocó aumento en los niveles de ácido úrico plasmático en 12 hombres jóvenes.

Estudios más recientes son los que realizaron Waslien y Edozien usando dietas libres de purinas con cantidades conocidas de ácidos nucleicos.

Cuatro sujetos saludables fueron alimentados con dietas que contenían, por día, 0, 45, 90 y 135 gramos de levadura, con 0, 2.9, 5.8 y 8.7 gramos de ácidos nucleicos, respectivamente, durante nueve días. La levadura administrada fue Candida utilis.

Efecto de la ingesta de ácidos nucleicos de levadura (15)

	Acido úrico en suero (mg/dl)			
Levadura (g/día)	0	45	90	135
Acidos Nucleicos (g/día)	-	2.9	5.8	8.7
Sujeto:				
1	4.5	7.5	9.2	10.1
2	4.7	7.4	9.1	9.9
3	4.5	6.8	8.5	8.5
4	4.3	7.2	8.5	9.1

Acido úrico en orina (mg/24 hr)				
Levadura (g/día)	0	45	90	135
Acidos Nucleicos (g/día)	-	2.9	7.5	8.7
Sujeto:				
1	533	1343	2007	2109
2	405	1200	1880	2400
3	504	1100	1900	1585
4	599	1125	1725	1400

Nota. Valores promedio de los días 5, 6 y 7 del experimento.

Naslian estudió a cinco hombres jóvenes saludables que recibieron dosis de 0, 2, 4, 6 y 8 gramos de ARN de levaduras por día durante cinco días.

Efecto del consumo de ARN de levadura (15)

ARN (g/día)	Nivel promedio de ácido úrico	
	Suero (mg/dl)	Orina (mg/24 hr)
0	4.9	373
2	6.0	667
4	7.7	939
8	9.4	1393

Ellos concluyen que una ingesta de dos gramos de ARN diariamente, por seres humanos, es un límite seguro para evitar problemas con la producción de ácido úrico plasmático y urinario (15).

Un estudio interesante realizado con ratas evaluó los efectos de una alimentación con los componentes individuales del ARN sobre los niveles de ácido úrico, creatinina, alantoína y N de urea, así como los cambios histopatológicos producidos en los

riñones durante seis días. Las cantidades fueron 0.75 gramos de bases nitrogenadas por 100 gramos de alimento y tres gramos de ARN de levadura por 100 gramos de alimento.

Niveles de los componentes nitrogenados en suero (mg/dl)

Dieta	Acido Úrico	Alantoína	Creatinina	N de urea
Control	1.94	2.33	0.84	20.1
Adenina	2.30	7.25	1.28	47.7
Guanina	2.00	3.43	0.85	22.3
Uracilo	1.89	2.16	0.89	21.6
Citosina	1.75	2.30	0.85	17.4

Niveles de los compuestos nitrogenados en orina (mg/día)

Dieta	Acido Úrico	Alantoína	Creatinina	N de urea
Control	2.39	23.8	2.81	264
Adenina	1.47	40.4	1.97	155
Guanina	3.41	64.3	2.97	271
Uracilo	2.75	23.2	3.12	357
Citosina	2.27	22.1	2.73	297

En cuanto al examen histopatológico, se observó que sólo las ratas alimentadas con adenina presentaron un agrandamiento y cambio de coloración de los riñones, así como la presencia de cristales de 2,8-dihidroxiadenina en el lumen tubular, vejiga y orina, los cuales pueden depositarse y causar deterioro de la función renal.

Los investigadores concluyen que es la adenina la que induce el estado de hiperuricemia, por su metabolismo diferente del de las otras bases nitrogenadas. La adenina primero debe ser

fosforilada para ser degradada posteriormente, en cambio la guanina es rápidamente degradada (52).

1.5 METODOS EMPLEADOS PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE ACIDOS NUCLEICOS EN LEVADURAS

La utilización industrial de las levaduras para su empleo en la alimentación de los seres humanos, previa disminución de la cantidad de ácidos nucleicos, es altamente atrayente, y por ello ha sido objeto de estudio en las últimas décadas.

Antes de que la PUC pueda emplearse como una buena fuente de proteína para consumo humano, el contenido de ácidos nucleicos debe reducirse, especialmente el de ARN, el cual se encuentra en mayor proporción respecto al de ADN. La cantidad de ácidos nucleicos varía de 6 a 12 %, lo que limita su consumo a una ingesta diaria de 20 a 30 gramos de levadura. El límite seguro es de dos gramos de ácidos nucleicos de levadura por día, para evitar el aumento en los niveles de ácido úrico en plasma y orina, que pudiera manifestarse en el desarrollo de gota y/o cálculos renales; si bien, se mencionó que no sólo la dieta, sino también otros factores influyen en el origen de estos trastornos.

Mediante un tratamiento adecuado, es posible obtener un producto proteico de mejor calidad por la eliminación misma de los ácidos nucleicos y, además, porque el método de extracción tiene algunas posibilidades de aumentar la digestibilidad de la proteína microbiana.

Por otro lado, el ARN extraído de las levaduras puede ser utilizado para la obtención de 5'-mononucleótidos, ya que éstos se usan en la industria alimentaria como potenciadores de sabor, es decir, son compuestos que por sí mismos no tienen efecto sensorial, pero exageran este efecto cuando se mezclan con otros compuestos.

En México, la producción rentable de PUC a gran escala requiere el aporte de equipo costoso. El acoplamiento de tecnologías para la industrialización integral de las levaduras para obtener nucleótidos saborizantes y PUC con bajo contenido de ácidos nucleicos sería la solución (15,18,19,40,51).

Se han propuesto varios métodos para la reducción del porcentaje de ácidos nucleicos para poder aumentar las cantidades de levaduras en la dieta; dichos métodos utilizan tratamientos químicos, de choque térmico y/o enzimáticos (uso de nucleasas endógenas y exógenas).

Maul y colaboradores (1970) idearon un método con el que trataron células de *Candida utilis* con aproximadamente 7 % inicial de ácidos nucleicos; una vez que determinaron los tiempos y temperaturas óptimos para efectuar el choque térmico, lograron reducir a 1.0 a 1.5 % la cantidad de ácidos nucleicos. Ellos usaron un procedimiento de tres pasos: 1) choque térmico de 62 a 68 °C durante 17 segundos, o a 68 °C por uno a tres segundos; 2)

calentamiento a 45°C por dos horas y, 3) calentamiento a 55°C por una hora. El pH óptimo fue de 5.0 a 5.5. Ellos indican que este tratamiento activa ribonucleasas intracelulares que hidrolizan el ARN, cuyos productos de hidrólisis son liberados al medio (30).

Ohta y colaboradores (1971), con el fin de determinar los procesos que ocurren durante estos tratamientos y caracterizar a los productos liberados usaron el método anterior: choque térmico a 68°C por uno a tres segundos, seguido por calentamiento a 45 a 50°C por una hora y a 55°C por una hora. El choque térmico a 68°C inicia la hidrólisis enzimática, el ARN polimerizado es hidrolizado en el calentamiento posterior y, en el último paso se liberan los productos de hidrólisis al medio. La mayor parte de éstos en forma de nucleótidos monofosfato, también se obtienen bases y nucleósidos, nucleótidos di y trifosfato y, en las últimas etapas de degradación 3' y 5'-mononucleótidos (33).

Castro y colaboradores (1971) usaron un método que consistió en someter células de *Candida utilis* a un calentamiento de 55 a 65°C por 30 segundos a pH 6.75 a 8.0 y una concentración de iones de calcio y magnesio divalentes no mayor de 0.001 M, una vez que añadieron ribonucleasa pancreática bovina A en una relación enzima-células 1:10000, con base en el peso seco. Obtuvieron una reducción de 7.5 a 9.0 % inicial a 1.5 a 2.0 % final. La levadura así tratada contenía de 40 a 50 % de proteínas. Pero concluyen que sería costoso el uso de enzimas para producir PUC a nivel industrial (9).

Canepa y colaboradores (1972) al aplicar el método de Maul, usando *Saccharomyces cerevisiae* obtuvieron sólo una reducción moderada en el contenido de ácidos nucleicos; propusieron, entonces, que las células fueran suspendidas en Na_2HPO_4 0.05 M a pH 12. Obtuvieron una relación proteínas/ácidos nucleicos de 53.0, es decir, 50 a 60 gramos de proteínas de la levadura contendrían aproximadamente un gramo de ácidos nucleicos (8).

Hedenskog y colaboradores (1972,1973) emplearon células de *Saccharomyces cerevisiae* desintegradas mecánicamente que suspendieron en NaCl al 5 % a pH 10 y las calentaron a 80°C. Lograron una reducción de 11 % inicial a 1.0 a 2.0 % final de ARN, con un rendimiento de N y materia seca de 55 a 65 % que contenía de 70 a 80 % de aminoácidos respecto a las células desintegradas sin tratar. Aproximadamente 80 % de lisina y 75 a 90 % de los otros aminoácidos esenciales se recuperaron en el concentrado de proteínas de las células desintegradas y tratadas (20,21).

Lindblom y Mogren (1974) desarrollaron un proceso mediante el cual células de *Saccharomyces cerevisiae* desintegradas mecánicamente fueron calentadas en una solución que contenía 5 % de éstas, sobre la base de su peso seco, y NaCl al 3 % a pH 5.6 a 50°C durante 20 minutos. El material tratado contenía 1.4 % de ARN. El rendimiento en términos de N fue de 60 %; recuperaron 60 a 75 % de aminoácidos, lo que dió un enriquecimiento de éstos en

relación al contenido de N. Posteriormente, Lindblom (1977) observó que la ribonucleasa intracelular usada para reducir el contenido de ARN, se inactiva parcialmente cuando se calienta a 50°C sin NaCl y no puede ser reactivada por enfriamiento o por adición de NaCl posteriores al calentamiento; sin embargo, esto no ocurre cuando se calienta a 50°C con la adición de NaCl al 3 % (27,28).

Zee y Simard (1975) usaron un proceso simple de un paso que consistió en calentar células de *Rhodospirillum rubrum* a pH 2 y a 90°C durante dos horas. Obtuvieron una reducción de 6.5 % inicial a 1.2 % final en el contenido de ácidos nucleicos, con un rendimiento de 40.4 % de proteínas. Mencionan que es preferible usar el tratamiento térmico en condiciones ácidas que alcalinas porque esto ofrece una mejor protección a los aminoácidos y a la proteína cruda (53).

Gómez y Viniegra (1977) usaron células de *Saccharomyces cerevisiae* que calentaron a pH 12 y a 90°C durante 45 minutos. Lograron extraer 95.8 % del contenido inicial de ARN. Ellos consideran que no es necesario el uso de soluciones amortiguadoras o salinas, ni tampoco seguir los pasos secuenciales del choque térmico, es decir, los calentamientos a 50 y 75°C; dicen que la extracción de ARN se debe principalmente al pH y a la temperatura empleados y no por la activación de ribonucleasas endógenas. Por estudios cromatográficos que realizaron, piensan que se obtiene ARN en forma de polinucleótidos de alto peso molecular, a diferencia de lo encontrado por Ohta; estos polinucleótidos no se hidrolizan a temperatura ambiente, pero se degradan al ajustar el pH a 8.5, lo cual puede aprovecharse, ya que la misma levadura puede ser fuente de fosfodiesterasas para producir 5'-nucleótidos como potenciadoras de sabor (19).

Shetty y Kinsella (1976) desarrollaron un método en el que se añade anhídrido succínico en exceso (0.4 gramo/gramo de levadura) a pH 8.5 inmediatamente después de que las células de levadura (cervicera en este caso) son desintegradas y suspendidas a una concentración de 5 %; el anhídrido se añade con agitación durante una hora y, el pH se mantiene con NaOH 3.5 N; se calienta por 30 minutos más hasta que se estabiliza el pH; posteriormente, se ajusta el pH a 4.2 para precipitar las proteínas isoelectricamente. Al centrifugar, la mayoría de los ácidos nucleicos permanece en el sobrenadante libre de proteínas. La succinilación aumenta la extracción de las proteínas, disminuye la proteólisis y mejora la estabilidad térmica. La proteína succinilada precipitada contiene 15.61, 1.8 y 7.0 % de N, ácidos nucleicos y carbohidratos, respectivamente. El patrón general de aminoácidos es mayor en la proteína tratada (45,46).

Petkov y colaboradores (1961) utilizaron un método químico mediante el cual calentaron células de *Saccharomyces carlsbergensis* en una solución de NaCl y NaOH a pH 5 a 7 y a 90°C durante dos horas. Obtuvieron una reducción de 89.3 % del contenido de ácidos nucleicos con una pérdida de 35.6 % de proteínas. Al hacer estudios comparativos del uso de métodos químicos,

enzimáticos y autoenzimáticos, encontraron que se obtienen mejores resultados al usar autoenzimas; como se hace en el método de Maul, o mejor aún, el método desarrollado por Petkov y colaboradores, el cual consistió en usar una solución muy espesa de células de *Saccharomyces carlsbergensis* en agua y calentar a 55°C por dos horas. Obtuvieron una reducción de 9 % inicial a menos de 2 % final de ácidos nucleicos; con aproximadamente 50 % de proteína recuperada. Recomiendan los métodos autoenzimáticos, ya que en los enzimáticos el uso de ribonucleasas exógenas eleva el costo de producción y, en los métodos químicos, como los de Canepa y Zee, hay mayor pérdida de proteínas. Observaron un aumento de proteínas en las células tratadas respecto a las no tratadas, lo cual mencionan que puede deberse a un aumento en el contenido de aminoácidos libres (35,36).

Alvarez y colaboradores (1982) dicen que no todas las células tienen la misma susceptibilidad al choque térmico, por lo que usaron una temperatura mayor para aplicarlo. Ellos emplearon suspensiones de células de *Saccharomyces cerevisiae* al 14 %, con base en el peso seco, en solución amortiguadora de fosfato (NaH_2PO_4) a pH 4.5, las cuales sometieron a choque térmico a 80° C por 30 y 50 segundos, seguido de un calentamiento a 65° C. Por medio de estudios radiactivos, observaron que hay mayor liberación de ARN, marcado con C^{14} , al medio entre 20 y 30 minutos posteriores al inicio del tratamiento, cuando no se aplica el choque térmico, sólo el calentamiento a 65° C. Esto les hizo suponer que a temperaturas mayores a 65° C ocurre una inactivación parcial de las ribonucleasas endógenas. En cuanto al choque térmico, determinaron que no hubo diferencias entre 30 y 60 segundos. Al suspender las células en NH_4OH , observaron que no hay diferencias significativas en el ARN liberado al medio, cuando calentaron con y sin choque térmico. Pensaron que, probablemente, ocurre una degradación química del ARN por las condiciones fuertemente alcalinas y no por un proceso enzimático. Estudiaron la relación entre el pH y la liberación de ARN; observaron un aumento en la liberación de ARN a medida que aumenta el pH, pero también dicen que podría ocurrir una degradación química a valores de pH menores de 2, como ocurre por encima de pH 12. La cantidad de proteína liberada al medio a diferentes valores de pH fue entre 17 y 24 %. Observaron que para valores de pH por encima de 5 se obtiene una dependencia casi lineal entre la liberación de ARN y el aumento de pH (1).

Tajima y Takahashi (1982) usaron células de *Candida utilis* que suspendieron en agua y las sometieron a un tratamiento consistente en un choque térmico a 68° C por seis segundos, seguido por un calentamiento a 50 y 55° C por una hora. El contenido de ácidos nucleicos de las células tratadas fue de 3.65 %, con base en el peso seco. Observaron que el contenido de aminoácidos libres aumentó tres veces más en las células tratadas (0.184 %) respecto a las no tratadas (0.059 %), aunque no todos los aminoácidos aumentaron en la misma proporción, lo cual indicó que no hubo proteólisis extensa durante el proceso térmico, y sólo aminoácidos específicos son liberados de las proteínas celulares (49).

Damodaran y Kinsella (1983) mencionan que algunos de los métodos químicos y enzimáticos empleados para disminuir el porcentaje de ARN en levaduras presentan desventajas en términos de la calidad funcional y nutricional de la proteína aislada. Ellos sugieren, sobre la base de estudios que realizaron anteriormente, un método basado en la modificación química de la estructura circundante a las uniones entre los grupos amino de las proteínas y los grupos fosfato de los ácidos nucleicos, al adicionar cargas negativas, lo que debilita las interacciones electrostáticas en un medio ambiente hidrofóbico, que interviene en dichas uniones y permite la disociación del complejo de proteínas y ácidos nucleicos. Esto puede lograrse mediante el uso de ciertas sales: Cl^- , Br^- , NO_3^- , I^- , ClO_4^- , Cl_2CCOO^- , etc. Ellos usaron $NaCl$, $NaBr$, $NaClO_4$ y $NaCl_2CCOO$ para sus ensayos. Observaron una mayor remoción de ácidos nucleicos al tratar células desintegradas de levadura cervecera con soluciones de $NaClO_4$ y $NaCl_2CCOO$ 0.5 M, calentando a 25° C el menor tiempo posible a pH 7 a una concentración de nucleoproteínas de 3 %. Posteriormente, precipitaron las proteínas isoelectricamente al ajustar a pH 4.2, y lavaron con agua a pH 4.2 para remover las cantidades residuales de sales. Obtuvieron una remoción del 80 % de ácidos nucleicos, y recuperaron 76.9 % de proteínas con 2.5 % de ácidos nucleicos. Sugieren este procedimiento para usarlo a escala industrial, porque no presenta las desventajas de otros métodos en los cuales si aplicar álcalis y choques térmicos se forman compuestos como la lisinalanina, o al emplear anhídrido succínico se forma succinilizina la cual, al igual que la lisinalanina, no son biológicamente disponibles; además de que la activación de endonucleasas, con choques térmicos, va acompañada por una activación de otras enzimas como las proteasas, las cuales disminuyen el rendimiento de proteínas. Dicen que al emplear su método industrialmente, las sales usadas pueden recuperarse y reciclarse, lo que disminuiría los costos de producción. Por otro lado, al no usar tratamientos térmicos y/o enzimáticos, no se producen modificaciones en las proteínas obtenidas, los cuales presentan buenas características nutricionales y funcionales (10,11,12).

Mátrai y Hálasz (1984) emplearon un método en células de *Saccharomyces carlsbergensis* desintegradas mecánicamente, las cuales suspendieron a una concentración de 5 a 10 % y añadieron $NaCl$ al 3 %. Usaron un tratamiento térmico de tres pasos: choque térmico a 70° C durante pocos segundos, calentamientos a 40° C por una hora y, a 50° C por dos horas. Lograron una remoción de 80 % en el contenido de ácidos nucleicos (29).

Bueno y colaboradores (1985) experimentaron con choques térmicos y concentraciones de $NaCl$ sobre tres especies distintas de levaduras: *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis*. Encontraron que para cada cepa varían los parámetros con los que se pueda obtener una mayor reducción de ácidos nucleicos y pérdidas menores de proteínas y biomasa. Obtuvieron los siguientes resultados:

Células de levaduras tratadas con choque térmico a 68° C y calentadas por dos horas a 52° C. Suspensión de levaduras a 7 %

	Contenido de ARN (%)	Proteínas (%)	Recuperación de biomasa (%)
<i>C. utilis</i>			
Tratada (*)	2.68	41.67	73.6
No tratada	8.67	41.29	100.0
<i>S. cerevisiae</i>			
Tratada (**)	2.07	37.56	62.0
No tratada	6.75	42.51	100.0
<i>K. fragilis</i>			
Tratada (***)	1.81	45.48	74.69
No tratada	9.11	43.14	100.0

* 8 s, 3 % de NaCl; ** 8 s, 1 % de NaCl; *** 15 s, 1 % de NaCl.

También estudiaron los perfiles de aminoácidos de las muestras tratadas al compararlas con el material inicial. En la mayoría de los casos, el patrón de aminoácidos de las muestras tratadas fue mejor que en el material original. Obtuvieron una recuperación total mayor a 90 % para las tres cepas; lo cual indicó que no se detectó efecto sobre los aminoácidos después del choque térmico (ver cuadro anterior). Ellos mencionan que el NaCl actúa como estabilizante de otras enzimas además de las ribonucleasas; ya que como indican Gierhart y Potter (1979) también son activadas enzimas proteolíticas y amilolíticas durante el choque térmico, en células de *Candida utilis*; estas enzimas son las responsables de la liberación de otros compuestos intracelulares y/o sus derivados, pero la actividad de las proteasas varía en las distintas especies de levaduras (6,18).

Huang y Kinsella (1986) propusieron otro método que no incluya choques térmicos. Usaron células de *Saccharomyces cerevisiae* desintegradas mecánicamente; a la suspensión de nucleoproteínas al 2 %, le añadieron POCl₃ con agitación a 10° C, manteniendo el pH entre 8.0 y 8.5, la agitación se prolongó por una hora hasta la estabilización del pH cercano a 8.0. Posteriormente, se ajustó a pH 4.0 para la precipitación isoeléctrica de la proteína fosforilada. Obtuvieron una remoción de más de 85 % de los ácidos nucleicos. Lograron recuperar 71.9 % de proteína con 2.7 % de ácidos nucleicos. Este proceso fue reversible en

condiciones ácidas suaves. La fosforilación, al igual que la adición de anhídrido succínico, destruye el complejo de nucleoproteínas al alterar las uniones electrostáticas entre los grupos amino de los residuos de lisina, principalmente, y los grupos fosfato de los ácidos nucleicos. Pero en el caso de la succinilación, se necesitan condiciones más drásticas para eliminar los grupos succinilos de las proteínas, por lo que la succinilina formada no está disponible nutricionalmente. La proteína de levaduras es rica en lisina, ésta es una de las razones por las que se usan como un excelente suplemento para cereales deficientes en este aminoácido y, no es conveniente obtener PUC con lisina no biodisponible. Si bien, no obtuvieron datos acerca de la biodisponibilidad de la lisina fosforilada. La fosforilación no cambió la composición de los aminoácidos en la proteína de levadura. Este método lo recomiendan porque no presenta inconvenientes como la modificación de algunos aminoácidos por tratamientos fuertes en condiciones alcalinas: racemización de aminoácidos, reacciones de beta-aliminación de serina y cisteína y, formación de lisinilamina, así como de otros compuestos. La composición química de la proteína fosforilada de levadura fue similar a la obtenida por tratamiento con NaClO_4 por Damocaran y Kinzella (23).

Alvarez y Enriquez (1984, 1988) experimentaron con células de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis* con las que lograron la mayor remoción de ácidos nucleicos usando NH_4OH al 4.5 % y calentando a 65°C por 30 minutos. Bajo estas condiciones, en la biomasa obtenida de *Kluyveromyces fragilis* se logró una reducción de alrededor de 90 % de los ácidos nucleicos del contenido inicial de 12.08 %. Obtuvieron un producto final con 1.2 % de ácidos nucleicos, las pérdidas de biomasa y proteínas fueron de 30 y 20 %, respectivamente. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, ésta tenía un contenido inicial de ácidos nucleicos de aproximadamente 7 %. Una vez tratada, se obtuvo un producto final con aproximadamente 1.4 % de ácidos nucleicos con pérdidas de biomasa y proteínas aproximadas de 20 y 10 %, respectivamente. Al comparar los resultados, piensan que lo anterior puede deberse a una menor resistencia de la pared celular de *Kluyveromyces fragilis*, evidenciada por las mayores pérdidas de biomasa y proteínas, así como un mayor porcentaje de reducción de ácidos nucleicos (2,3).

1.6 ALGUNOS ASPECTOS ACERCA DEL AGUAMIEL Y EL PULQUE

1.6.1 Historia y Características generales

El pulque es consumido en México desde la época prehispánica, durante la cual se utilizaba en rituales religiosos. Después de la conquista y hasta la fecha, continúa formando parte del gusto popular. En la actualidad, se consumen un millón de litros por día en la ciudad de México, principalmente por las clases de bajos ingresos.

Según estudios del Instituto Nacional de la Nutrición (1983), los niños de familias de pocos recursos económicos se alimentan con pulque tres veces al día; obtienen, de esta manera,

30 % de sus requerimientos de proteínas y energía por día.

El pulque se obtiene por medio de la fermentación espontánea del aguamiel, que es la savia dulce de diversas especies de agaves. Posee un pH entre 3.5 y 4.0 (16,31).

1.6.2 Microbiología

Se han aislado dos tipos de microorganismos del aguamiel y del pulque: bacterias y levaduras. Pero en proporción, hay mayor número de levaduras en el pulque (16).

Microorganismos aislados del pulque (Herrera y Ulloa).

Bacterias	Referencia
<i>Acetobacter aceti</i>	Beijerinck
<i>Bacillus teres</i>	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	Bergey y otros
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	Hucker y Pederson
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	van Tiegem
<i>Micrococcus candidus</i>	Cohn
<i>Micrococcus luteus</i>	Cohn
<i>Micrococcus roseus</i>	Fluegge
<i>Sarcina flava</i>	de Bary
<i>Zymomonas mobilis</i>	Kluuyver y van Niel
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sánchez Marroquín y Hope
<i>Lactobacillus brevis</i>	Sánchez Marroquín y Hope
Levaduras	Referencia
<i>Candida parapsilosis</i>	Langeron y Talice
<i>Rhodotorula incarnata</i>	Ruiz Oronoz
<i>Pichia membranifaciens</i>	Ruiz Oronoz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Kloeckera apiculata</i>	Janke
<i>Torulopsis hydromelitis</i>	Ruiz Oronoz

1.7 GENERALIDADES SOBRE *Torulopsis hydromelitis*

La cepa utilizada en este trabajo fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM, y fue aislada de una muestra de aguamiel obtenida en Tlanepantla, Estado de México, para un trabajo anterior de tesis (31).

Es una levadura esférica u ovoide, su tamaño es de 7 x 8 micras; sus colonias en medio gelosado de melaza de caña de azúcar-licor de maíz son: redondas, de color blanco grisáceo con

bordes enteros y planas.

En el mismo medio, en forma líquida, presenta sedimento abundante, de color blanco y forma un velo superficial a los cinco días de cultivo (31).

Asimila algunos azúcares, en concentraciones del 1 % en el medio de cultivo, como son: galactosa, manosa y sacarosa. Como fuentes de nitrógeno utiliza: asparagina, NaNO_3 , peptona, urea y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (31).

Presenta la siguiente composición química:

g/100 g de levadura seca	
Humedad	9.50
Cenizas	6.00
Lípidos	0.10
Proteínas	49.00
Carbohidratos	35.40
Fósforo	1.8
Nitrógeno	7.49

Contenido de aminoácidos esenciales (g/100 g de producto seco)

<i>Torulopsis hydromelitis</i>		Proteína FAO (Huevo integral)
Isoleucina	4.82	4.20
Leucina	11.72	4.80
Lisina	3.18	4.20
Fenilalanina	5.60	2.80
Tirosina	3.98	2.80

Cisteína	2.06	2.00
Metionina	3.08	2.20
Treonina	7.95	2.80
Triptofano	1.30	1.40
Valina	4.89	4.20

De acuerdo a estos valores se observa que la PUC de Torulopsis hydromelitis compete en calidad con la proteína de la FAO.

1.7.1 Evaluación biológica de la calidad de sus proteínas

Para evaluar biológicamente a las proteínas, se usan dos métodos principalmente: aumento de peso de los animales usados para probar las proteínas (PER) y medición del aumento de nitrógeno corporal (UPN).

La calidad de una proteína indica la eficiencia con la cual es utilizada para el crecimiento y mantenimiento de los seres vivos. Una proteína de alta calidad aporta los aminoácidos esenciales en cantidades suficientes para dichas funciones.

Comparación de PER y UPN de la levadura respecto a la caseína.

	PER	UPN
Caseína	2.17 (100.0 %)	48.05 (100.0 %)
<u>Torulopsis hydromelitis</u>	1.48 (68.2 %)	44.51 (92.7 %)

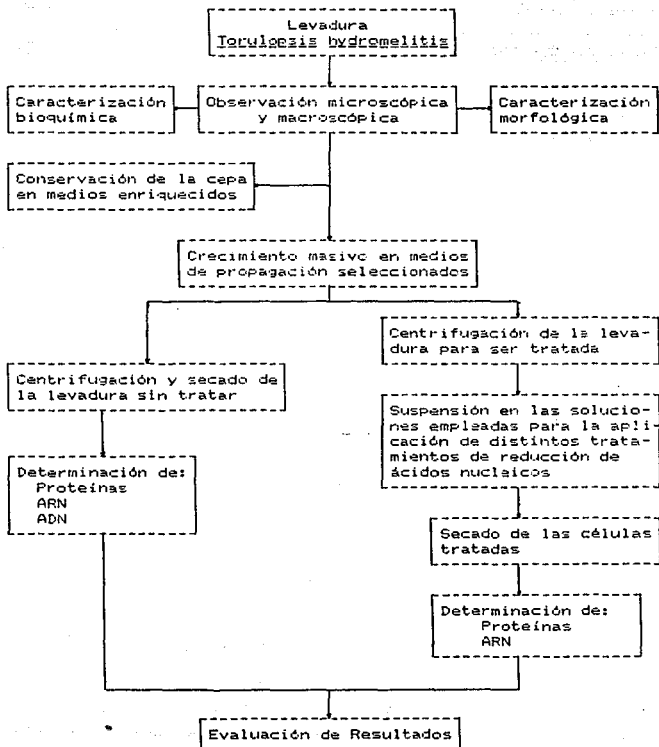
De lo anterior se deduce que la PUC de Torulopsis hydromelitis es de buena calidad (25).

CAPITULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

Diagrama de trabajo



2.1 MATERIALES Y METODOS

2.1.1 Identificación de la levadura

La levadura usada en este trabajo se obtuvo del Laboratorio de Microbiología Experimental en forma aislada, se procedió a revisar metodológicamente las características microscópicas, macroscópicas y bioquímicas, para verificar la pureza de la cepa. La observación de las características microscópicas y macroscópicas se realizó después de cultivar las levaduras en el medio de conservación y en el medio de propagación No. 1 (ver Apéndice 1) a 28°C durante 48 horas.

Posteriormente, se observaron las características bioquímicas de utilización de azúcares y asimilación de fuentes de nitrógeno; para esto se empleó el método auxonográfico de Beijerinck en el medio ideado para este fin (Apéndice 1):

Se vertieron dos ml de una suspensión de levaduras (previamente incubadas a 28° C por 24 horas) en una caja de Petri; se adicionaron 10 ml de medio de Beijerinck fundido y enfriado a 40° C; se homogenizó la suspensión y, una vez que solidificó el agar, se colocaron, en diferentes puntos de la superficie, pequeñas cantidades de azúcares pulverizados. Se incubaron las placas a 28° C durante 24 y 48 horas. Se repitió este procedimiento para probar las fuentes de nitrógeno. Los resultados se compararon con los informados por Ruiz Oronoz, y Meymar y Vargas (7,31,42,43).

2.1.2 Conservación de la cepa

Tratamiento de la melaza de caña de azúcar para ser utilizada como fuente de carbono para el desarrollo y producción de la levadura (7). Con el objeto de eliminar y separar sólidos que pudieran inhibir el crecimiento de la levadura, así como para lograr la inversión de la sacarosa, la melaza fue tratada antes de su empleo:

La melaza se diluyó 1:3 con agua destilada y se ajustó el pH a 8.5 con KOH; se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez enfriada se centrifugó.

Posteriormente, se ajustó el pH a 4.5 con HCl; se esterilizó y centrifugó nuevamente en autoclave a 121°C por 15 minutos.

La melaza tratada se usó para elaborar los medios de cultivo. Sus azúcares reductores totales se determinaron por el método de la orto-toluidina usando glucosa G.P. para desarrollar una curva patrón comparativa.

La cepa se conservó en el medio de conservación gelosado (ver Apéndice 1) en tubos de ensayo sembrando una asada en cada tubo e incubando a 28° C por 24 horas. Una vez obtenido el crecimiento los tubos se refrigeraron. Las resiembras se hicieron mensualmente, de acuerdo a las indicaciones proporcionadas con la

cepa para la realización de este trabajo.

2.1.3 Propagación de la levadura en diferentes medios de cultivo

Sobre la base de los resultados informados en trabajos anteriores (7,16,25,31) se seleccionaron tres medios de cultivo (ver Apéndice 1) y se procedió a evaluar el efecto de los mismos sobre el desarrollo de *Trichosporon hydnocarpus*, así como en el contenido de ácidos nucleicos y proteínas en la levadura.

- Activación de la cepa y obtención de inóculo para cada uno de los medios de cultivo a probar

La levadura se sembró en tubos de ensayo que contenían los medios de propagación 1,2 y 3 en agar inclinado. Se incubaron a 29° C durante 24 horas. Cada cultivo se sembró en dos ml de medio de cultivo líquido estéril y se sembraron en matraces Erlenmeyer con 50 ml del medio líquido de propagación correspondiente; se incubaron a 28° C y 200 r.p.m. por 24 horas.

- Obtención de la biomasa

A partir de los inóculos anteriores, se sembró un ml en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 y 300 ml que contenían, por separado, 100 ml de cada uno de los medios de propagación. Los tapones usados para los matraces estaban formados por una capa de algodón de aproximadamente un cm de altura colocada entre dos capas de gasa de aproximadamente 10 por 15 cm (tapones "Sandwich"); para obtener un mayor intercambio gas-aire durante la agitación (48). Los matraces con medios de propagación 1 y 2 se incubaron durante 48 horas a 28° C, en agitación a 200 r.p.m. Los matraces con el medio de propagación 3 se incubaron en las mismas condiciones, pero sólo por 36 horas; los tiempos de propagación son diferentes porque en trabajos anteriores se determinó el tiempo óptimo de propagación para cada uno de los medios de cultivo, cuando éstos fueron desarrollados (16,25,31).

Cada cultivo se dividió en dos fracciones: I y II. La fracción I se empleó para determinar el peso seco de la levadura, así como su contenido de ácidos nucleicos y proteínas. La fracción II se utilizó para determinar el efecto de los tratamientos físicos y químicos sobre la reducción del contenido de ácido ribonucleico.

- Secado de la levadura y determinación del peso seco

Las fracciones I de los cultivos se centrifugaron a 3500 r.p.m. por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se lavó varias veces con agua destilada acidulada con HCl a pH 4.2, suspendiendo y centrifugando para decolorarlo. Posteriormente, se lavó dos veces con etanol al 96 %, una vez con mezcla etanol-éter y, finalmente, una vez con éter etílico. Se dejó evaporar completamente el éter a temperatura ambiente hasta obtener la levadura seca que se usó para los análisis químicos de

proteínas y ácidos nucleicos.

El peso seco se determinó por diferencia al poner una muestra de levadura en un crisol tarado a peso constante y se desecó a 80° C hasta obtener un peso constante de la muestra de levadura.

2.1.4 Aplicación de los tratamientos de reducción de ARN

Para este fin se emplearon las fracciones II. En todos los casos se usaron suspensiones de células enteras de la levadura *Ipulqesii hydromelitii* en concentraciones de 5 a 10 % (P/V), sobre la base del peso seco, después de que la levadura fue separada de los medios de cultivo, por centrifugación, y lavada varias veces con agua destilada. Los tratamientos empleados fueron los siguientes:

Tratamiento A. Se suspendió la levadura en agua destilada y se ajustó a diferentes valores de pH: 3, 5, 7, 9 y 11.8, con soluciones de NaOH 0.1 N y HCl 0.1 N. Se aplicó un choque térmico a 68° C por 10 segundos, seguido por un calentamiento en baño de agua a 50 a 55° C por dos horas (8,19,20,35,36,49,53).

Tratamiento B. Se empleó el tratamiento anterior, pero en este caso, la levadura se suspendió en Na₂HPO₄ 0.05 M (8).

Tratamiento C. Se usó el tratamiento A pero la levadura se suspendió en NaCl 3 % (5,8,20,21,27,28).

Tratamiento D. Se suspendió la levadura en NH₄OH 4.5 %, a la cual se le midió el pH, cuyo valor fue 10. Se calentó en baño de agua a 65° C durante 30 minutos (1,2,3).

Tratamiento E. La levadura fue suspendida en NaCl 3 % a pH 5.6 y se calentó en baño de agua a 50° C durante 20 minutos (27,28,29).

Tratamiento F. La levadura se suspendió en soluciones 0.5 M de distintas sales: NaNO₃, NaClO₄, NaCl y NaCl₂CCOO. a las que se les ajustó el pH de 8 a 9. Inmediatamente después se les ajustó el pH a 4.2 (11,12).

Estos tratamientos se aplicaron, por separado, a células cultivadas en los distintos medios de propagación 1, 2 y 3.

En todos los casos inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos, se procedió a ajustar a un pH de 4.2 mediante la adición de soluciones de NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N, para obtener la precipitación isoeléctrica de las proteínas. Posteriormente, se hicieron lavados con agua a pH 4.2 y con etanol y éter etílico, usando el procedimiento descrito para secar la levadura sin tratar. A la levadura seca tratada se le determinó el contenido de proteínas y de ARN.

2.1.5 Análisis químicos

Los análisis químicos se hicieron empleando los métodos recomendados por Herbert y colaboradores (22):

- Método de Biuret para la determinación de proteínas

Este método se basa en la reacción entre el ión Cu^{+2} y los grupos carbonilo y amino de los enlaces peptídicos de las proteínas, en un medio alcalino, con la formación de un complejo quelato de color violeta. Ocurre una reacción análoga entre el ión Cu^{+2} y el compuesto biuret, $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$, y por esto la reacción lleva su nombre.

Se pesaron de dos a 10 mg de células lavadas, sobre la base de su peso seco, y se suspendieron en dos ml de agua destilada. Se adicionó un ml de NaOH 3 N y se pusieron en baño de agua hirviendo durante cinco minutos; se enfrió. Se adicionó un ml de CuSO_4 al 2.5 %, se taparon los tubos y se agitaron vigorosamente, se dejaron reposar cinco minutos para permitir el desarrollo de color y se centrifugaron.

Se obtuvieron las concentraciones comparando contra un juego de soluciones patrón de proteínas (2, 4, 6 y 8 mg); en este caso se usó caseinato de sodio como proteína de referencia; dichas soluciones, al igual que un blanco de reactivos, se trataron de la misma manera, incluyendo el calentamiento. Se leyeron las intensidades de color de los sobrenadantes en un espectrofotómetro a 555 nm.

- Método del orcinol para la determinación del ARN

Este método se basa en la hidrólisis del ARN para liberar la ribosa unida a las bases nitrogenadas, lo que se logra al tener un medio ácido y calor; estas condiciones favorecen la conversión de la ribosa a furfural, el cual reacciona con sustancias cromogénicas, como las del reactivo de orcinol, y se obtiene un compuesto de color verde, que se lee en un espectrofotómetro.

Se pesaron de 20 a 60 mg de células secas y se pusieron en un tubo de ensayo, se trataron de la siguiente manera:

Extracción del material ácido-soluble: Fue necesario extraer el material ácido-soluble para evitar interferencias durante la determinación. Se adicionaron cinco ml de HClO_4 0.25 N frío, se dejaron en reposo durante 15 minutos en un baño de hielo, agitando ocasionalmente; se centrifugó; se repitió una segunda extracción por 15 minutos, debido a que las levaduras tienen grandes cantidades de azúcares libres (la concentración de HClO_4 no deberá exceder a 0.25 N, ni el tiempo de extracción deberá ser mayor de 30 minutos, o puede ocurrir hidrólisis apreciable de ARN). Después de la extracción se centrifugó y los sobrenadantes, que contenían el material ácido-soluble, se desecharon.

Extracción del ARN: Al precipitado con el ARN se le adicio-

narón cuatro ml de HClO_4 , 0.5 N y se extrajo a 37°C por dos horas, se centrifugó; se recogió y guardó el sobrenadante. Se lavó el remanente una vez con tres ml de HClO_4 , 0.5 N y se recogió el segundo sobrenadante, el cual se agregó al primer sobrenadante, ya que en ambos se encontraba disuelto el ARN.

Se tomó un ml de los extractos anteriores y se le adicionaron tres ml de reactivo de orcinol (ver Apéndice 2) recientemente preparado. Se prepararon un blanco de reactivos y de soluciones patrón de ribosa (10 a 100 microgramos) para ser tratados de la misma manera. Se calentaron en baño de agua hirviendo durante 20 minutos para desarrollar el color, se enfriaron y se agregaron seis ml de butanol a cada tubo. Se leyeron las intensidades de color de los sobrenadantes en un espectrofotómetro a 672 nm.

Una vez que se obtuvo el porcentaje de ribosa, a partir de éste y por medio de los pesos moleculares, se calculó el porcentaje de ARN para cada muestra de levadura, sin tratar y tratada.

- Método de la difenilamina para la determinación del ADN

Este método se basa en calentar el ADN, el cual se hidroliza, dejando libres los desoxirribonucleótidos, los cuales llavan a la formación de un intermediario, el aldehído omega-hidroxi-levúlico, el cual se condensa con la difenilamina, para dar un compuesto colorido azul cuya intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de desoxirribosa presente.

Se pesaron de 20 a 60 mg de células secas y se pusieron en un tubo de ensayo; se les extrajo el material ácido-soluble de la misma manera que en la determinación del ARN.

Al precipitado, que contenía el ADN, se le adicionaron cuatro ml de HClO_4 , 0.5 N y se pusieron en baño de agua a 70°C durante 15 minutos, agitando ocasionalmente; se dejó enfriar y se centrifugó; la extracción se repitió dos veces con volúmenes de tres ml de HClO_4 , 0.5 N por 15 minutos; en cada extracción se guardaron los sobrenadantes después de centrifugar y se mezclaron para obtener todo el ADN disuelto. A dos ml del extracto anterior se les adicionaron dos ml de reactivo de difenilamina (ver Apéndice 2); se prepararon soluciones patrón con cantidades conocidas de ADN y un blanco de reactivos simultáneamente. Los tubos se incubaron toda la noche (16 a 20 horas) a 30°C y se leyeron las intensidades de color de los sobrenadantes a 600 nm.

2.1.6 Recuperación de biomasa

Los porcentajes de recuperación de biomasa se obtuvieron al tomar el peso de la levadura sin tratar, después de secarla, como el 100 %, y sobre esta base se hicieron los cálculos para la levadura a la que se le aplicaron los distintos tratamientos, una vez que se hubo secado.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Los resultados que se presentan son al promedio de dichas determinaciones. El manejo de los resultados se hizo sobre la base del peso seco de la levadura tratada y sin tratar.

A la levadura tratada no se la determinó el contenido de ADN debido a que los tratamientos estaban dirigidos a la reducción en el porcentaje de ARN, porque éste se encuentra en mayor proporción y, por tanto, fue más importante investigar las variaciones de ARN después de aplicar los tratamientos.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y

DISCUSION

3.1 RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el trabajo experimental son los siguientes:

3.1.1 Características macroscópicas (2.1.1)

En medios de cultivo sólidos	Conservación	Propagación 1
Tiempo de incubación	48 hr	48 hr
Morfología	Circular	Circular
Superficie	Lisa	Lisa
Color	Blanco-gris	Blanco-gris
Bordes	Enteros	Enteros
Elevación	Plana	Plana

En medios de cultivo líquidos	Conservación	Propagación 1
Tiempo de incubación	48 hr	48 hr
Sedimento	Abundante	Escaso
Color	Blanco	Blanco
Formación de velo superficial	Se forma a los 5 días	Se forma a los 5 días
Turbidez	Ausencia	Ausencia

3.1.2 Características microscópicas (2.1.1)

Tiempo de incubación	Dimensiones	Morfología	Agrupamiento
48 hr	6 x 8 micras	Circular y ovoide	No se presenta

3.1.3 Características bioquímicas (2.2.1)

Utilización de azúcares

Arabinosa	-
Galactosa	+
Maltosa	-
Manosa	+
Rafinosa	-
Sacarosa	+

Utilización de fuentes de N

Asparagina	+
NaNO ₂	+
Peptona	+
Urea	+

3.1.4 Análisis químicos efectuados a la levadura (2.1.5)

A continuación se dan los resultados obtenidos de las determinaciones de proteínas y ácidos nucleicos en la levadura tratada y sin tratar, el ARN se expresa en términos de ribosa así como ARN calculado usando pesos moleculares a partir del porcentaje de ribosa determinado. También se dan los porcentajes de recuperación de biomasa calculados a partir del peso seco obtenido para la levadura sin tratar (100 %).

3.1.4.1 Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Torulopsis hydromelitii* y sobre el contenido de proteínas y ácidos nucleicos

Medio	Peso seco (g/100 ml)	ARN (%)	Ribosa (%)	ADN (%)	Proteína (%)
1	0.878	8.97	3.50	0.293	50.89
2	1.169	6.35	2.48	0.166	51.41
3	1.082	4.43	1.73	0.183	47.61

3.1.4.2 Medio de propagación 1 (a base de sacarosa)

Tratamiento A (2.1.4).

		ARN (%)	Ribosa (%)	Proteína (%)	Recuperación de biomasa (%)
pH	3.0	8.07	3.15	50.88	71.48
pH	5.0	5.89	2.30	44.44	79.62
pH	7.0	5.30	2.07	44.90	76.84
pH	9.0	5.30	2.07	36.51	73.90
pH	11.8	4.82	1.88	29.09	71.49

Tratamiento B (2.1.4).

	ARN (%)	Ribosa (%)	Proteína (%)	Recuperación de biomasa (%)
pH 3.0	4.15	1.62	49.29	70.17
pH 5.0	2.69	1.05	38.89	76.90
pH 7.0	2.64	1.03	40.00	81.24
pH 9.0	2.54	0.99	35.69	71.71
pH 11.8	2.13	0.83	28.57	68.11

Tratamiento C (2.1.4).

pH 3.0	5.02	1.96	48.75	81.27
pH 5.0	4.20	1.64	46.99	82.80
pH 7.0	4.12	1.61	45.16	76.20
pH 9.0	2.79	1.09	41.79	78.97
pH 11.8	2.49	0.97	39.80	69.94

Tratamiento D (2.1.4).

	4.07	1.59	40.43	78.48
--	------	------	-------	-------

Tratamiento E (2.1.4).

	4.61	1.80	41.57	99.67
--	------	------	-------	-------

Tratamiento F (2.1.4).

	ARN (%)	Ribosa (%)	Proteína (%)	Recuperación de biomasa (%)
NaCl	5.38	2.10	50.00	95.80
NaNC ₃	4.69	1.83	48.17	89.18
NaClO ₄	3.84	1.50	38.79	86.73
NaCl ₃ CCOO	2.97	1.16	40.00	90.92

3.1.4.3 Medio de propagación 2 (a base de melazas-sales Q.P.)

Tratamiento A.

pH 3.0	2.95	1.15	49.12	73.13
pH 5.0	2.59	1.01	51.90	93.73
pH 7.0	2.54	0.99	40.52	87.90
pH 9.0	2.54	0.99	40.52	64.13
pH 11.8	2.15	0.84	32.90	64.15

Tratamiento B.

pH 3.0	3.25	1.27	47.37	84.37
pH 5.0	3.23	1.26	48.23	85.27
pH 7.0	3.20	1.25	47.39	87.38
pH 9.0	2.95	1.15	42.24	66.19
pH 11.8	2.59	1.01	40.52	59.54

Tratamiento C.

	ARN (%)	Ribosa (%)	Proteína (%)	Recuperación de biomasa (%)
pH 3.0	3.43	1.34	50.60	77.59
pH 5.0	3.33	1.30	45.57	83.42
pH 7.0	3.18	1.24	44.58	94.37
pH 9.0	2.72	1.06	41.46	90.95
pH 11.8	2.46	0.96	40.85	76.64

Tratamiento D.

	2.84	1.11	43.05	86.09
--	------	------	-------	-------

Tratamiento E.

	4.69	1.83	44.57	90.05
--	------	------	-------	-------

Tratamiento F.

NaCl	4.41	1.72	49.70	95.18
NaNO ₃	4.38	1.71	49.39	96.46
NaClO ₄	3.82	1.49	45.06	93.04
NaCl ₃ CCOO	3.71	1.45	41.15	95.17

3.1.4.4 Medio de propagación 3 (a base de melazas-fertilizantes químicos)

Tratamiento A.

	ARN (%)	Ribosa (%)	Proteína (%)	Recuperación de biomasa (%)
pH 3.0	3.82	1.49	46.17	92.10
pH 5.0	3.56	1.39	47.58	87.03
pH 7.0	3.46	1.35	46.84	90.20
pH 9.0	3.20	1.25	42.99	86.92
pH 11.8	2.46	0.96	40.12	83.40

Tratamiento B.

pH 3.0	3.56	1.39	50.70	86.75
pH 5.0	2.97	1.16	50.00	85.73
pH 7.0	2.66	1.04	42.42	90.25
pH 9.0	2.74	1.07	40.00	91.07
pH 11.8	2.28	0.89	35.42	86.22

Tratamiento C.

pH 3.0	3.38	1.32	44.45	99.07
pH 5.0	3.18	1.24	41.05	98.44
pH 7.0	2.95	1.15	42.42	99.07
pH 9.0	2.72	1.06	41.82	88.03
pH 11.8	2.38	0.93	39.10	75.33

Tratamiento D.

ARN (%)	Ribosa (%)	Proteína (%)	Recuperación de biomasa (%)
3.43	1.34	43.25	64.63

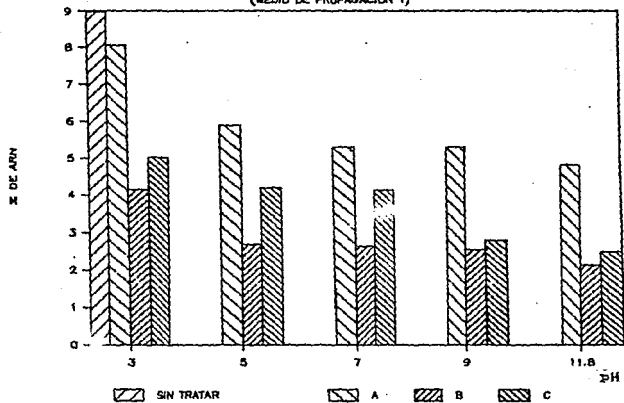
Tratamiento E.

3.61	1.41	42.43	73.25
------	------	-------	-------

Tratamiento F.

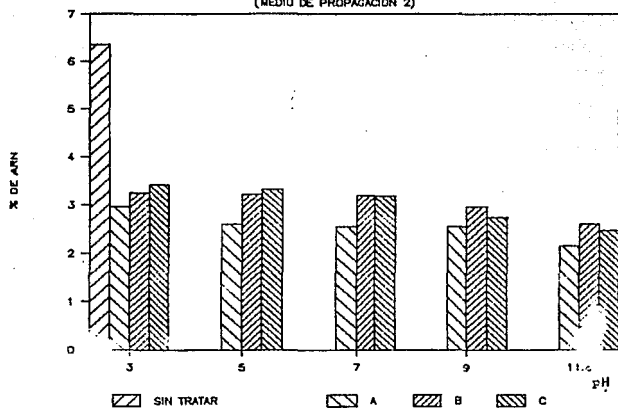
NaCl	3.74	1.46	45.05	80.12
NaNO ₃	3.43	1.34	44.23	77.00
NaClO ₄	3.28	1.28	41.58	73.34
NaCl ₃ CCOO	1.00	0.39	45.83	62.01

CONTENIDO DE ARN EN CELULAS (MEDIO DE PROPAGACION 1)

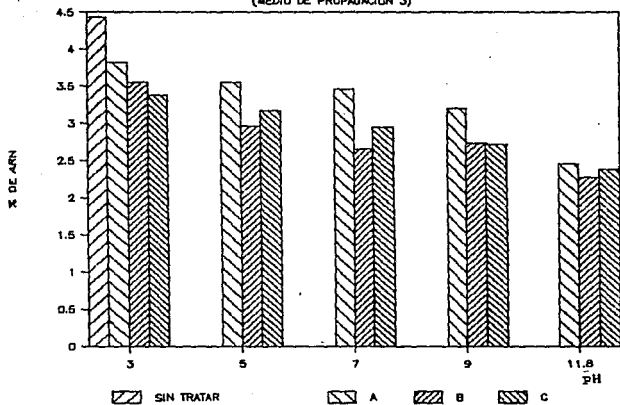


CONTENIDO DE ARN EN CELULAS

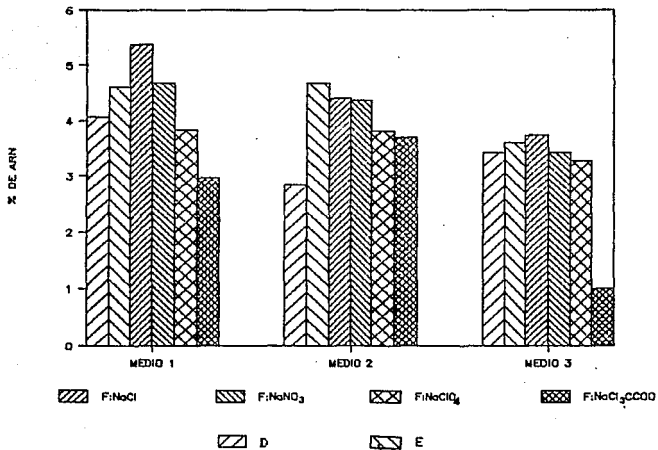
(MEDIO DE PROPAGACION 2)



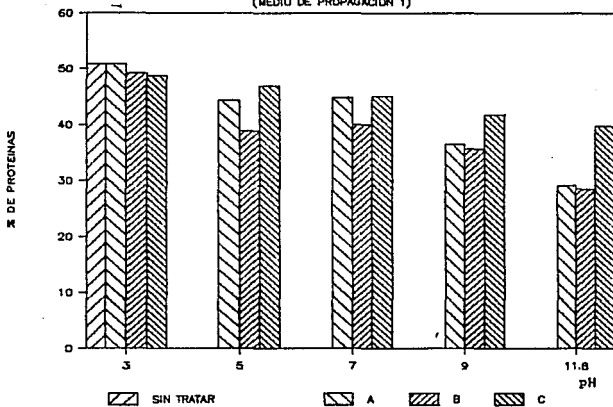
CONTENIDO DE ARN EN CELULAS (MEDIO DE PROPAGACION 3)



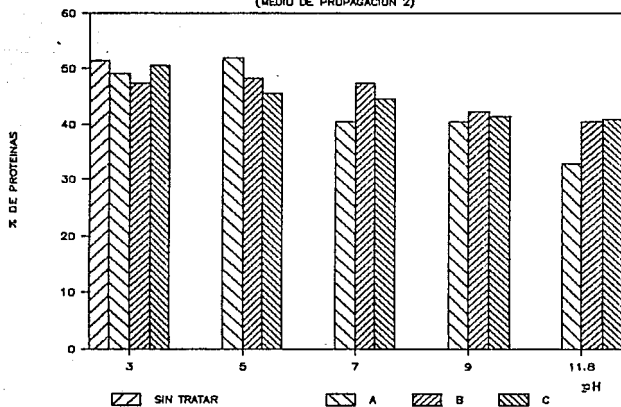
CONTENIDO DE ARN EN CELULAS



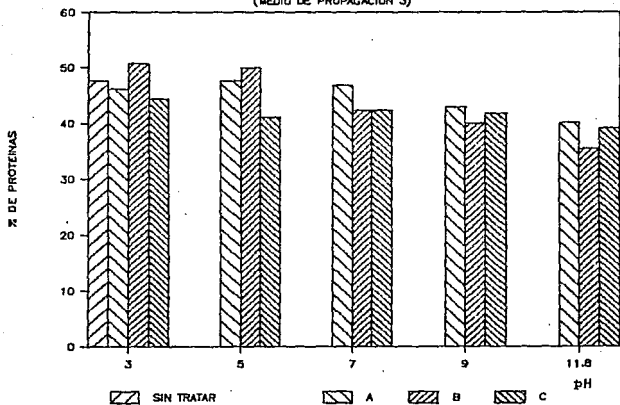
CONTENIDO DE PROTEINAS EN CELULAS (MEDIO DE PROPAGACION 1)



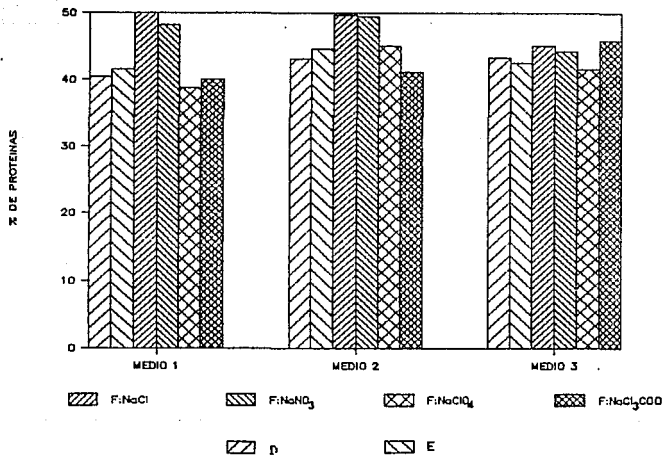
CONTENIDO DE PROTEINAS EN CELULAS (MEDIO DE PROPAGACION 2)



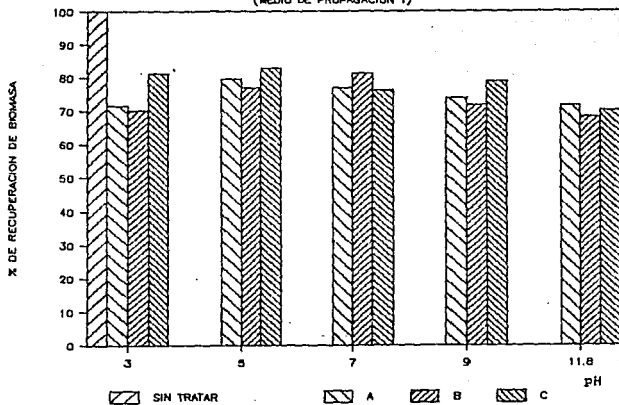
CONTENIDO DE PROTEINAS EN CELULAS (MEDIO DE PROPAGACION 3)



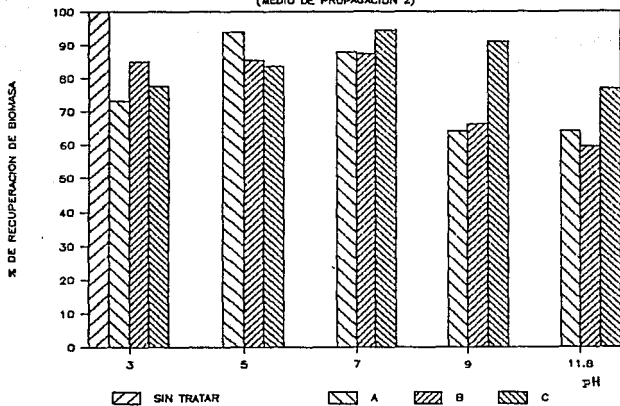
CONTENIDO DE PROTEINAS



RECUPERACION DE BIOMASA (MEDIO DE PROPAGACION 1)

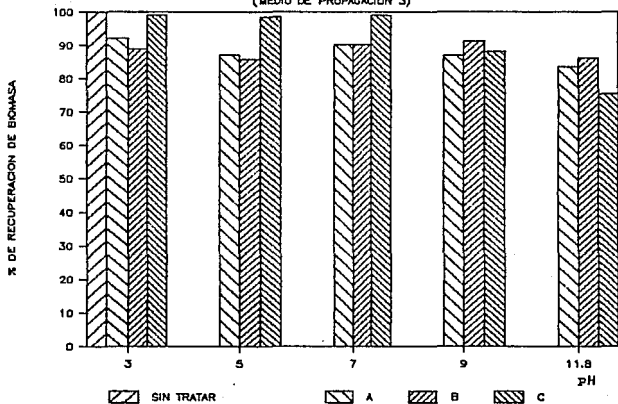


RECUPERACION DE BIOMASA (MEDIO DE PROPAGACION 2)

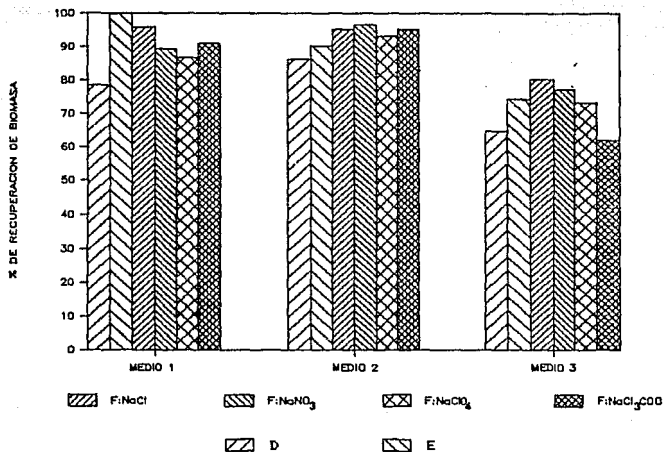


RECUPERACION DE BIOMASA

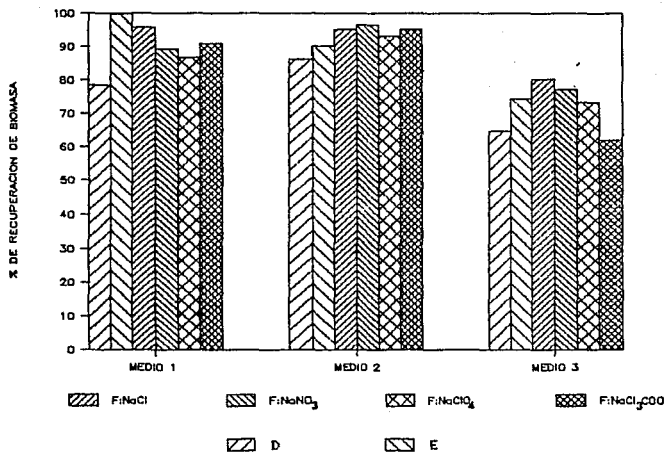
(MEDIO DE PROPAGACION 3)



RECUPERACION DE BIOMASA



RECUPERACION DE BIOMASA



3.2 DISCUSION DE LOS RESULTADOS

3.2.1 Los resultados indican que las características microscópicas, culturales y bioquímicas corresponden a las descritas para *Torulopsis hydromelitis* (31,42,43), corroborándose que la cepa proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM corresponde al género y especie indicados.

3.2.2 Respecto a la influencia de los medios nutritivos sobre el crecimiento y composición química de la levadura en estudio, se comprobaron los resultados obtenidos en investigaciones previas. Se observó que para el medio a base de sacarosa el peso seco es menor que para los medios a base de melazas, aunque el contenido de proteínas es similar, en tanto que el contenido de ácidos nucleicos se redujo considerablemente en los medios a base de melazas. En este sentido, es bien conocido que la composición química del medio de cultivo afecta a la composición química del microorganismo que en él se cultiva (34), y aun cuando en la literatura consultada acerca de los métodos de reducción de ácidos nucleicos en levaduras no se menciona este factor, los resultados obtenidos indican que esto podría ser de gran utilidad para la producción de PUC.

Esto es importante, porque al pensar en un cultivo masivo a nivel planta piloto o industrial, cuanto menor sea el contenido de ARN que sea necesario reducir, se obtendrán niveles menores de él y darán una mejor calidad del producto proteico que se obtenga además el tratamiento será más económico.

Las características observadas en *Torulopsis hydromelitis* coinciden con los resultados informados en trabajos previos (7,16,25,31) y confirman las ventajas que esta levadura presenta para ser utilizada en la producción de PUC. Estas características son:

- Buen tamaño de las células (6 x 9 micras), el cual permite que los procedimientos para la separación del medio de cultivo, una vez terminada la fase de desarrollo celular de la levadura, se faciliten.
- Tiempo de desarrollo, el cual es mínimo (36 y 48 horas, según el medio de cultivo), lo que lleva a que el proceso de obtención de biomasa sea rápido.
- Contenido de proteínas elevado (alrededor del 50 %), el que es superior a los contenidos informados para *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis*, los cuales fluctúan entre 41 y 43 % (6).
- Contenido de ácidos nucleicos aceptable.

Por otra parte se tiene que la buena adaptación a medios de cultivo a base de melazas de caña de azúcar, los cuales al ser económicos en nuestro país, representan una buena opción para el

cultivo de esta levadura, por lo que se recomienda el estudio de este proceso a nivel planta piloto y, posteriormente, a nivel industrial.

Como pueda observarse en los resultados, la levadura cultivada en el medio que contenía sacarosa tiene un porcentaje más alto de ribosa y, por lo tanto, de ARN, que la levadura crecida en los medios con melazas. En lo referente a la cantidad de proteínas, éstas son menores en la levadura cultivada en el medio de melazas y fertilizantes químicos, sin embargo el nivel de ribosa y ARN también es menor al de los otros medios, pero se considera que las proteínas están en una cantidad bastante aceptable.

Los resultados presentados indican que las células provenientes de distintos medios de cultivo presentan una susceptibilidad diferente a los tratamientos de reducción de ARN. En general, se observa que las células cultivadas en medio de sacarosa presentaron mayores porcentajes de reducción de ARN, pero también hubo mayores pérdidas de proteínas y biomasa. Las células crecidas en melazas y sales O.P. tuvieron porcentajes de reducción de ARN y pérdidas de biomasa y proteínas intermedios. Y la levadura crecida en el medio de melazas y fertilizantes químicos tuvo los menores porcentajes de reducción y pérdidas; a excepción de los porcentajes de pérdidas de biomasa obtenidos después de aplicar los tratamientos D, E y F; esto, tal vez, pudiera deberse a que, durante la manipulación física de las células usadas en estos últimos tratamientos, pudo haberse perdido algo de biomasa en el proceso de secado; lo que deberá comprobarse en trabajos posteriores.

En general, los resultados anteriores quizá puedan ser explicados sobre la base de la resistencia de la pared celular (2,3), lo cual se manifiesta de modo que, a mayor porcentaje de reducción de ARN hay mayores pérdidas de biomasa y proteínas. Así, posiblemente, las células cultivadas en sacarosa tienen una pared celular menos resistente que las células crecidas en melazas.

3.2.3 Los tratamientos para la reducción de ARN por lo general, se basan en la exposición de las células microbianas a choques térmicos, condiciones de pH, temperatura, tiempos variables y adición de sustancias químicas, etc.

Así, en este trabajo se pretendió aplicar algunos de estos tratamientos para observar si hay variaciones, o no, en la composición química, en cuanto a contenido de ARN y de proteínas, de la levadura *Torulopsis hydromelitis*, para determinar si es posible que este microorganismo pudiera usarse como fuente de PUC para consumo humano, una vez que se le redujera su contenido de ARN.

Por lo que se refiere a los tratamientos donde se aplicó el choque térmico seguido de un calentamiento a menor temperatura, los resultados indican que el efecto del pH juega un papel muy

importante, porque conforme aumenta el valor de pH hay mayor reducción de ARN, pero esto también se manifiesta en el incremento de la pérdida de biomasa y proteínas. Probablemente, esto se explica porque mientras ocurre la degradación química del ARN por aumento del pH y la temperatura, también se debe a la actividad de ribonucleasas intracelulares, porque, si bien, éstas son activadas al inicio del tratamiento, por efecto del choque térmico (27,29,33,35,36) debido al tiempo prolongado de calentamiento y al aumento de pH, estas enzimas pueden inactivarse (2,3); además, puede existir una degradación química de las proteínas y otros compuestos intracelulares, lo que se manifiesta en las pérdidas de biomasa y proteínas. Sin embargo, en algunos casos (medio 2, tratamiento A, pH 5; medio 2, tratamiento C, pH 3; medio 3, tratamiento B, pH 3 y 5), se observa un aumento en la cantidad de proteínas, lo cual puede deberse a un aumento en el patrón de aminoácidos libres (35,36,49).

Por otro lado, se observan variaciones en lo referente a las soluciones utilizadas para suspender a las levaduras; así, para las células cultivadas en los medios de propagación 1 y 3 hubo mayor reducción de ARN al suspender las células en Na_2HPO_4 0.05 M; mientras que para las células cultivadas en el medio de propagación 2 hubo mejores resultados al suspenderlas en agua. Al suspender en NaCl 3 % la reducción de ARN se manifiesta de manera intermedia entre los resultados obtenidos para Na_2HPO_4 y agua. Se obtuvo un mayor porcentaje de reducción de ARN al suspender en Na_2HPO_4 , las células cultivadas en el medio de propagación 1, y el menor porcentaje se obtuvo al suspender las células cultivadas en el medio de propagación 3 en agua. Las pérdidas de biomasa y proteínas fueron proporcionales a la reducción de ARN en la mayoría de los casos.

Lo anterior probablemente se explica porque el NaCl, al igual que el Na_2HPO_4 como amortiguador, actúan protegiendo a las ribonucleasas intracelulares y no activándolas (27,28), pero esta protección es limitada al prolongar el tiempo de calentamiento a pH alcalino, ya que el intervalo de pH al que presentan mayor actividad las ribonucleasas es a valores de 5 a 7 y, puede observarse que no hubo tanta reducción en estos valores de pH, porque las ribonucleasas disminuyen su actividad a los pocos minutos de calentamiento a pH alcalino (27,28). Se puede pensar que la reducción de ARN no depende tanto de la actividad de ribonucleasas intracelulares que pudieran activarse por efecto de sales o amortiguadores, cuando se aplican choque térmico y calentamiento prolongado, sino a una degradación química dependiente del pH y la temperatura (1,19).

Al aplicar el tratamiento de suspensión en NH_4OH 4.5 % y calentamiento a 65°C , puede observarse que hubo reducción de ARN en forma moderada y puede deberse, al igual que en los tratamientos anteriores, a una degradación química del ARN y las proteínas por efecto del pH y la temperatura, más que por una degradación enzimática. Pero, probablemente, la resistencia de la pared celular de las células no permite que exista mayor liberación de los productos de degradación. Además, el tiempo de

calentamiento es más reducido y la liberación de los productos de hidrólisis pudiera no efectuarse completamente.

En el tratamiento de suspensión en NaCl 3% y calentamiento a 50° C a pH 5.5, parámetros de óptima actividad de las ribonucleasas (27,28), se observa una reducción de ARN y pérdidas de proteínas, menores, respecto a los tratamientos anteriores, porque en este caso, la reducción sí puede deberse a la actividad de ribonucleasas intracelulares, pero como estas enzimas se encuentran en compartimientos celulares y el tratamiento se aplicó a células enteras, la actividad enzimática es limitada. Esto no ocurre cuando se emplean células desintegradas, ya que las ribonucleasas son liberadas durante el rompimiento celular y pueden actuar de manera más directa (47). Además, puede verse limitada la actividad de otras enzimas por la misma estructura de compartimientos celulares, así como por la reducción en los tiempos de calentamiento, lo que evita pérdidas mayores de biomasa y proteínas.

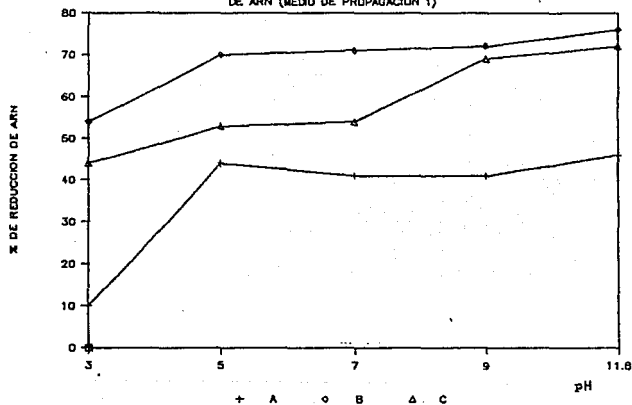
Al aplicar el tratamiento en el que se usaron distintas sales, también se observa una reducción limitada de ARN, lo que puede deberse a que al usar células enteras, no se permitió el contacto directo de los aniones con los complejos de nucleoproteínas, para destruirlos, que es la manera como se sugiere que actúan estas sales (11); esto se observa adicionalmente en las pérdidas de biomasa y proteínas. En dos de los tres casos estudiados, al usar NaCl₃CCOO se obtuvo una reducción considerable de ARN, pero también hubo mayores pérdidas de proteínas; esto, tal vez, se deba a que durante la manipulación de las células, de alguna manera se afectó la integridad de la pared celular y esto permitió un contacto más directo entre los aniones y los complejos de nucleoproteínas, lo que se tradujo en mayores porcentajes de reducción de ARN y pérdidas de proteínas. En este caso, el empleo de NaClO₄ y NaCl₃CCOO fue más efectivo que el de NaCl y NaNO₂, lo que concuerda con los resultados de la literatura (12).

3.2.5 Aunque se obtuvieron buenos porcentajes de reducción de ARN en los tratamientos con choques térmicos seguidos de calentamiento a menor temperatura y a pH alcalino, hubo mayores pérdidas de biomasa y proteínas, lo que no es deseable si se pretende obtener un producto con un alto contenido de proteínas.

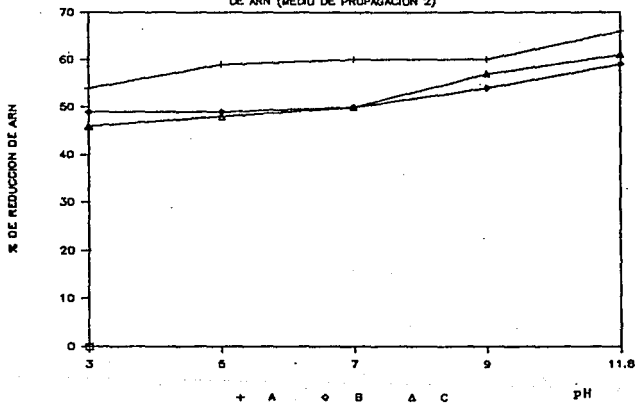
En general, puede considerarse que el tratamiento más efectivo fue en el que se usaron sales, en especial NaClO₄ y NaCl₃CCOO, porque no sólo se lograron mayores porcentajes de reducción de ARN, sino que hubo pérdidas menores de proteínas y biomasa. Aunado esto al hecho de que al no usar choques térmicos o temperaturas de calentamiento por tiempos prolongados pudo evitarse que se produjeran cambios indeseables en la disponibilidad biológica de las proteínas, o una mayor hidrólisis de éstas; esto permite que sea más factible usar este procedimiento a nivel industrial, al no tener que usar intercambiadores de calor y, porque las sales empleadas pueden recuperarse y reciclarse (12).

3.2.6 Aunque se obtuvieron reducciones importantes en el contenido de ARN al aplicarse distintos tratamientos; al comparar los resultados con lo informado por la literatura, se ve que los porcentajes de reducción no son tan altos como los que se informan en la bibliografía consultada. Esto, probablemente, se debe a que, en todos los casos, se usaron células enteras y no desintegradas y, esto, seguramente, influye de manera significativa al no actuar los tratamientos de manera más directa sobre el ARN. Por otra parte, también puede pensarse que esta levadura es menos susceptible, por ejemplo, a los choques térmicos que las levaduras que tradicionalmente se han usado como fuentes de PUC y que son con las que se ha trabajado para probar los métodos de reducción del ARN.

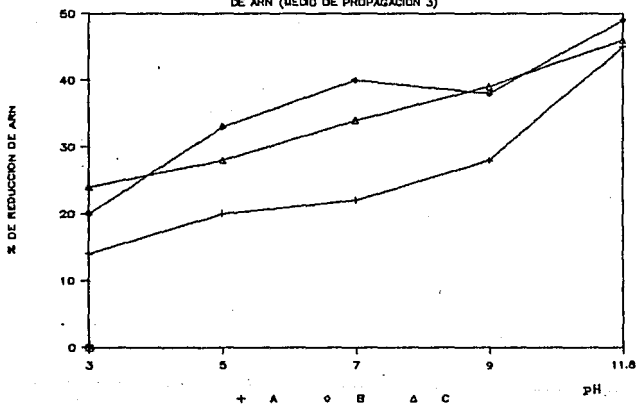
INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA REDUCCION DE ARN (MEDIO DE PROPAGACION 1)



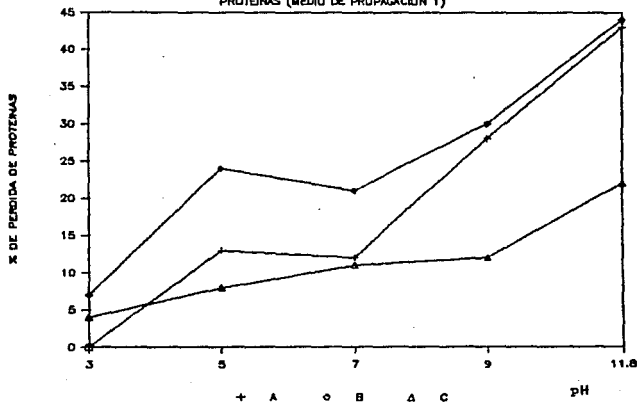
INFLUENCIA DE pH SOBRE LA REDUCCION DE ARN (MEDIO DE PROPAGACION 2)



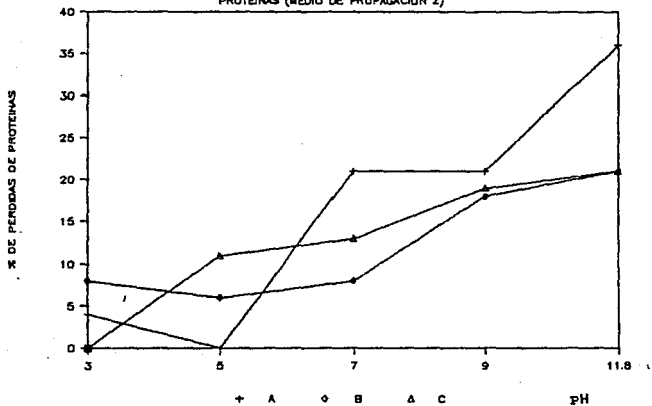
INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA REDUCCION DE ARN (MEDIO DE PROPAGACION 3)



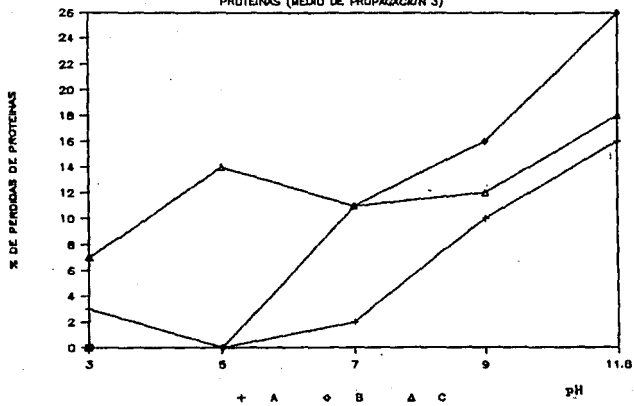
EFFECTO DEL pH SOBRE LAS PERDIDAS DE
PROTEINAS (MEDIO DE PROPAGACION 1)



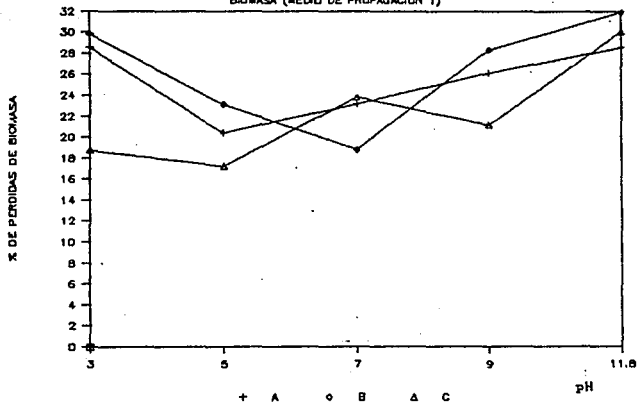
EFFECTO DEL pH SOBRE LAS PERDIDAS DE
PROTEINAS (MEDIO DE PROPAGACION 2)



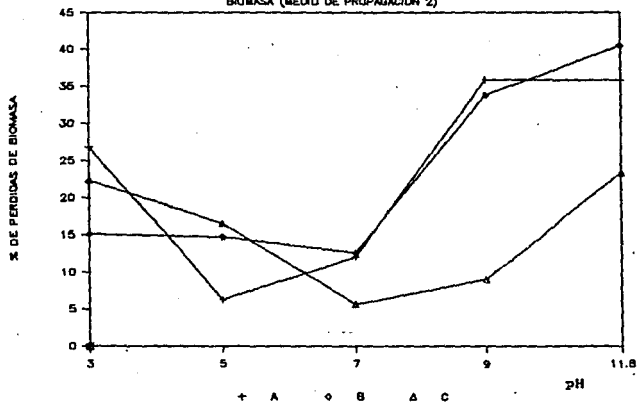
EFFECTO DEL pH SOBRE LAS PERDIDAS DE PROTEINAS (MEDIO DE PROPAGACION 3)



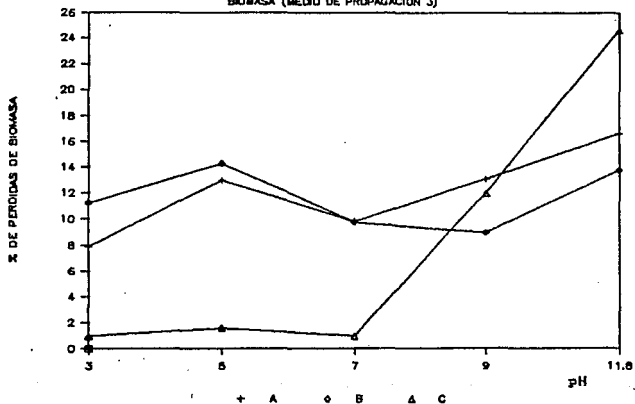
EFFECTO DEL pH SOBRE LAS PERDIDAS DE
BIOMASA (MEDIO DE PROPAGACION 1)



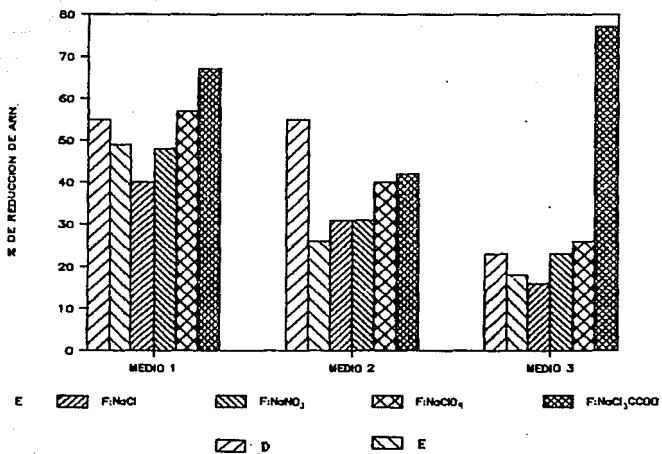
EFFECTO DEL pH SOBRE LAS PERDIDAS DE
BIOMASA (MEDIO DE PROPAGACION 2)



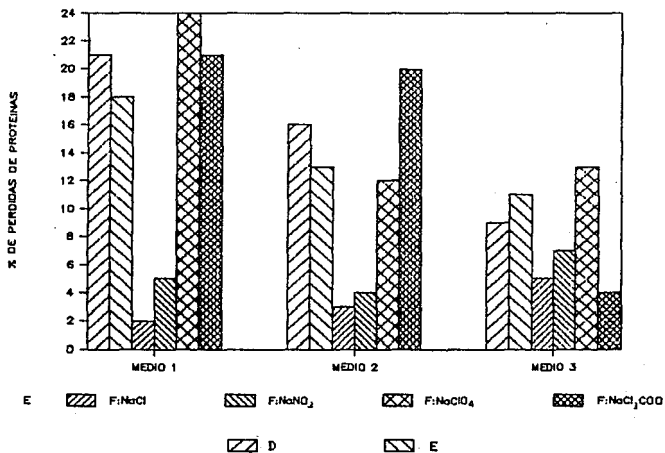
EFFECTO DEL pH SOBRE LAS PERDIDAS DE BIOMASA (MEDIO DE PROPAGACION 3)



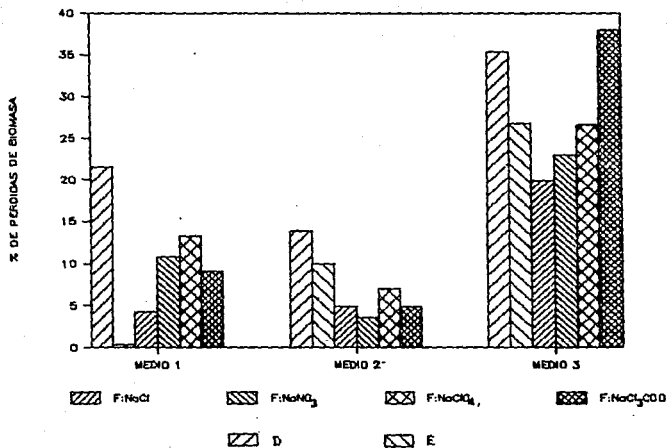
PORCENTAJE DE REDUCCION DE ARN



PORCENTAJES DE PERDIDAS DE PROTEINAS



PORCENTAJES DE PERDIDAS DE BIOMASA



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se encontró que el mejor tratamiento de reducción de ARN es aquél en el que se emplearon sales como NaClO_4 y NaCl_2CCOO , porque se obtuvieron, adicionalmente, menores pérdidas de biomasa y proteínas, además de que no es necesario emplear condiciones drásticas de pH ni de temperatura, lo cual se traduce en la obtención de un producto de alta calidad; por otro lado, al disminuir el uso de equipo costoso, que sería necesario para calentamientos a diferentes temperaturas, se tendría un proceso más económico, si se piensa en una producción a nivel industrial, y se lograría tener un producto que tuviera un precio accesible para la población que más lo necesita. Además existe la ventaja de que esta levadura puede producirse en medios de cultivo muy económicos formulados con melazas de caña de azúcar y sales químicas utilizadas como fertilizantes químicos en el agro, y que son producidas a gran escala en nuestro país; y además mostró el menor porcentaje de ARN, al ser desarrollada en estos medios.

Se propone que se continúe con la experimentación de los métodos de reducción de ARN, especialmente con el uso de NaClO_4 y NaCl_2CCOO , y medios de cultivo a base de melazas y fertilizantes químicos, por ser los de más bajo costo; pero será necesario usar células desintegradas de *Torulopsis hydromytilis* para determinar si la efectividad de los tratamientos aumenta y se puede obtener PUC con un contenido más bajo de ARN. También puede experimentarse con tratamientos en los que se usen valores de pH menores a 3 para observar si también es posible obtener un alto porcentaje de reducción de ARN, ya sea con o sin choques térmicos. Aunque es preferible usar métodos en los que no sea necesario emplear condiciones muy drásticas que pudieran causar un deterioro de la calidad de las proteínas de la levadura.

Podría intentarse recuperar los productos de hidrólisis del ARN, por que, si bien, no se hizo en este trabajo, esto pudiera ser un factor muy importante que contribuiría a la economía del proceso si se obtienen productos de degradación de ARN que pueden venderse a buen precio para la producción de potenciadores de sabor para la industria alimentaria.

Se concluye que esta levadura, *Torulopsis hydromytilis*, presenta buenas características para que en un futuro, mediante los tratamientos adecuados, pueda usarse como fuente de PUC; debido a que, en principio, tiene una proteína de buena calidad para el consumo humano y, además, es consumida de manera habitual en el pulque, como parte de la microflora de éste, por un sector importante de la población en México; lo que lleva a pensar que sería un buen recurso como fuente de proteína para complementar la alimentación humana, en especial de las clases de pocos recursos económicos, las cuales son las que presentan los problemas más graves de desnutrición.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Alvarez, R.; Agustín, J.A.; Halama, D.
"REDUCCION DEL CONTENIDO DE ACIDOS NUCLEICOS
Saccharomyces cerevisiae (levadura panadera) POR TRATA-
MIENTO TERMICO".
Rev. Cienc. Biol. 13 (1), 37 (1982).
2. Alvarez, R.; Enríquez, A.
"TRATAMIENTO TERMICO PARA LA REDUCCION DE ACIDOS
NUCLEICOS EN LEVADURA".
Rev. Cienc. Biol. 15 (1), 59 (1984).
3. Alvarez, R.; Enríquez, A.
"NUCLEIC ACID REDUCTION IN YEAST".
Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 208 (1988).
4. Bell, G.H.
FISIOLOGIA QUIMICA Y BIOLOGICA.
Ed El Ateneo, S.A. 1a. ed. esp.
Argentina 1960.
5. Bhattacharjee, J.K.
"MICROORGANISMS AS POTENTIAL SOURCES OF FOOD" en
Advances in Applied Microbiology 13, 139.
Academic Press. Great Britain 1970.
6. Bueno, G.E.; Otero, M.A.; Klibansky, M.M.; González, A.C.
"NUCLEIC ACID REDUCTION FROM YEAST ACTIVATION OF
INTRACELLULAR RNase".
Acta Biotechnol. 5 (1), 91 (1985).
7. Calderón Martínez, S.; Loarca Ramírez, P.
"AISLAMIENTO, PURIFICACION Y ALGUNOS ASPECTOS BIOQUIMICOS
DE LAS LEVADURAS *Pichia barrazani*, *Torulopsis aquamellii*
y *Saccharomyces cerevisiae*".
Tesis Fac. Química. UNAM 1980.
8. Canepa, A.; Pieber, M.; Romero, C.; Toha, J.C.
"A METHOD FOR LARGE REDUCTION OF THE NUCLEIC ACID CONTENT
OF YEAST".
Biotech. Bioeng. 16, 173 (1972).
9. Castro, A.C.; Sinsky, A.J.; Tannenbaum, S.R.
"REDUCTION OF NUCLEIC CONTENT IN *Candida utilis* YEAST
CELLS BY BOVINE PANCREATIC RIBONUCLEASE A TREATMENT".
Appl. Microbiol. 22 (3), 422 (1971).
10. Damodaran, S.; Kinsella, J.E.
"STABILIZATION OF PROTEINS BY SOLVENTS".
J. Biol. Chem. 255 (18), 8503 (1980).

11. Damodaran, S.; Kinsella, J.E.
"THE EFFECTS OF NEUTRAL SALTS ON THE STABILITY FOR
MACROMOLECULES".
J. Biol. Chem. 256 (7), 3394 (1981).
12. Damodaran, S.; Kinsella, J.E.
"THE USE OF CHAOTROPIC SALTS FOR SEPARATION OF
RIBONUCLEIC ACIDS AND PROTEINS FROM YEAST NUCLEOPROTEINS".
Biotech. Bioeng. 25, 761 (1983).
13. Davis, D.B.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S.;
Wood, W.B.
TRATADO DE MICROBIOLOGIA.
Salvat Ed., S.A. 2a. ed.
España 1978.
14. De la Torre, M.; Flores Cotera, L.E.
"PROTEINAS UNICELULARES" en
Biotecnología alimentaria. Programa Universitario de
Alimentos (PUAL). UNAM 1989.
15. Edozien, J.C.; Udo, U.U.; Young, V.R.; Srinizhaw, N.S.
"EFFECTS OF HIGH LEVELS OF YEAST FEEDING ON URIC ACID
METABOLISM OF YOUNG MEN".
Nature 228, 180 (1970).
16. Enríquez Freire, J.E.; González Márquez, M.L.; Urbina
Sánchez, L.E.
"DESARROLLO DE LEVADURAS DEL AGUAMIEL Y PULQUE EN
DIFERENTES SUSTRATOS ORGANICOS DE DESECHO".
Tesis. Fac. Química. UNAM 1985.
17. Frobisher, M.; Fuerst, R.
MICROBIOLOGIA.
Ed. Interamericana, S.A. 13a. ed.
México 1976.
18. Gierhart, D.L.; Potter, N.N.
"EFFECTS OF RIBONUCLEIC ACID REMOVAL METHODS ON
PROTEOLYTIC ACTIVITY AND PROTEIN SOLUBILITY IN *Candida
utilis*".
Biotech. Bioeng. 21, 1963 (1979).
19. Gómez Hernández, J.; Viniegra González, G.
"EXTRACCION DEL ACIDO RIBONUCLEICO (ARN) DE *Saccharomyces
cerevisiae* EN CONDICIONES ALCALINAS SUAVES".
Rev. Soc. Quím. Mex. 21, 97 (1977).
20. Hedenskog, G.; Ebbinghaus, L.
"REDUCTION OF THE NUCLEIC ACID CONTENT OF SINGLE-CELL
PROTEIN CONCENTRATES".
Biotech. Bioeng. 14, 447 (1972).

21. Hedenskog, G.; Mogren, H.
"SOME METHODS FOR PROCESSING OF SINGLE-CELL PROTEIN".
Biotech. Bioeng. 15, 129 (1973).
22. Herbert, D.; Phipps, P.J.; Strange, R.E.
"CHEMICAL ANALYSIS OF MICROBIAL CELLS" en
Methods in Microbiology 5B, 209.
J.R. Norris, D.N. Ribbons Ed.
Academic Press. Great Britain 1972.
23. Huang, Y.Y.; Kinsella, J.E.
"PHOSPHORYLATION OF YEAST PROTEIN: REDUCTION OF
RIBONUCLEIC ACID AND ISOLATION OF YEAST PROTEIN
CONCENTRATE".
Biotech. Bioeng. 28, 1690 (1986).
24. Kihlberg, R.
"THE MICROBE AS A SOURCE OF FOOD" en
Annual Review of Microbiology 26, 427
Academic Press. Great Britain 1972.
25. Lemoine Mendoza, B.; Rodríguez Uribe, I.
"EVALUACION QUIMICA Y BIOLOGICA DE LEVADURAS AISLADAS DEL
PULQUE COMO RECURSO PROTEICO EN ALIMENTACION".
Tesis. Fac. Quimica. UNAM 1976.
26. Leningher, A.L.
BIOQUIMICA. LAS BASES MOLECULARES DE LA ESTRUCTURA Y LA
FUNCION CELULAR.
Ed. Omega, S.A. 2a. ed.
España 1979.
27. Lindblom, M.; Mogren, H.
"ENZYMATIC RNA REDUCTION IN DISINTEGRATED CELLS OF
Saccharomyces cerevisiae".
Biotech. Bioeng. 16, 1123 (1974).
28. Lindblom, M.
"PROPERTIES OF INTRACELLULAR RIBONUCLEASE UTILIZED FOR
RNA REDUCTION IN DISINTEGRATED CELLS OF *Saccharomyces
cerevisiae*".
Biotech. Bioeng. 19, 199 (1977).
29. Mátrai, B.; Halász, A.
"REDUCTION OF NUCLEIC ACID CONTENT IN *Saccharomyces
cerevisiae*".
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 19, 120 (1984).
30. Maul, S.B.; Sinskey, A.J.; Tannenbaum, S.R.
"NEW PROCESS FOR REDUCING THE NUCLEIC ACID CONTENT OF
YEAST".
Nature 228, 181 (1970).

31. Meymar Lorenzo, O.A.; Vargas García, M.G.
"OBTENCION DE UN CONCENTRADO PROTEICO PARA ALIMENTACION DE GANADO MAYOR A PARTIR DE DOS LEVADURAS AISLADAS DEL AGUAMIEL".
Tesis. Fac. Química. UNAM 1990.
32. Murray, R.K.; Mayes, P.A.; Ganner, D.K.; Rodwell, V.W.
BIOQUIMICA DE HARPER.
Ed. El Manual Moderno, S.A. 11a. ed.
México 1988.
33. Ohta, S.; Maul, S.B.; Sinskey, A.J.; Tannenbaum, S.R.
"CHARACTERIZATION OF A HEAT-SHOCK PROCESS FOR REDUCTION OF THE NUCLEIC ACID CONTENT OF *Candida utilis*".
Appl. Microbiol. 22 (3), 415 (1971).
34. Pepler, J.H.
"FOOD YEAST" en THE YEAST por Rose, A.H.; Harrison, J.S.
Vol. 3
Academic Press. Great Britain 1970.
35. Petkov, P.; Tuleva, B.; Balasheva, M.; Pancheva, R.
"COMPARATIVE STUDIES ON THE REDUCTION OF THE NUCLEIC ACID IN INTACT *Saccharomyces cerevisiae* CELLS BY DIFFERENT METHODS AND THEIR INFLUENCE ON PROTEIN CONTENT".
Acta Microbiol. Bulg. 8, 78 (1981).
36. Petkov, P.; Tuleva, B.; Balasheva, M.
"REDUCTION OF NUCLEIC ACID QUANTITIES IN INTACT *Saccharomyces cerevisiae* CELLS BY CHEMICAL SUBSTANCES".
Acta Microbiol. Bulg. 9, 54 (1981).
37. Prescott, C.S.; Dunn, G.C.
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL.
Ed. Aguilar, S.A. 3a. ed.
España 1962.
38. Quintero Ramírez, R.
INGENIERIA BIOQUIMICA. TEORIA Y APLICACIONES.
Ed. Alhambra.
México 1981.
39. Quintero, R.; Cartucho, P.; Alcantara, L.
"LA BIOTECNOLOGIA, LOS ALIMENTOS Y EL FUTURO" en LA ALIMENTACION DEL FUTURO por Carvajal Moreno, R.; Vergara Cabrera, J.M. Tomo III.
UNAM 1987.
40. Rodnan, G.P.
"GOUT".
J. Am. Med. Ass. (JAMA) 224 (5), 757 (1973).

41. Rosales, F.H.
"YEAST AS PROTEIN SOURCE FOR HUMAN NUTRITION".
Acta Microbiol. Hung. 31 (3), 159 (1984).
42. Ruiz Oronoz, M.
"CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LAS LEVADURAS DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE III. *Torulopsis hydrocometitis*".
Anales del Instituto de Biología XI. UNAM 1940.
43. Ruiz Oronoz, M.
"METODOS DE ESTUDIO Y CLASIFICACION DE LAS PRINCIPALES LEVADURAS DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE".
Tesis. Fac. Ciencias. UNAM 1942.
44. Ruiz Oronoz, M.
"ESTUDIOS REALIZADOS EN MEXICO SOBRE LEVADURAS".
Anales del Instituto de Biología XXIII. UNAM 1952.
45. Shetty, K.J.; Kinsella, J.E.
"PREPARATION OF YEAST PROTEIN ISOLATE WITH LOW NUCLEIC ACID BY SUCCINYLATION".
Biotech. Bioeng. 20, 755 (1978).
46. Shetty, J.K.; Weaver, R.C.; Kinsella, J.E.
"RIBONUCLEASE ISOLATED FROM YEAST (*Saccharomyces carlsbergensis*): CHARACTERIZATION AND PROPERTIES".
Biotech. Bioeng. 23, 953 (1981).
47. Snyder, H.E.
"MICROBIAL SOURCES OF PROTEIN".
Advances of Food Research 18, 85 (1970).
48. Solomons, G.L.
MATERIAL AND METHODS IN FERMENTATION.
Academic Press.
USA 1969.
49. Tajima, M.; Takahashi, H.
"REDUCTION OF NUCLEIC ACID CONTENT IN YEAST CELLS (*Candida utilis*) BY HEAT-SHOCK PROCESS".
Rep. Natl. Food Res. Inst. 39, 77 (1982).
50. Tietz, W.N.
QUIMICA CLINICA MODERNA.
Nueva Editorial Interamericana.
México 1972.
51. Valázquez Corona, J.R.
"PRODUCCION DE MONONUCLEOTIDOS DE LEVADURA POR MEDIO DE LA DEGRADACION ESPECIFICA DE ARN".
Tesis. Fac. Química. UNAM 1978.

52. Yokozawa, T.; Oura, M.; Zheng, P.D.; Fukase, M.;
Koizumi, F.
"METABOLIC EFFECTS OF DIETARY PURINE AND PYRIMIDINE BASES
IN RATS".
Agric. Biol. Chem. 47 (6), 1297 (1983).
53. Zee, J.A.; Simard, R.E.
"SIMPLE PROCESS FOR THE REDUCTION IN THE NUCLEIC ACID
CONTENT IN YEAST".
Appl. Microbiol. 29 (1), 59 (1975).

APENDICES

APENDICE 1

MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

Medio de Conservación (31).

Melaza de caña (10 % en peso de azúcares reductores totales)	100 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Q.P.	0.5 g
KH_2PO_4 Q.P.	0.2 g
Extracto de levadura	0.5 g
CaSO_4 , MgSO_4 Q.P.	5 cristales de c/u
MnSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 Q.P.	2 cristales de c/u
Agar	2.0 g
pH	7.0

Medios de Identificación

Medio de Beijerinck para azúcares	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Q.P.	0.5 g
KH_2PO_4 Q.P.	0.1 g
MgSO_4 Q.P.	0.05 g
Agar	2.0 g
Agua destilada	c.b.p. 100 ml
pH	5.0

Los azúcares utilizados fueron: arabinosa, fructosa, galactosa, maltosa, rafinosa y xilosa en concentraciones al 1%.

Medio de Beijerinck para nitrógeno

Glucosa	2.0 g
KH_2PO_4 Q.P.	0.1 g
MgSO_4 Q.P.	0.05 g
Agar	2.0 g
Agua destilada	c.b.p. 100 ml
pH	5.0

Las fuentes de nitrógeno usadas fueron: asparagina, NaNO_3 , peptona y urea en concentraciones al 1%.

Medios de Propagación (31).

- Medio de Propagación 1

Sacarosa	10 g
Extracto de levadura	0.5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Q.P.	0.5 g
KH_2PO_4 Q.P.	0.2 g
CaSO_4 , MgSO_4 Q.P.	5 cristales de c/u
MnSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 Q.P.	2 cristales de c/u
Agua destilada	c.b.p. 100 ml
pH	7.0

- Medio de Propagación 2	
Melaza de caña (10 % en peso de azúcares reductores totales)	100 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Q.P.	0.5 g
KH_2PO_4 Q.P.	0.2 g
CaSO_4 , MgSO_4 Q.P.	5 cristales de c/u
MnSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 Q.P.	2 cristales de c/u
Licor de maíz	1.0 g
Agua destilada	c.b.p. 200 ml
pH	5.0

- Medio de Propagación 3	
Melaza de caña (10 % en peso de azúcares reductores totales)	100 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fertilizante químico con 20.5 % de N)	2.43 g
KH_2PO_4 Q.P.	0.20 g
KCl (fertilizante químico con 62 % de K)	0.38 g
Licor de maíz	1.00 g
pH	5.5

Estos tres medios pueden usarse como medios sólidos si se les agregan 2.0 g de agar por cada 100 ml.

Todos los medios se someten a esterilización en autoclave a 121° C, 15 lb de presión durante 15 a 20 minutos.

APENDICE 2

REACTIVOS EMPLEADOS PARA LAS DETERMINACIONES

Preparación de reactivos usados en los métodos para los análisis químicos.

Proteínas. Método de Biuret (22).

Reactivos:

NaOH 3 N

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.5 % (p/v)

Caseinato de sodio 5 mg/ml como solución patrón de proteína.

ARN. Método del orcinol (22).

Reactivos:

HClO_4 0.5 N

HClO_4 0.25 N

A. Disolver 0.9 gramos de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en un litro de HCl concentrado (p.e. 1.186) R.A.; guardar indefinidamente.

B. Disolver un gramo de orcinol en 100 ml de agua destilada; estable varias semanas a 0° C.

Reactivo de orcinol. Añadir un volumen de reactivo B a cuatro volúmenes de reactivo A. Preparar inmediatamente antes de usar y no guardar.

Solución patrón de ribosa 0.1 mg/ml.

ADN. Método de la difenilamina (22).

Reactivos:

HClO_4 0.5 N

HClO_4 0.25 N

Reactivo de difenilamina. Disolver 1.5 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético glacial R.A. y se adicionan 1.5 ml de H_2SO_4 R.A. concentrado; guardar en la oscuridad. Antes de usar se adiciona 0.1 ml de acetaldehído acuoso (16 mg/ml) por cada 20 ml de reactivo.

Solución patrón. Se disuelve ADN en NaOH 5 mM para dar una concentración de 400 g/ml. Estable por seis meses a 4° C. El estándar de trabajo se prepara añadiendo a un volumen medido de la solución anterior un volumen igual de HClO_4 N y se calienta a 70° C durante 15 minutos.