

720401



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Producción de Mononucleotidos de Levadura por Medio de la Degradación Específica del ARN

T E S I S

Que para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

Juan René Velázquez Corona



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

TESIS 1978 433

AÑO M.C. ~~1975~~ 1978

FECHA _____

PROC. _____



JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

Presidente: Profa. Natalia Salcedo Olavarrieta
Vocal : Prof. Alfredo Echegaray Aleman
Secretario : Prof. Gustavo Viniegra González
1er. Suplente : Profa. Ruth Roman Palacios
2° Suplente : Profa. Victoria Valles Sánchez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Departamento de Biotecnología
Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

Departamento de Biotecnología
Universidad Autonoma Metropolitana

SUSTENTANTE

Juan René Velázquez Corona

ASESOR DEL TEMA

Dr. Gustavo Viniegra González

A mis padres mi mas tierno agradecimiento
por su apoyo y estímulo durante el - -
desarrollo de mi carrera y a lo largo -
de mi vida, con la esperanza de - -
corresponder justamente.

A mis hermanos esperando
para ellos la realización
completa de su vida.

A todas las personas que de una
u otra forma contribuyeron a la
realización de este trabajo.

A mis Maestros

A mis amigos

y

Para tí

Mi agradecimiento y admiración para el Dr. Gustavo Viniegra por su valiosa - asesoría para la realización de este - trabajo.

Este trabajo fué financiado por la O.E.A. y durante su desarrollo se me otorgó una beca de CONACYT.

I N D I C E

	Pag.
Introducción -----	1
Objetivo -----	2
Generalidades -----	4
Material y Métodos -----	29
Resultados -----	32
Discusión -----	38
Conclusiones -----	42
Bibliografía -----	43
Apéndice	

INTRODUCCION.

Ante el inminente crecimiento demográfico, la baja producción y la escasez de recursos alimenticios, la ciencia se plantea el desarrollo de nuevos alimentos a partir de diferentes fuentes. Entre estos alimentos se encuentra la proteína unicelular obtenida a partir de diferentes medios o sustratos, principalmente subproductos ó desechos agroindustriales, para que de esta manera la proteína unicelular sirva para abastecer parcial o completamente la alimentación ganadera o inclusive la alimentación humana.

Este tipo de investigaciones se han venido incrementando a un ritmo acelerado en los países desarrollados, los cuales cuentan con los recursos tecnológicos para poder abordar estos problemas. Al mismo tiempo en países en vías de desarrollo como es el nuestro, también se busca la solución a estos problemas, pero sin embargo, la mayoría de las veces se trata de abordar de una manera semejante a como lo hacen los países altamente desarrollados, sin ver la realidad económica, política y social que viven nuestros pueblos, v.gr.: se ha recomendado producir biomasa unicelular, sin tomar en cuenta el aprovechamiento comercial de los ácidos nucleicos.

La obtención de biomasa unicelular en nuestros países, aparentemente es fácil, porque se cuenta con variados subproductos -- agroindustriales, v.gr.: melaza y jugos residuales de frutas, pero -- sin embargo, no tenemos los suficientes recursos económicos para poder financiar estas tecnologías y es aquí, en el desarrollo de ella, donde se debe buscar la solución, principalmente acoplando tecnolo -- gías sencillas, de tal manera que estos procesos se complementen entre ellos para hacerlos costeables. Este trabajo forma parte de un pro -- yecto donde se acoplan varios procesos para hacer más costeable la - tecnología de producción y aprovechamiento óptimo de biomasa unicelular de levaduras para obtener compuestos valiosos de interés para la industria alimentaria, como son los nucleótidos potenciadores del sabor cárnico.

OBJETIVO.

En este trabajo se busca evaluar y clasificar una fuente de abastecimiento de enzimas, las cuales presenten actividad ribonucleásica, investigando esta actividad en diferentes muestras de origen local.

Asímismo se investiga qué tipo de enzimas con actividad ribonucleásica, predominan en estas fuentes de abastecimiento, observando hacia donde está orientada su actividad, por medio de los productos de reacción, tratando de ver si éstos pueden ser utilizados como nucleótidos, potenciadores de sabor utilizados en la industria alimentaria. El sustrato a utilizar para estas ribonucleasas, sería el ácido ribonucleico extraído de levaduras, de tal manera que se vieran a acoplar 2 procesos: primeramente, la producción de proteína unicelular y la producción de nucleótidos potenciadores de sabor.

Una de las desventajas que presentan las levaduras para su consumo, como fuente de proteína, es su alto contenido de ARN, la ingestión de una cantidad alta de ARN, por parte de un organismo superior, puede provocar trastornos en el metabolismo de excreción -- del ácido úrico, provocando padecimientos tales como gota; es por esto que se han desarrollado algunos métodos para la eliminación de este ARN, pero en la mayoría de estos procesos al ARN extraído no se le vislumbra ninguna aplicación, haciendo que estos métodos en su mayoría resulten costosos.

Por esto al desarrollar un método sencillo de extracción de ARN de levaduras, aunado a su recuperación con el objeto de lograr su hidrólisis selectiva, por medio de la enzima o enzimas específicas para producir potenciadores de sabor, se acoplan estos 2 procesos, la producción de proteína unicelular con la producción de potenciadores de sabor, haciendo que esta tecnología sea más costeable.

Además este trabajo busca un método de recuperación y separación de ARN y nucleótidos, viendo la posibilidad de utilizarlo en el proceso de extracción de ARN de levadura y en su hidrólisis enzimática.

Por ello se intenta evaluar: a) Las características moleculares que deben tener los ácidos nucleicos extraídos de levaduras para una fácil recuperación industrial y a su vez, que sean sustratos adecuados para la producción de nucleótidos potenciadores de sabor,-- y b) Evaluar las técnicas y condiciones más apropiadas para hidrolizar los ácidos nucleicos, por medio de preparaciones enzimáticas crudas que produzcan un elevado rendimiento de monofosfatos de bases púricas con el fósforo en la posición 5' del anillo ribósico.

GENERALIDADES.

ACIDOS NUCLEICOS.

Los ácidos nucleicos están presentes en todos los seres vivos, donde además de ser los responsables del almacenamiento y la transmisión de la información genética, también traducen esta información en la síntesis de todas las proteínas celulares. Estos ácidos son biopolímeros de alto peso molecular, siendo sus unidades monoméricas los mononucleótidos. Estos nucleótidos están constituidos por una molécula de azúcar, por lo general una pentosa y ésta a su vez es ta unidada a una base nitrogenada.

BASES NITROGENADAS.

Las bases nitrogenadas pueden ser purinas o pirimidinas, en la figura 1 podemos observar la estructura de estas bases. El ácido desoxirribonucleico (ADN), está constituido por 4 bases, las bases púricas adenina (A) y guanina (G) y por las bases pirimídicas citosina (C) y timina (T); el ácido ribonucleico (ARN), posee estas mismas bases, con la excepción de que la base pirimídica timina, es sustituida por otra base pirimídica, uracilo (U).

Las 5 bases mencionadas anteriormente son los principales componentes de estos ácidos, pero mencionaremos también la existencia de bases menores "raras", las cuales las encontramos tanto en el ADN como en el ARN; la presencia de estas bases en los ácidos nucleicos -sirve para estabilizar su estructura secundaria (I).

Como se observó en la figura 1, estas bases son derivados de las bases heterocíclicas, pirimidinas y purinas, siendo estas últimas la unión de un anillo imidazol con una base pirimídica. Al observar su estructura aromática, con la conjugación de dobles enlaces, podemos inferir que tendrán una absorbancia en la región ultravioleta, la cual, al ser graficada en la figura 2 vemos que está aproximadamente a una longitud de onda de 260 nm, en la que coinciden los máximos de absorbancia, siendo ésta una herramienta importante para su identificación y análisis cuantitativo.

Estas bases nitrogenadas las podemos encontrar en la naturaleza, sin que formen parte de nucleótidos, existiendo libres o como compuestos intermediarios en el metabolismo de las bases, tal es el ejemplo de la cafeína, teobromina, ác. orótico, hipoxantina, ác.-úrico, alantoina, teofilina, etc.

NUCLEOSIDOS.

Cuando una base nitrogenada se une a una ribosa o a una desoxirribosa en la posición 1 del azúcar, mediante un enlace β -glucosídico, forma lo que conocemos como nucleósidos.

Estos nucleósidos los obtenemos al someter a una hidrólisis alcalina a los nucleótidos, o cuando son tratados con una nucleotidasa, -- que realmente es una fosfatasa, separando el ácido fosfórico y quedando el nucleósido.

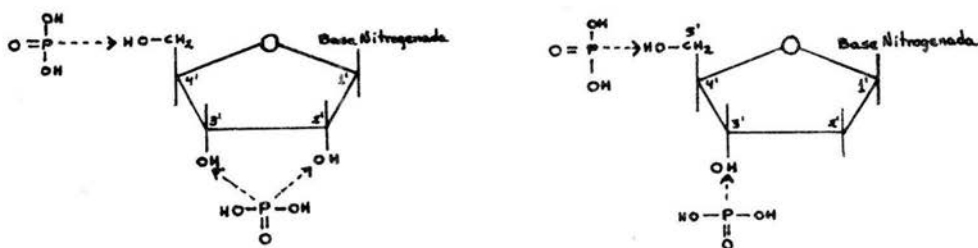
Tenemos 2 tipos de nucleósidos; ribonucleósidos, en los cuales el azúcar componente es la ribosa y los desoxirribonucleósidos, los cuales contienen 2-desoxi-ribosa; éstos azúcares toman la forma furanósica formando un anillo de 5 miembros con un puente de oxígeno. Los nombres comunes de los principales ribonucleósidos son adenosina, guanosina, citidina y uridina; mientras que los 2 desoxi-ribonucleósidos son 2-desoxiadenosina, 2-desoxiguanosina, 2-desoxicitidina y 2-desoxitimidina.

Es importante hacer mención que existen otros nucleósidos que no forman parte precisamente de los ácidos nucleicos, sino que son nucleósidos elaborados principalmente por hongos, mohos y esponjas, ejemplo de estos nucleósidos son la nebularina, puomicina, esfingosina, esfingouridina, tubercidina, cordinepina, cuya estructura está compuesta por un azúcar y una base nitrogenada, el azúcar ribosa ó una arabinosa como es el caso de la esfingouridina (I).

La importancia de estos nucleósidos naturales, es que le sirven a estos organismos como un medio de protección contra el ataque principalmente de bacterias, dando lugar a lo que comunmente llamanos antibióticos.

NUCLEOTIDOS.

Como ya hemos mencionado, los nucleótidos son las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos, cuando un grupo hidroxilo libre del azúcar de un nucleósido, se esterifica con un grupo fosfato, se forma un nucleótido. En la figura siguiente podemos observar el esquema de un ribonucleótido y un desoxirribonucleótido:



Como muestran las flechas en los dibujos, el grupo fosfato puede ocupar las posiciones 2', 3' y 5' en los ribonucleótidos, - mientras que en los desoxirribonucleótidos, únicamente pueden ser ocupadas las posiciones 3' y 5' de la desoxirribosa, siendo estas -- las posiciones que generalmente encontramos cuando sometemos a hidrólisis química o enzimática a los ácidos nucleicos; en el ARN es posible encontrar la formación de ribonucleótidos con fosfato cíclico, en -- donde el grupo fosfato está esterificado en las posiciones 2' y 3' - en la ribosa.

El nombre de cada nucleótido depende de la base nitrogenada que lo constituya, así, por ejemplo, los nucleótidos obtenidos -- del ARN son:

ác. adenílico = adenina + ribosa + ácido fosfórico = adenosina + ácido.
ác. guanílico = guanina + ribosa + ácido fosfórico = guanosina + ácido.
ác. citidílico = citosina + ribosa + ácido fosfórico = citidina + ácido.
ác. uridílico = uridina + ribosa + ácido fosfórico = uracilo + ácido.

En el ADN, el ácido uridílico es sustituido por el ácido timidílico (timina + ribosa + ácido fosfórico = timidina + ácido fosfórico).

Los nucleótidos, además de formar parte de los ácidos nucleicos, los encontramos libres realizando de esta manera un papel -

muy importante en el metabolismo de los seres vivos.

Existen derivados de la adenosina: monofosfato de adenosina (AMP), difosfato de adenosina (ADP) y trifosfato de adenosina (ATP), los cuales son compuestos fundamentales en los procesos de transferencia y captación de energía. Existe también el AMP cíclico (adenosin-3'-5' monofosfato), el cual es muy importante en la activación de la fosforilasa y se le han atribuido también propiedades regulatorias en el metabolismo intermediario de los seres vivos.

Tenemos también el difosfato de guanosina (GDP) y el trifosfato de guanosina (GTP), que intervienen en pasos energéticos del ciclo de Krebs y son indispensables en los procesos de síntesis de proteínas.

Nos encontramos también con el trifosfato de citidina (CTP), el cual interviene en los procesos de síntesis de fosfolípidos, en donde el CTP "activa" a la colina o etanolamina permitiendo su unión con el respectivo diglicérido para formar lecitinas, cefalinas, etc.

Entre los derivados de la hipoxantina, tenemos el ácido inosínico o monofosfato de inosina (IMP), el di y trifosfato de inosina (IDP e ITP), los cuales intervienen en las reacciones de fosforilación y descarboxilación del ácido acetoglutárico, también en el paso de ácido pirúvico a fosfoenolpirúvico en el inverso de la glucólisis.

Los derivados de la uridina (uracilo-ribosa) son coenzimas importantes en las reacciones que implican epimerización de la glucosa y la galactosa (uridin difosfato glucosa, UDPG y uridin difosfato galactosa, UDPGal). El UDPG es precursor de la glucogénesis. Además el UDP y el UTP intervienen también en reacciones de transferencia de energía.

Varias vitaminas del complejo B se hallan unidas a nucleótidos formando otro tipo de dinucleótido, un ejemplo en la unión de flavin mononucleótido (FMN) con el AMP para darnos el flavin adenin dinucleótido (FAD), coenzima muy importante en las reacciones de oxidación-reducción; es importante notar que el FMN, esta formado por la base dimetilisoaloxazina y el poliol ribitol.

Tenemos también el nicotinamida mononucleótido, el cual tiene como base nitrogenada a la nicotinamida, este nucleótido, al unirse al ADP forma el nicotin adenin dinucleótido (NAD), en el cual sí existe un grupo fosfato en la posición 2' del azúcar de la adenosina, forma el NADP, formando estas coenzimas que son muy importantes en las reacciones de oxidación-reducción.

La coenzima A es otro nucleótido que contiene adenina, un grupo fosfato en la posición 3' de la ribosa y un grupo pirofosfato esterificado al ácido pantoténico, que es una vitamina del complejo B. La coenzima A tiene como función transportar grupos acetilo o acilgrupos en diferentes reacciones químicas.

Como podemos notar, los nucleótidos son reactivos ubicuos dentro de las reacciones bioquímicas, al ver el papel tan importante que desempeñan; el cual seguiremos observando al mencionar algunas propiedades de los ácidos nucleicos.

POLINUCLEOTIDOS (ARN Y ADN)

Los nucleótidos se unen formando largas cadenas mediante la unión covalente del grupo fosfato, que forma un puente fosfodiéster entre la posición 3' de un nucleótido con la posición 5' del siguiente, tal como lo muestra la figura 3.

Esta estructura que conocemos como polinucleótidos, es la base de la constitución de los ácidos nucleicos, ADN y ARN; las diferencias entre estos ácidos son, como ya sabemos, la presencia de una desoxirribosa en el ADN y de ribosa en el ARN, además de tener la base timina, en lugar de uracilo, en el ADN. Al observar las estructuras de los nucleótidos y ver las posibles posiciones de unión, vemos que en el ADN, las posiciones que presenta para la unión son la 3' y la 5' de la desoxirribosa, mientras que en el ARN, estas posiciones pueden ser la 2', 3' y 5'; esto nos lleva a pensar que en el ARN, existen varias posibilidades de unión, como pueden ser 5'-3' o 5'-2', etc; pero el análisis de las muestras provenientes de hidrolizados químicos o enzimáticos muestra, tanto en el ADN como en el ARN, que la unión de sus nucleótidos se lleva por medio de la posición 3' de un azúcar con la posición 5' del siguiente azúcar, uniendo el grupo fosfato estas 2 posiciones mediante un enlace fosfodiéster, quedándole un hidrógeno -

potencialmente ionizable, lo cual le confiere las características ácidas a los ácidos nucleicos. El análisis proveniente de la hidrólisis química y enzimática se abordará con más detalle en el siguiente tema.

Para elucidar la estructura del ADN se requirió la conjunción de varios trabajos, entre ellos los de Chargaff, quien entre 1949 y 1953, realizando estudios cromatográficos con hidrolizados de ADN de diferentes organismos, llegó, entre otras conclusiones, a que el número de residuos de A es igual al número de residuos de T ($A=T$) y el número de residuos de G es igual al de C ($G=C$). Lo que implica que la suma de residuos de purinas es igual al número de residuos de pirimidinas: $A + G = C + T$ (II).

Los estudios realizados por Franklin y Wilkins (III) basados en la difracción de rayos X del ADN y los de Chargaff, llevaron a Watson y Crick en 1953 (IV), a postular un modelo tridimensional de la estructura del ADN, el cual explica las diferentes propiedades físicas y químicas del ADN y además propone un mecanismo mediante el cual la información genética puede ser almacenada y replicada, lo cual llevó a postular el esquema conocido como el dogma central de la bioquímica:

ADN transcripción → ARN traducción → proteína

Al igual que el ADN, el ARN es un polímero lineal de peso molecular elevado; en contraste con el ADN, el ARN se sintetiza en el núcleo y emigra hacia el citoplasma. Se han identificado 3 tipos de ARN: El primer tipo participa directamente en la síntesis de proteínas en el citoplasma y se encuentra en las partículas de ribonucleoproteína conocidas como ribosomas, se le conoce como ARN ribosomal, constituye aproximadamente el 80% del ARN celular, siendo metabólicamente muy estable y de un peso molecular cercano al millón. Las células que muestran gran actividad secretora o gran síntesis de proteínas poseen abundantes ribosomas. Es importante notar que la función del ARN en el ribosoma no está bien definida.

El segundo tipo de ARN, es el ARN soluble o de transferencia, participa en la síntesis de proteínas, interviniendo como acti-

vador o acoplador de aminoácidos en los ribosomas. Se considera que hay un ARN de transferencia para cada uno de los 20 aminoácidos que existen disponibles para la síntesis de proteínas. Este ARN muestra una estructura espacial muy característica, de una cadena doblada en forma de horquilla, con puentes de hidrógeno uniendo sus bases, excepto en su extremo acodado, el cual posiblemente interviene determinando la especificidad por un aminoácido; es de notar que todos los ARN de transferencia muestran la sucesión C-C-A en uno de sus extremos libres, siendo éste el sitio de unión de los aminoácidos con el grupo -hidroxilo 2' ó 3' de la ribosa enlazada a la adenina terminal, proporcionando la forma activa del ARN. Es importante notar la presencia de bases nitrogenadas "raras" en el ARN de transferencia, encontrándonos con nucleótidos como son el ác. pseudouridílico y el ác. ribotimidílico. El peso molecular del ARN de transferencia esta entre 23,000 y 30,000, constituyendo aproximadamente el 16% del ARN celular.

El tercer tipo de ARN, que constituye aproximadamente el - 5% del ARN celular, es el ARN mensajero (complementario o de transcripción), en el cual el orden de bases de una cadena del ADN cromosomal, es enzimáticamente transcrito a la forma de ARN de una sola cadena. - Después de la transcripción, el ARN mensajero pasa a los ribosomas, - donde sirve como un templete, para el ordenamiento de los aminoácidos, durante la síntesis de proteínas, en el proceso llamado traducción.

NUCLEASAS

Las nucleasas, desoxirribonucleasas (DNasas) ó ribonucleasas (RNasas), son las enzimas que hidrolizan a los ácidos nucleicos - ADN, ARN ó a ambos de varias maneras y el estudio de ellas ha sido muy útil en el conocimiento de las propiedades y del metabolismo de estos ácidos.

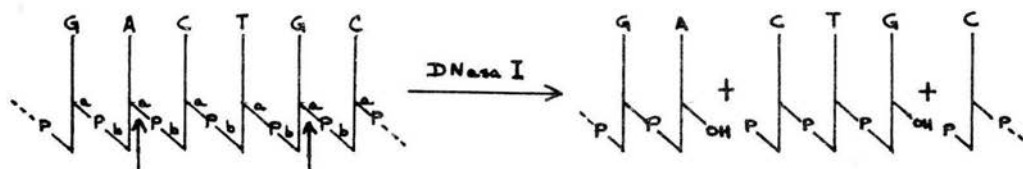
Para poder estudiar estas enzimas veremos primero su clasificación, que se apoya en diferentes parámetros, como son, la especificidad de sustrato, o sea, dependiendo si ataca al ADN, al ARN ó a ambos. Otra manera de clasificarlas es por su forma de ataque, dependiendo si la enzima ataca la cadena de polinucleótido interior o endolíticamente; o si comienza su ataque por los extremos ó sea exolíticamente, haciendo que ésto produzca cambios en las propiedades físicas, como es la viscosidad de los ácidos. Otra característica muy útil para su clasificación es la que depende de la clase de sus productos, es decir, el resultado del rompimiento del polinucleótido, ya que si vemos la figura 4, observaremos que la cadena puede ser atacada entre el grupo hidroxilo de la posición 3' y el grupo fosfato (a la que llamaremos posición a, como esta en la figura 4), produciendo nucleótidos con el grupo fosfato en la posición 5' o el ataque puede ser lo contrario, la enzima puede actuar entre el grupo hidroxilo de la posición 5' y el grupo fosfato (a la que designaremos como posición b), dando como resultado nucleótidos con el grupo fosfato terminal en la posición 3'. Estos criterios mencionados serán los utilizados principalmente para la clasificación de estas nucleasas.

1.- DESOXIRRIBONUCLEASAS (DNasas). - Como su nombre lo indica, estas enzimas atacan principalmente al ADN y para su estudio las dividiremos en endonucleasas, si su ataque es en el interior de la cadena, o exonucleasas si hidrolizan comenzando por los extremos del polinucleótido.

A.- ENDONUCLEASAS.

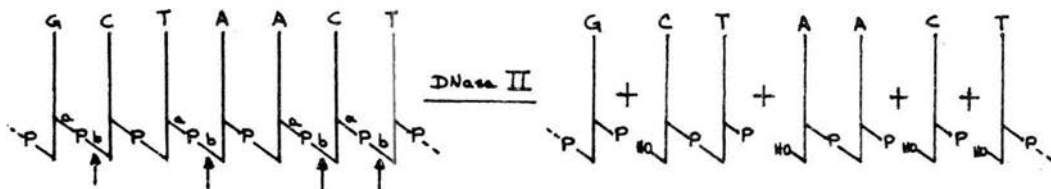
a).- DESOXIRRIBONUCLEASA PANCREÁTICA (DNasa I). - Esta enzima es aislada de páncreas de bovino, rompe el ADN en oligonucleótidos con un promedio de longitud de 4 unidades monoméricas, que tienen un grupo hidroxilo libre en la posición 3' y un grupo fosfato en la posición 5'.

Requiere iones divalentes, v.gr. Mg, siendo su rango de pH alcalino - entre 6.8 y 8.2 (V). Cataliza el rompimiento en la posición a, preferentemente entre una base púrica y otra base pirimídica, como se ve - en la siguiente figura:



La DNasa I hidroliza al ADN natural más rápido que al ADN - desnaturalizado. No puede hidrolizar pequeños oligonucleótidos, ácidos apurínicos o ADN sencillo (de hélice sencilla) desaminado. Es inhibida por citratos, boratos y fluoruros, por desplazamiento de los - iones Mg.

b).- DESOXIRRIBONUCLEASA II (DNasa II).- Esta enzima es aislada de -- baso y timo, estando su pH óptimo en el rango ácido de 4.5 a 5.5, no necesita iones Mg. Rompe el ADN en oligonucleótidos de diferente longitud, dejando un grupo hidroxilo libre en la posición 5' y en la posición 3' un grupo fosfato. Se demostró, además, que la DNasa II de timo formaba mononucleótidos 3' fosfato en una proporción de 7% de ADN. - Esta enzima tiene cierta inclinación por romper el enlace en la posición b, entre una base púrica y la base citosina, aunque en general no tiene preferencia por base específica, rompe el ADN según el siguiente esquema:



Esta enzima la encontramos también en Staphylococcus aureus, forma nucleótidos 3' y dinucleótidos que presentan la estructura ApCpC (VI).

c).- DESOXIRIBONUCLEASA DE STREPTOCOCCUS (ESTREPTODORNASA).- Es una endonucleasa que rompe el enlace 3' fosfato, posición a, produciendo fragmentos de diferente longitud, que tiene el grupo fosfato en la posición 5' su pH óptimo es de 7 y requiere de iones Mg para su máxima actividad.

d).- OTRAS ENDONUCLEASAS.- Mencionaremos primeramente las endonucleasas I y II de E. coli, las cuales rompen interiormente el ADN produciendo pequeños fragmentos de 7 nucleótidos en promedio, con el grupo fosfato en la posición 5', o sea su rompimiento es en la posición a, prefieren ADN natural a ADN desnaturalizado y se diferencian en que la endonucleasa II prefiere ADN alquilado en doble hélice o sea ADN con metilaciones.

Existen ciertas endonucleasas bacterianas llamadas enzimas restrictivas, las cuales tienen la propiedad de modificar el ADN "extrano" v.gr. el ADN viral, afectando sus propiedades; un ejemplo es la endonucleasa III de E. coli, la cual requiere de iones Mg, ATP y s-adenosilmetionina. Otro ejemplo de estas enzimas lo encontramos en H. influenzae, la cual ataca ADN extraño rompiendo la doble hélice.

Otro tipo de endonucleasas son las endonucleasas dependientes de ATP, atacan ADN natural de doble hélice dando fragmentos con el grupo fosfato en la posición 5'; ha sido descrita en varios organismos, entre ellos M. luteus y E. coli.

Los virus presentan la propiedad de inducir la producción de endonucleasas después de la infección, un ejemplo son las endonucleasas II y IV inducidas por el bacteriófago T4, las cuales se piensa que con la ayuda de algunas exonucleasas degradan el ADN del huésped produciendo fenómenos de recombinación, lisogenia, replicación, etc. El estudio de endonucleasas inducidas por virus de mamíferos es poco conocido, pero si se ha encontrado que las pueden inducir virus tales como Adenovirus y Poxvirus (V).

B.- EXONUCLEASAS

Este tipo de enzimas ha sido descrito principalmente en E. coli; en ella se han encontrado con fosfodiesterasas, con la exonucleasa I, la que hidroliza ADN de hélice sencilla desnaturalizado con calor, comenzando con el extremo 3' con el grupo hidroxilo libre, produciendo -

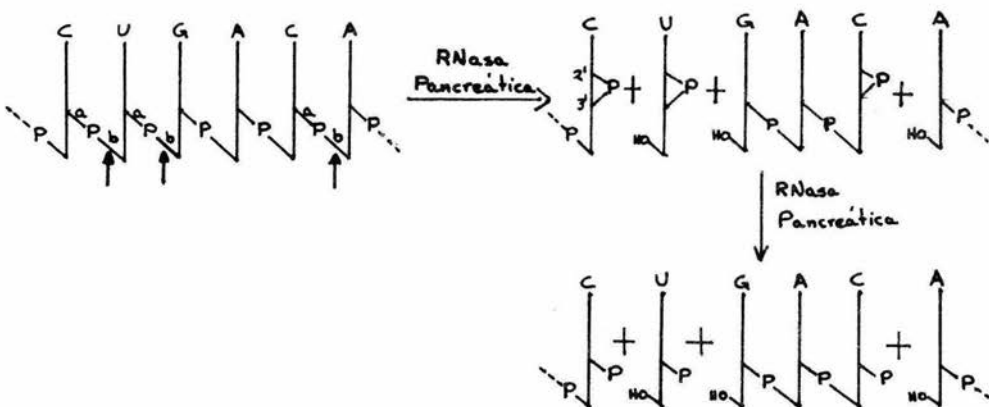
nucleótidos 5'. Existe la exonucleasa III, la que tiene actividad de fosfatasa y exonucleasa, iniciando el ataque por el grupo fosfato 3' terminal y luego actuando exolíticamente sobre los extremos. Las exonucleasas IVA y IVB actúan de preferencia sobre ADN predigerido con DNasa pancreática. Otro tipo de exonucleasas se encuentra asociada con la actividad de la enzima DNA polimerasa I y ha sido utilizada para definir la acción de la actividad de las exonucleasas en el sentido 5'--3', ó en sentido 3'--5'. Han sido descritas exonucleasas también en mamíferos tales como el conejo. Las exonucleasas pueden ser inducidas por virus tales como el bacteriófago T4, fago SP3, Poxvirus y Herpes virus.

2.- RIBONUCLEASAS (RNasas).- Estas enzimas catalizan el rompimiento del ARN exclusivamente, para su estudio las dividiremos en 2 grupos, endo y exonucleasas. A las endonucleasas las dividiremos a su vez, en las que forman grupos 3' fosfato, ó sea que rompen los enlaces internucleótidos en la posición b; y las que forman grupos 5' fosfato ó que rompen en la posición a, como vemos en la figura 4.

A.- ENDONUCLEASAS QUE FORMAN GRUPOS 3' FOSFATO.

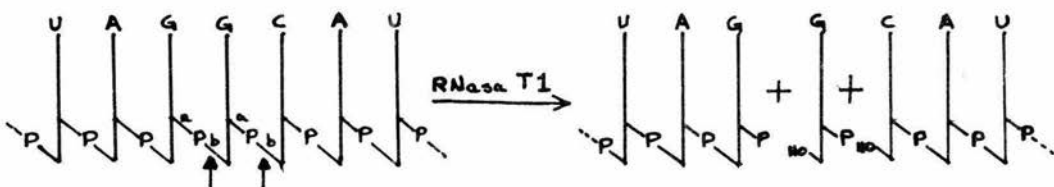
a).- RIBONUCLEASA PANCREÁTICA.- Esta es una de las enzimas más ampliamente estudiadas, fué cristalizada en 1940 por Kunitz. Esta enzima es una pequeña proteína, de peso molecular de 13,700; es estable en un rango amplio de pH, siendo notablemente resistente al calor en solución ligeramente ácida, aunque es rápidamente inactivada por álcalis. No tiene acción sobre el ADN y es fuertemente antigénica. Su actividad máxima esta entre el rango de pH 7.0-8.2, con un óptimo de pH de 7.7 Su temperatura óptima es de 65°C.

Su ordenamiento de aminoácidos, así como su sitio activo han sido ya determinados, además su estructura completa ha sido obtenida por cristalografía en rayos X y su síntesis química totalmente conseguida (VII). En su mecanismo de acción provoca un ataque intramolecular en el enlace fosfodiéster, usando el grupo hidróxilo 2' para formar un intermediario obligatorio con el fosfato cíclico 2'-3', el cual posteriormente es hidrolizado por la enzima para dar pirimidinas 3' fosfato, como nucleótidos libres o como nucleótidos terminales en uno oligonucleótido, como se muestra en el siguiente esquema:

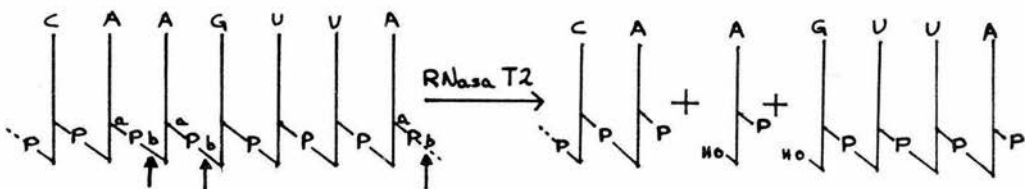


La RNasa pancreática es considerada como una fosfodiesterasa altamente específica, la cual hidroliza únicamente ésteres de fosfato secundarios de nucleósidos de pirimidina 3' fosfato. También hidroliza los fosfatos cíclicos secundarios 2'-3' de los nucleósidos de pirimidina.

b).- RIBONUCLEASA T1 (RNasa T1).- Al igual que la RNasa pancreática esta enzima ha sido intensamente estudiada. Se obtiene de Aspergillus orizae, es de peso molecular bajo, estable al calor y al ácido, hidroliza específicamente los enlaces intranucleótidos de ARN entre 3' GMP y los grupos hidroxilo 5' de los nucleótidos adyacentes, como se muestra en la figura siguiente:



c).- RIBONUCLEASA T2 (RNasa T2).- Esta enzima se obtiene también de Aspergillus orizae, lleva a cabo el rompimiento de los enlaces intranucleótidos, adyacentes a los grupos 3' adenilato y además digiere el ARN de transferencia a casi totalmente 3' mononucleótidos según los estudios de Uchida (V). La hidrólisis se realiza de la siguiente manera:



La RNasa T2 puede hidrolizar prácticamente todo el ARN, siendo poco apropiada para la preparación de oligonucleótidos con ordenamientos definidos. Sin embargo, una digestión apropiada dará oligonucleótidos con grupos 3' AMP terminales. Esta enzima tiene un peso molecular de 36,000 y un pH óptimo cercano a 4.5.

Debido a la especificidad que presentan las RNasa Tly T2 y además otras enzimas que tienen una actividad similar a la RNasa T1 como son las RNasa U1 y U2 (de Ustilago sphaerogena), han sido utilizadas en la preparación de fragmentos definidos de ARN; ayudando a descifrar el orden completo de ARN de diferentes especies.

d).- RIBONUCLEASAS DE HIGADO DE RATA.- En el hígado de rata es fácil encontrar varias RNasas; se han descrito 2 endonucleasas las cuales forman nucleótidos con grupos terminales 3' monofosfato. Una tiene un pH óptimo cercano a 6 e hidroliza todos los enlaces fosfodiéster del ARN con la producción de nucleósidos cíclicos 2' - 3' fosfato. - La otra enzima tiene un pH óptimo cercano a 8, hidroliza los enlaces fosfodiéster entre los nucleótidos de pirimidina adyacentes dejando oligonucleótidos ricos en bases púricas.

En otro trabajo se describe la purificación de una enzima RNasa I separándola de la RNasa II alcalina; la RNasa I es útil en la preparación de pequeños oligonucleótidos, que en los grupos extremos tienen en la posición 3' el grupo hidroxilo y el grupo fosfato - en la posición 5' (VIII).

e).- RIBONUCLEASAS DE STREPTOMYCES ERYTHREUS.- En otras investigaciones (IX) se purificó, de S. erythreus, una enzima que presenta una especificidad similar a la RNasa T1, es una enzima termoestable y que presenta un óptimo de pH a 7.4.

f).- OTRAS ENDONUCLEASAS.- Ha sido descrita la RNasa alcalina I de E. coli, la cual está enlazada a los ribosomas y al hidrolizar no muestra especificidad de base. La RNasa alcalina III se encuentra también asociada a los ribosomas, ataca ARN acoplado a otra cadena de polinucleótidos, requiriendo de los iones Mg o Mn, Na, K y NH_4 para su actividad.

A' .- ENDONUCLEASAS QUE FORMAN GRUPOS 5' MONOFOSFATO.- Antes de pasar a la descripción específica de alguna de ellas, mencionaremos que en su mecanismo de acción estas endonucleasas rompen el enlace fosfodiéster sin intermediarios ciclizantes, por lo que el grupo hidroxilo en la posición 2' no es necesario. Por esta causa la mayoría de endonucleasas que forman nucleótidos 5' atacan tanto al ARN como al ADN, por lo que serán descritas más adelante.

a).- RIBONUCLEASA II DE E. COLI. .- Actúa como endo y exonucleasa, necesita de varios cationes para su actividad e hidroliza preferentemente ARN sencillo dando como productos nucleótidos 5' y oligonucleótidos residuales.

b).- RIBONUCLEASA ALCALINA I DE HIGADO DE RATA.- Necesita iones Mg para su actividad, teniendo un pH óptimo de 7.5; rompe el ARN inespecíficamente dando productos con el grupo fosfato en la posición 5' final.

En la revisión de Barnar (X), nos encontramos con una clasificación muy amplia de RNasas, en la que se nos muestra 76 endonucleasas, incluyendo algunas nucleasas las cuales han sido bien tipificadas. Este estudio aborda las endonucleasas desde vertebrados hasta bacterias y puede ser consultado para un estudio más profundo.

B.- EXONUCLEASAS

a) .- RIBONUCLEASA V DE E.COLI .- Su especificidad reside en que forma nucleótidos 5' y ataca en la dirección 5'-3', degrada únicamente moléculas que funcionan como mensajeros y actúa únicamente en la presencia de todos los componentes requeridos para la traducción, incluyendo a los ribosomas 70S (I).

b).- CCA PIROFOSFORILASA .- Esta enzima se considera como una exonucleasa limitada, ya que en la presencia de fosfato inorgánico forma

CTP y ATP por el rompimiento del trinucleótido específico CpCpA, presente en el extremo final del ARN de transferencia comenzando por el grupo 3' hidroxilo libre en la base adenina.

La mayoría de las exonucleasas que degradan ARN y ADN también serán abordadas principalmente al tratar el espacio dedicado a las nucleasas.

3 .- NUCLEASAS. - Con este nombre designaremos aquellas enzimas que degradan inespecíficamente tanto ADN como ARN, clasificándolas al igual que las anteriores en endo y exonucleasas.

A .- ENDONUCLEASAS

a) .- NUCLEASA DE MICROCOCCUS .- Esta enzima la encontramos en cultivo de S. aureus,; hidroliza tanto ADN como ARN produciendo nucleótidos 3' y oligonucleótidos. Su pH óptimo es de 8.8, siendo indispensables para su actividad iones Ca, los cuales no pueden ser reemplazados por el Mg. Es bastante estable al calor. La hidrólisis exhaustiva de ARN, ADN y de polímeros sintéticos, producen mono y dinucleótidos únicamente (XI).

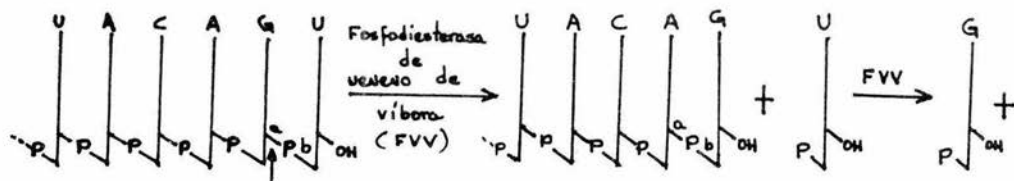
b).- NUCLEASA DE NEUROSPORA CRASSA .- Es purificada de conidias de Neurospora hidroliza ADN, ARN y polinucleótidos sintéticos, produciendo pequeños oligonucleótidos con el grupo 5' fosfato terminal, prefiere más no es una especificidad absoluta, a residuos de guanosina y desoxiguanosina dentro del polinucleótido. Su pH óptimo está entre 7.5 - 8.5; la velocidad de degradación es estimulada por iones Mg, Ca o Fe; tiene un peso molecular aproximadamente de 55,000 y una temperatura óptima entre 47 - 62°C (XII).

c) .- OTRAS NUCLEASAS .- La nucleasa S1, producida por Aspergillus orizae, hidroliza ADN desnaturalizado y ARN, produciendo nucleótidos 5' y pequeños oligonucleótidos. Es activada por iones Zn y tiene un pH óptimo cercano a 4.5 (XIII). Varias endonucleasas que tienen un mecanismo parecido a la nucleasa S1, han sido encontradas en células de mamíferos, invertebrados, plantas y bacterias, presentando otro rasgo común que es la necesidad de iones Mg.0 sea que existe una gran variedad de materias primas biológicas conteniendo RNA-

sas capaces de transformar el ARN en nucleótidos potenciadores de sabor.

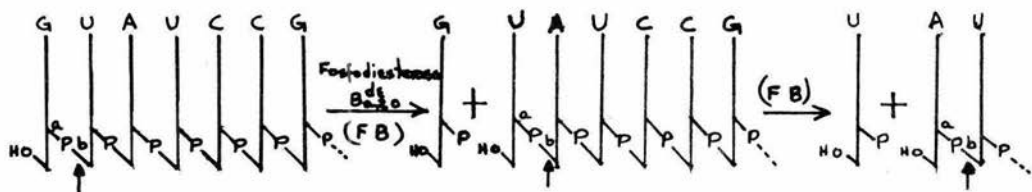
B .- EXONUCLEASAS

a).- FOSFODIESTERASA DE VENENO DE VÍBORA.- El veneno de varias especies de víboras contiene fosfodiesterasas que son empleadas en la preparación de nucleótidos 5'. Por lo general se encuentran asociadas a fosfomonoesterasas, las cuales catalizan el rompimiento de nucleótidos a nucleósidos. Del veneno de serpiente de cascabel ha sido purificada una fosfodiesterasa, la cual presenta una actividad no específica con respecto a las bases, catalizando la hidrólisis de desoxirribo y polirribonucleótidos, además de otros sustratos sintéticos (XIV). Como se muestra en la siguiente figura esta enzima presenta una especificidad del tipo a, por lo que libera nucleótidos 5' de una manera gradual, comenzando por el extremo donde se encuentra presente el -- grupo hidroxilo en la posición 3':



La presencia del grupo fosfato en la posición 3', le confiere resistencia al sustrato; su pH óptimo es alcalino, cercano a 8.8 y es muy útil en la elucidación de diferentes oligonucleótidos.

b).- FOSFODIESTERASA DE BAZO.- Esta enzima presenta la actividad opuesta a la fosfodiesterasa de veneno de víbora, es una exonucleasa que cataliza la hidrólisis en la posición b del ARN, comenzando por el extremo que lleva libre el grupo hidroxilo de la posición 5', produciendo nucleótidos 3'. También actúa sobre una mezcla de oligonucleótidos, producto de la hidrólisis del ADN por la DNasa II de Bazo, dando como productos nucleótidos 3'. La figura siguiente nos muestra el esquema de la hidrólisis:



Esta enzima es inactiva con oligonucleótidos que llevan el grupo 5' fosfato en un extremo (I).

HIDROLISIS QUIMICA DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

Al someter al ADN a una temperatura moderada y a bajo pH (60°C; pH 3) o a HCOOH a 37°C, no se altera el enlace fosfodiéster de la cadena, pero sin embargo se rompe el enlace entre la desoxirribosa y la base púrica, produciendo ácidos apurínicos. Asimismo el tratamiento del ADN con hidrazina ataca el enlace de la desoxirribosa con las bases pirimídicas, produciendo ácidos apirimídicos.

El tratamiento del ARN con hidroxilamina a pH de 10, elimina las bases uracilo, produciendo ácidos desuridílicos. El ADN no es hidrolizado por bases, mientras que el ARN si lo es, puesto que es necesario el grupo 2'-hidroxilo para el ataque alcalino, produciendo una mezcla de nucleótidos 2' y 3', además de una pequeña cantidad de nucleótidos cíclicos 2'-3', como se observa en la figura 5 (I,XV).

Como hemos observado al hacer la revisión de estas enzimas, las encontramos distribuidas en toda la escala biológica; la función que cumplen en el metabolismo de los seres vivos es muy versátil y su estudio nos ha llevado al descubrimiento de muchas de las propiedades de estos organismos; entre otras cosas nos han ayudado a explicar fenómenos tales como la replicación, transcripción, traducción, recombinación, lisogenia, etc; además se ha descubierto su capacidad para reconocer ciertas regiones específicas de los ácidos nucleicos, por ejemplo en los procesos de restricción y reparación de ADN dañado, etc.

También cumplen con funciones digestivas, en el sentido nutricional, en organismos superiores. Son utilizadas complementándose con

la hidrólisis química, para la elucidación de la estructura de los ácidos nucleicos, para estudiar propiedades de nucleótidos, preparando, como ya mencionamos, oligonucleótidos de estructura conocida etc.

O sea, el papel de estas enzimas ha sido muy útil en el desarrollo de la investigación y una de sus aplicaciones a la tecnología la observaremos en el siguiente tema.

POTENCIADORES DE SABOR

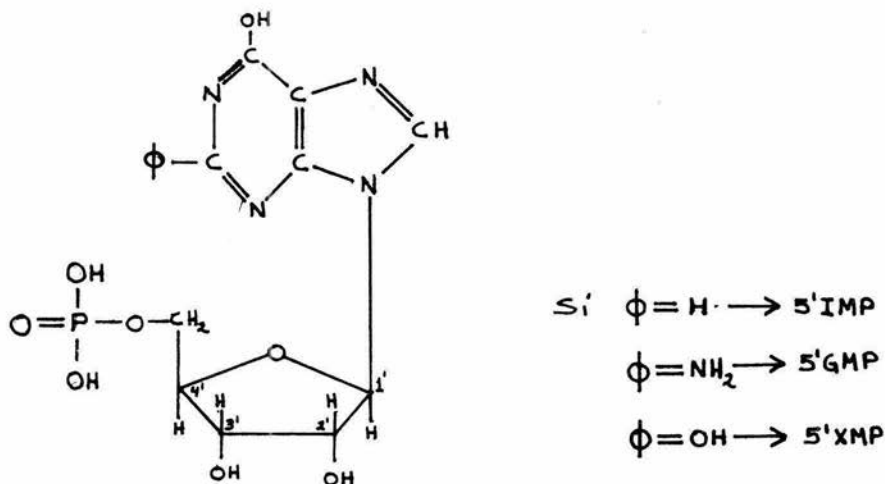
Una de las aplicaciones que tienen a nivel industrial las RNAs (o nucleasas) es para la producción de nucleótidos 5', ya que estos son utilizados en la industria alimentaria como potenciadores de sabor; este término se refiere a aquel compuesto que por sí mismo no tiene efecto sensorial, pero que sin embargo exagera este efecto cuando se encuentra en una mezcla con otros compuestos (XVI).

La industria de alimentos japonesa tiene la primacía en el desarrollo de esta tecnología desde principio de siglo, cuando sus investigadores, observando las costumbres alimenticias de ciertos pueblos, en una de ellas se dieron cuenta de la utilización de ciertas clases de vegetales o de pescados marinos, secados y convertidos en harina, que eran usados como condimento; por esto se decidió aislar el principio responsable de esta acción, y en 1909 Ikeda reportó al L-glutamato monosódico (MSG) como el componente saborizante de "Sea Tangle", una especie de vegetal marino. Esto inmediatamente dió comienzo a su explotación comercial.

Unos pocos años después, en 1914, se aisló el principio saborizante del pescado "Bonito", reportandose como la sal histidina del ácido inosínico, pero, a diferencia del MSG, su producción era poco económica, por lo cual tuvieron que pasar 50 años para poder ser producido comercialmente (XVI).

La razón de este retraso, fué el poco conocimiento que había en la relación de la estructura química y las propiedades saborizantes de los nucleótidos. La existencia de 3 isómeros del ác.inosínico, los isómeros 2', 3' y 5' y su relación con la capacidad saborizante era algo que nunca se había reportado. Esto llevó a Kuninaka (XVI) a preparar las sales disódicas de estos isómeros para comparar sus efectos saborizantes. Así se llegó a la conclusión de que de los 3 isómeros solamente los nucleótidos 5' tenían actividad saborizante y que además la histidina no era necesaria. Se confirmó también que la inosina, hipoxantina, las bases púricas o pirimídicas, la ribosa-5--fosfato, los nucleósidos y los nucleótidos 2' y 3' por sí mismos no tienen capacidad saborizante, por lo que se dedujo que el enlace ri-

bosídico y el enlace 5-fosfomonoéster son indispensables para la acción saborizante. Otros hechos observados fueron que sí la posición 6 de la base nitrogenada ocupada por un grupo hidroxilo era cambiada por un grupo amino, la capacidad saborizante disminuía notablemente, pero sí la posición 2 era sustituida por un grupo hidroxilo o un grupo amino, la actividad se conservaba o inclusive llegaba a aumentar; ésto llevó a proponer una estructura general de los nucleótidos que tienen actividad saborizante, que es la siguiente:



La actividad del nucleótido 5'XMP es más débil que la de los nucleótidos 5'IMP y 5'GMP (XVII). Al ver las propiedades de estos nucleótidos se decidió experimentar sobre los efectos que pudieran tener las modificaciones químicas del 5'IMP y del 5'GMP. Primeramente se observó que los desoxirribonucleótidos, como son 5'desoxiinosinato y 5'desoxiguanilato, presentan también actividad saborizante, por lo que se deduce que el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa puede ser reemplazado por un átomo de hidrógeno. Asimismo, la sustitución del grupo fosfato o de los grupos hidroxilos de la ribosa, por dife-

rentes grupos alifáticos, por grupos fosfatos, por grupos sulfatos, el en sayo de nucleótidos cíclicos, etc., nos lleva a la conclusión de que, al menos hasta ahora, no existen nucleótidos sintéticos u otros compuestos con una actividad saborizante similar a la de los nucleótidos 5' (XVII).

Si la actividad sinérgica de los nucleótidos 5' no se hubiera descubierto, su comercialización hubiera sido poco costeable. Sin embargo, su propiedad más importante es la acción sinérgica que presentan al mezclarse con MSG, ésto se descubrió al probar su capacidad saborizante - utilizando una solución de MSG como disolvente.

Esta acción sinérgica es demostrada por el estudio de los efectos mutuos de estos compuestos en la reducción del nivel de su umbral sabo_rizante. Es decir, el nivel de percepción de 5' inosinato disódico ó 5' guanilato disódico es reducido claramente en una solución de MSG y viceversa, el umbral de percepción de MSG es reducido en una solución de nucleótido 5'. En estos estudios se probó que a concentraciones bajas la efectividad de los nucleótidos 5' es mayor, o sea que el efecto de reemplazar al nucleótido 5' por MSG en una mezcla de MSG y nucleótido 5', es mayor a una concentración baja de nucleótido 5'. Más objetivamente observamos que en su capacidad saborizante una mezcla de 1 g. de guanilato disódico y 10 g. MSG equivalen a 209 g. de MSG solo, y que una mezcla de 1g. de guanilato disódico y 100 g. de MSG corresponden a 556 g. de MSG. Como se observa en el primer caso, 1g. de guanilato 5' disódico reemplaza a -- 199 g. de MSG y en el segundo 1 g. de guanilato 5' disódico, sustituye a 456 g. de MSG. Al hacerse estos estudios utilizando al inosinato 5' disódico, vemos que éste es menos eficaz que el 5' GMP, ya que la eficiencia del guanilato es aproximadamente 4 veces mayor que la del inosinato - (XVI).

Esta respuesta que ofrecen los nucleótidos 5' al mezclarse con MSG se vé también al combinarse con otros alimentos líquidos como es el caldo ó sopa de pollo y en productos sólidos como embutidos, además de otros alimentos. Por lo tanto, como podemos notar la introducción de los nucleótidos 5' al mercado alimentario más que competitiva, viene a ser complemento de otros saborizantes, gracias a su acción sinérg- - - -

tica.

METODOS PARA LA PRODUCCION DE NUCLEOTIDOS 5'

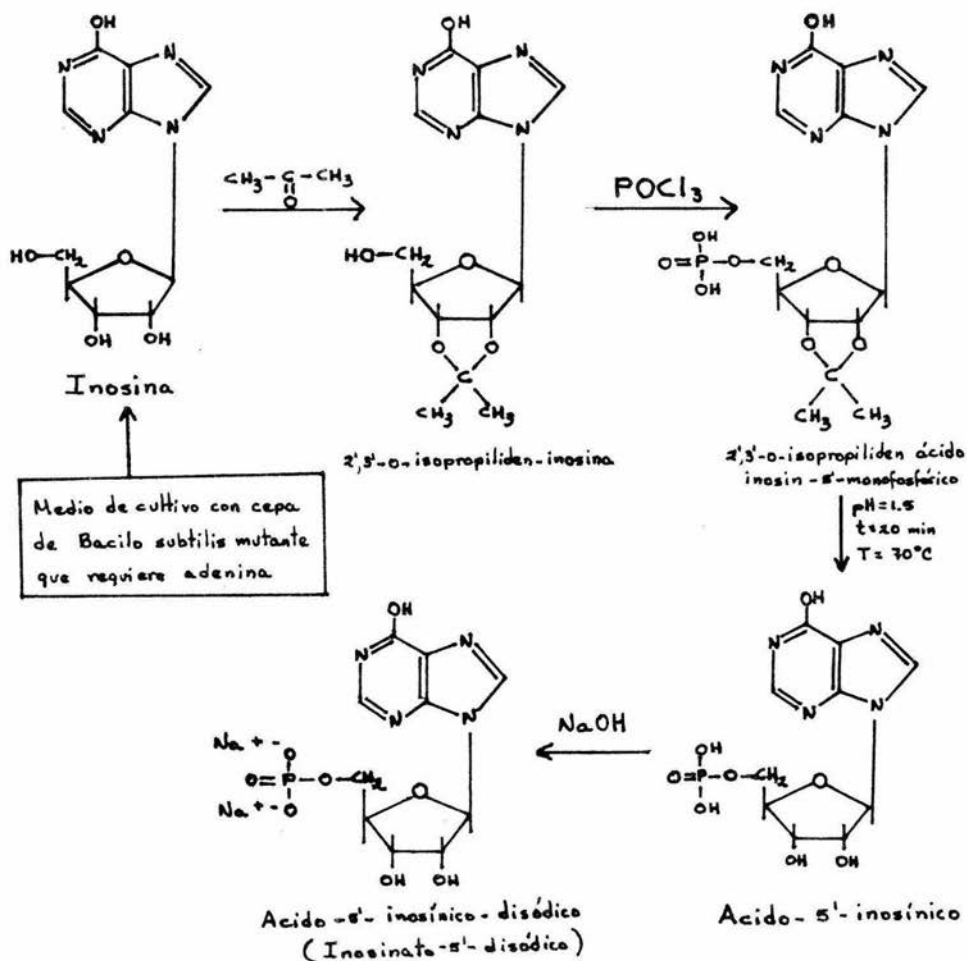
Nos encontramos principalmente con 3 métodos para la obtención de nucleótidos 5', que son los siguientes:

- a) .- EXTRACCION DE FUENTES NATURALES .- Los nucleótidos 5' los podemos encontrar en pequeñas cantidades en la carne, pescados y hongos principalmente. Pero la producción industrial por este método, no es económicamente atractiva.
- b) .- DEGRADACION DEL ACIDO RIBONUCLEICO .- Como ya sabemos el ARN puede ser degradado química o enzimáticamente, proporcionándonos mononucleótidos. Pero el ARN al ser hidrolizado químicamente en medio alcalino nos produce nucleótidos 3', los cuales no tienen capacidad saborizante. Existen procesos químicos más sofisticados, como es el tratamiento alcalino térmico del ARN de levadura en el estado sólido, el cual nos proporciona nucleótidos 5' (XVIII).

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática del ARN hay que seleccionar la fuente adecuada de enzimas que, como sabemos está ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándonos con muchas clases que nos pueden producir nucleótidos 5', nucleótidos 3' u otros productos. Numerosos trabajos han sido orientados hacia este fin de encontrar fosfodiesterasas 5' (enzimas que produzcan nucleótidos 5'), descubriéndose que cepas de los géneros Penicillum, Streptomyces, Bacillus, Torula, Zygosaccharomyces, Aspergillus, etc., pueden ser utilizadas industrialmente en la producción de fosfodiesterasas 5', por lo que es posible obtener nucleótidos 5', como ácido adenílico, guanílico, citidílico y uridílico, industrialmente a partir de ARN de levaduras. La inosina se encuentra en pequeñas cantidades en el ARN de levaduras, pero el ác.5' inosínico, puede ser fácilmente obtenido, por la desaminación del ác.5'adenílico.

- c) .- COMBINACION DE FERMENTACIONES Y SINTESIS QUIMICA .- La producción de nucleótidos 5' directamente por fermentación, en buena proporción resulta algo difícil todavía; aunque se han reportado trabajos (XIX) en los que mononucleótidos 5' pueden ser excretados por levaduras, al ser degradado su ARN por la activación de sus -

ARN-despolimerasas. También la síntesis química de estos nucleótidos 5' es poco costeable. Es por ésto que se han combinado los procesos de fermentación y síntesis química, ya que la producción fermentativa de nucleósidos, principalmente inosina, es bastante fácil. Una vez obtenida la inosina, puede ser químicamente fosforilada a ác.5'inosínico en buena proporción. Este proceso ya fué establecido industrialmente y se lleva a cabo según el siguiente esquema. - (XVII) :



De estos 3 métodos de producción los 2 últimos son los utilizados en escala industrial, por ser el primero incosteable.

IMPORTANCIA ECONOMICA DE LOS NUCLEOTIDOS POTENCIADORES DE SABOR

En México la producción rentable de proteína unicelular a gran escala (100,000 ton/año) requiere el aporte de gran cantidad de equipo, si se usa tecnología europea vigente, lo cual solamente haría costea-ble esta tecnología si se produjeran cantidades bastante grandes de - levadura, cosa que es imposible por no contar con el mercado y con los recursos económicos para hacerlo. Ahora bien, una producción baja de levaduras, por sí sola, no haría costea-ble el proceso por la escasa -- amortización de equipo. aquí vemos que el acoplamiento de tecnologías sencillas para la producción de proteína unicelular, con la sencilla obtención de nucleótidos, sería la solución para su desarrollo, como lo muestra el estudio económico de Peschard y Viniegra (XX), el cual nos dice que una producción baja de proteína unicelular (1000 ton/año), únicamente sería costea-ble con la extracción y procesamiento de nucleó- tidos provenientes de la hidrólisis de su ARN extraído.

Como podemos notar estos nucleótidos son de gran ayuda econó- mica para la producción de proteína unicelular, pero al mismo tiempo - sirve de apoyo a nuestra industria alimentaria:

El mercado de consumo de los potenciadores de sabor en México es aportado por el consumo de MSG y los nucleótidos 5' principalmente. El MSG es ampliamente utilizado en la industria alimentaria en la pre- paración de diferentes alimentos. Todo el MSG consumido en México es importado, siendo su consumo aproximadamente de 2700 toneladas duran- te el año de 1977, teniendo un aumento del 10% anualmente; su precio de venta al mayoreo es de \$ 31.25 /Kg. La producción en México no es costea-ble, por ser necesaria la producción de 3600 toneladas/año, lo que obligaría a evitar la importación y además buscar un mercado ex- terno para la exportación, teniendo que competir con los productos de otros países exportadores, por lo cual debe de ser de buena cali- dad y bajo precio.

En nuestro país el consumo anual de nucleótidos es de 45 to- neladas, siendo su costo de \$ 800 /Kg, todo este producto es importado

y su demanda sigue en aumento al abrirse nuevas fuentes de consumo.

Al revisar los datos citados vemos que la producción de nucleótidos de buena calidad y buen precio haría que su importación fuera mínima, y además, debido a que habría en existencia una buena cantidad de nucleótidos haría que el consumo de MSG disminuyera por las propiedades sinérgicas de estos compuestos, y por lo tanto, bajara su importación.

Todo esto requiere de una investigación de mercado minuciosa - que nos amplie el horizonte para la introducción de una tecnología no vel, que aunque vemos que la demanda aumenta, debe tener las cualidades citadas para competir con las tecnologías que ya están en el mercado.

MATERIAL Y METODOS

1) .- ADSORCION Y ELUCION DE ARN Y AMP CON CELLEX-D (DEAE-CELULOSA).

El ARN y el AMP utilizados se ajustaron a una determinada concentración para que dieran una absorbancia de 1.0 a 260 nm en un volumen de 5 ml. Al ARN y al AMP mezclados y por separado, se les agregaron diferentes volúmenes de una suspensión de Cellex-D al 0.3%, se agitaron a temperatura ambiente y se centrifugaron en un aparato de tipo clínico, leyéndose el sobrenadante a 260 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Karl Zeiss PMQ-II). La elución de los compuestos de la resina se llevó a cabo variando la fuerza iónica con diferentes concentraciones de NaCl ↓

2) .- CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-50

Se extrajo ARN de la levadura Saccharomyces cerevisiae (tipo comercial) según el método de Gómez y Viniegra (XXI) y se le determinó el peso molecular (PM) mediante cromatografía en Sephadex G-50. Se preparó una columna de 32 x 0.9 cm con esta resina. Se inyectaron 0.1 ml de la muestra extraída y el lixiviado se llevó a cabo con NaCl 1 M. La columna se calibró con dextrana azul y con AMP, la regulación del lixiviado se efectuó por medio de una celda óptica de flujo continuo, adaptada a un monitor de absorbancia, donde se graficaba absorbancia contra volumen del agua de lixiviado.

3) .- ENSAYO ENZIMATICO

Las diferentes fuentes en las que se hizo el ensayo enzimático provenían de diversas materias primas locales y serán designadas como muestra A, B y C. El ARN utilizado era de Candida utilis (grado IV), comprado a Sigma Chemical Co. y fué reprecipitado varias veces con ácido perclórico al 10% con el objeto de eliminar pequeños oligonucleótidos. La concentración de enzima utilizada fué de 10 mg/ml, llevándose a cabo el ensayo enzimático a pH de 5.0 y de 8.5 y a las temperaturas de 37°C y 50°C, la reacción se detuvo con UPCA -- (acetato de uranio al 0.75% en ácido perclórico al 25%). El ensayo enzimático del ARN con RNasa T2 y con fosfodiesterasa de veneno de

vibora fué utilizado como testigo. Para calcular el porcentaje de hidrólisis ribonucleásica a diferentes concentraciones de enzimas se tomó como 100% la abosorbancia a 260 nm producida por ARN soluble y sin hidrolizar a la misma concentración y dilución de cada experimento.

4) .- METODO DEL CARBAZOL.

La determinación se realizó según el método de Dische (XXII), el cual se modificó ligeramente con la aplicación de temperatura de ebullición en baño maría, para un desarrollo más rápido de la reacción. Los nucleótidos 3' y 5' se diferenciaron por el color violeta de los 3' y el color azul-morado de los 5' desarrollados de una manera más rápida, ya que la temperatura hace aumentar la sensibilidad sin perder la especificidad de la reacción. Se utilizaron como patrones ARN así como los isómeros 3' y 5' de AMP y GMP.

5) .- CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHADEX.

La separación de los productos provenientes de la hidrólisis enzimática se llevó a cabo por medio de cromatografía en columna utilizando DEAE-Sephadex A25-150, empacado en una columna de dimensiones 8.4 x 1.2 cm. Se inyectaron 0.3 ml de muestra, eluyéndose con regulador de bicarbonato de amonio 0.01 M a pH de 8.5 con NaCl a diferentes concentraciones. La columna estaba conectada a un monitor de absorbancia ISCO y los productos separados se recolectaron en colector de fracciones LKB.

6) .- ENSAYO RIBONUCLEASICO Y PROTEOLITICO DE LEVADURAS.

Este ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: primeramente se extrajo el ARN de levadura de panificación por el método de calentamiento en medio alcalino (XXI), en el mismo medio de reacción se agregaron las muestra A, B y C de RNAsas, utilizando las temperaturas y pHs a los cuales se hizo el ensayo enzimático del ARN; además se utilizaron las enzimas nucleasa S1, RNasa pancreática y fosfodiesterasa de veneno como hidrolizados testigos; otro testigo fué el hidrolizado del ARN con NaOH. Al terminar esta in---

ubación se neutralizó el pH de los hidrolizados y se les agregó pa
paña; terminada la reacción se centrifugó el medio y el sobrenadante
te se liofilizó.

RESULTADOS

1) .- ADSORCION DE ARN Y AMP CON CELLEX-D (DEAE-CELULOSA).

En la figura 6 observamos la adsorción de ARN y AMP disueltos sin NaCl, en diferentes cantidades de resina, pero con una concentración fija de ARN o AMP o de sus mezclas.

Primeramente al ir adsorbiendo el AMP que se encuentra a una concentración de 0.12 mg/ml, vemos que conforme aumenta la concentración de resina la absorbancia del nucleótido disminuye en una gran proporción. Igualmente sucede con el ARN, el cual se probó a dos concentraciones: 0.33 mg/ml y 0.10 mg/ml; en la gráfica 6 observamos que a un volumen de 0.8 ml (2.4 mg) de resina se adsorbe todo el ARN que se encuentra a concentración mayor, mientras que a la concentración menor se puede adsorber todo con 0.4 ml (1.2 mg) de resina. Observamos que a una concentración de 2.4 y 4.8 mg de resina es posible adsorber casi todo el ARN, pero asimismo vemos que gran parte de un compuesto de PM menor como es el nucleótido AMP, se adsorbe también a esas mismas concentraciones, aunque es necesaria una concentración de resina un poco mayor para adsorber la mayor cantidad de nucleótido, comparada con el ARN.

2) .- ELUCION DE ARN, AMP Y UNA MEZCLA DE AMBOS DE CELLEX-D.

Para llevar a cabo esta prueba se seleccionó la concentración de resina, a la cual tanto el ARN como el AMP se adsorbieran so los, así como una mezcla de ambos, realizándose la elución de la resina con diferentes proporciones de NaCl como se observa en la figura 7. Observamos en ella que a la concentración más baja de NaCl, - que fué de 2.5%, se eluye la mayor parte del nucleótido, mientras - que la mayor parte del ARN queda en la resina, siendo necesaria una concentración de 15% de NaCl para eluir todo el ARN. Este mismo -- perfil muestra la mezcla, observándose primeramente la elución del - nucleótido y posteriormente la del ARN.

3) .- DETERMINACION DEL PM APROXIMADO DEL ARN EXTRAIDO DE LEVADURAS

Los resultados los observamos en la **figura 8**, donde se ve el espectro de elución del ARN extraído de levaduras, pasado a través de una columna empacada con Sephadex G-50, usándose como patrones de comparación dextrana azul, un compuesto de PM elevado y un nucleótido de PM menor. En la figura se grafica absorbancia a --- 260 nm contra volumen de elución y en ella observamos que el ARN -- extraído de levaduras consta de 2 fracciones principalmente, la mayor sale un poco después de que es eluida la dextrana azul y la segunda sale con el volumen de elución del AMP. Como se sabe la resina Sephadex G-50, tiene un rango de fraccionamiento entre 30,000 y 1,500 , ésto nos dice que la primera fracción que se muestra homogénea tiene un PM aproximado de 30,000 o un poco menos, en tanto -- que la segunda fracción esta formada por compuestos de PM menor de 1,500 , posiblemente pequeños oligonucleótidos de 3 o 4 mononucleótidos.

4) .- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA EN DIFERENTES MUESTRAS ENZIMATICAS CRUDAS DE ORIGEN INDUSTRIAL.

Esta actividad se determinó a pH ácido y alcalino y a las temperaturas de 37°C y 50°C, midiéndose espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260 nm.

En la figura 9 se ve la actividad de la enzima a pH de -- 8.5 y a la temperatura de 37°C, se graficó absorbancia contra concentración de enzima. En ella se observa que la actividad en las - 3 muestras es baja, acentuándose en la muestra C en la que casi es nula, en las otras 2 muestras se observa una actividad semejante -- entre ellas.

La figura 10 nos muestra la actividad a pH de 8.5 y a la temperatura de 50°C, aquí observamos que las muestras A y B de enzi mas aumentan su actividad, principalmente la muestra A, mientras -- que la muestra B aumenta notablemente su actividad a la concentración mayor de 10 mg/ml. Entre tanto la muestra C presenta un leve incremento en la actividad, pero en general sigue siendo escasa.

Al medir la actividad a pH de 5.0 y a temperatura de 37°C, en la figura 11 vemos que en las muestras A y B su actividad se asemeja a la medida en la figura 10, aunque es menor a concentraciones mayores de enzima. Es notable el cambio de la muestra C, la cual aumenta en gran proporción su actividad conforme aumenta la concentración de enzima.

La actividad de estas enzimas medida a pH de 5.0 y a temperatura de 50°C, es mostrada en la figura 12, siendo en estas condiciones donde se obtiene la actividad máxima de todas las enzimas, -- puesto que las muestras A y B obtienen su máxima actividad a la concentración más baja de enzima y la muestra C obtiene una actividad -- mayor que las 2 anteriores, pero a concentraciones más altas de enzima, aunque es de notar que a una concentración de 5 mg de enzima, ca si se obtiene la actividad máxima para todas las muestras.

5) .- APLICACION DEL METODO DEL CARBAZOL A LOS HIDROLIZADOS ENZIMATICOS.

Este método se aplicó a los productos de la reacción entre el ARN y las muestras A, B y C, comparando con productos de enzimas -- de actividad conocida, así como con nucleótidos conocidos. Este mé-- tado, como se sabe, tiene la capacidad de diferenciar distintos azúcares, por lo tanto tiene la propiedad de reaccionar con la ribosa de los nucleótidos con diferentes colores, dependiendo de la posición -- del grupo fosfato en la pentosa. De esta manera reacciona con los -- nucleótidos 3' tomando un color violeta y con los nucleótidos 5' to-- ma un color azul-morado, siendo los dos perfectamente diferenciables a simple vista cuando reaccionan puros y es de notar que en mezclas el color que predomina es el color violeta de los nucleótidos 3'. Pero, como se ve en la figura 13, donde se nos muestra el espectro de absorción de estos compuestos, éste es diferente tanto en los nucleótidos 3', como en los nucleótidos 5', siendo también diferenciable -- la mezcla de los 2 isómeros por la relación de absorbancias a 540 nm y a 680 nm, ya que como se observa, la absorción de los nucleótidos 3' a 540 nm es mucho mayor que la de los nucleótidos 5', pero a 680 nm es al contrario, puesto que la absorbancia de los nucleótidos 5' es mayor que la de los nucleótidos 3'. También es importante notar que el espectro de absorción del ARN sin hidrolizar es semejante al

de los nucleótidos 3', teniendo un máximo de absorbancia a 540 nm -- aproximadamente, aunque es menor a la de los nucleótidos 3', siendo -- escasa su absorción a 680 nm.

Al aplicarse esta reacción a los hidrolizados enzimáticos, -- se obtenían resultados variables, inclusive con los hidrolizados pro -- venientes de enzimas de actividad conocida utilizadas como patrones, como fueron la fosfodiesterasa de veneno, la nucleasa S1 y la RNasa pancreática, dado lo cual se buscó una manera de separar los mononucléotidos de pequeños oligonucleótidos no hidrolizados para lograr -- una mejor diferenciación entre ellos unicamente por medio de la reac -- ción colorimétrica.

6) .- SEPARACION DE LOS PRODUCTOS PROVENIENTES DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA.

El método de separación escogido fué por medio de cromato -- grafía en columna utilizando DEAE-Sephadex como soporte, esta resina tiene la característica de combinar las propiedades de una resina de intercambio iónico y las propiedades de separación en base a PM de -- Sephadex. Esta columna fué previamente calibrada con ARN de levadura sin hidrolizar y con GMP, así como con una mezcla de ambos. Los -- resultados los podemos apreciar en la figura 14, en la cual vemos -- que la mayor parte del ARN necesita una concentración de 5% de NaCl para ser eluida, mientras un nucleótido como es GMP, es eluido prime -- ramente con una concentración de 1.25% de NaCl, esto hace posible la separación de mononucleótidos y oligonucleótidos de mayor PM, como -- lo observamos en la parte inferior de la gráfica, donde se separa una mezcla de GMP y ARN no hidrolizado.

Calibrada la columna se procedió a pasar las muestras pro -- venientes de los hidrolizados; los espectros de elución de estos hidrolizados son mostrados en las figuras 15,16,17 y 18. A las frac -- ciones eluidas se les hizo la reacción de carbazol, además al ser -- graficadas en un monitor de absorbancia, se pudieron integrar expresándose los resultados en la tabla I, donde se nos muestran los dife -- rentes porcentajes resultantes de la hidrólisis enzimática eluidos a diferentes concentraciones de NaCl. Esto es de gran ayuda para cal -- cular el porcentaje correcto producido de nucleótidos 5', en base a la proporción de nucleótidos provenientes de la hidrólisis.

7) .- PORCENTAJE DE PRODUCCION DE NUCLEOTIDOS 5'.

Para hacer el cálculo del porcentaje de producción de nucleótidos 5' producidos se preparó una curva estándar con diferentes proporciones de nucleótidos 3' y 5' AMP y GMP, esta curva, como se muestra en la figura 19, sigue aproximadamente una recta, así de esta forma se extrapoló ésta a la reacción de la RNasa T2 y de la fosfodiesterasa de veneno. La RNasa T2 como sabemos, produce nucleótidos 3', mientras que la fosfodiesterasa de veneno, produce nucleótidos 5' únicamente, al hacer las reacciones de carbazol a los productos de los hidrolizados de estas 2 enzimas, eluidos en la columna de DEAE-Sephadex con 1.25% de NaCl, podemos extrapolar diciendo que la lectura aportada por los productos de la RNasa T2, corresponden a -- 100% de nucleótidos 3', mientras que los aportados por la fosfodiesterasa de veneno, corresponden a 100% de nucleótidos 5'.

Estos 2 puntos se nos muestran unidos en la figura 19, -- dándonos una recta, la cual utilizaremos como estándar para calcular el porcentaje de nucleótidos producidos por las muestras A, B y C. - En esta figura se grafica el logaritmo natural de los productos del coeficiente $\frac{A540}{A680}$, al cual se llamará R, contra las diferentes proporciones de nucleótidos 3' y 5' de AMP y GMP. Al realizar la reacción de carbazol a los productos de las reacciones, se calcula el valor R extrapolándose a la curva estándar, dándonos los valores mostrados - en la tabla II. Como se observa en esta tabla los resultados son -- subestimados aparentemente en la recta de las enzimas, siendo mayores al ser extrapolados en la recta de los nucleótidos, pero serán tomados los valores de la recta de las enzimas por ser considerados los más correctos. En estos datos observamos que la mayor producción de nucleótidos 5' es a una temperatura de 50°C y pH de 8.5 y a la -- temperatura de 37°C y pH de 5.0, en ellas se observa que las muestras A y C de enzimas son las que aportan la mayor actividad ribonucleásica productora de nucleótidos 5'.

8) .- PORCENTAJE DE HIDROLISIS Y PRODUCCION DE NUCLEOTIDOS 5' A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA.

Una vez determinado el porcentaje de producción de nucleótidos 5' por las diferentes muestras de enzimas, se reunieron todos estos datos elaborándose las tablas III y IV, donde se nos muestra el porcentaje de hidrólisis a diferentes concentraciones de enzima, así

como la producción de nucleótidos y el porcentaje de nucleótidos 5' a diferentes temperaturas y pHs.

El porcentaje de hidrólisis fué calculado comparando en base a la absorbancia proporcionada por la misma cantidad de ARN no hidrolizado, ésta fué tomada como 100% y así, una vez obtenida la lectura de los hidrolizados de las enzimas a investigar se calculó el porcentaje. Después se estimó el porcentaje de producción de nucleótidos, en base a la elución de los hidrolizados aplicandose a las -- diferentes proporciones de hidrolizados enzimáticos. Una vez separados los nucleótidos se les aplicó la reacción de carbazol para calcular, según su absorbancia a 540 y 680 nm, el porcentaje de nucleótidos 3' y 5' producidos.

Estos datos son mostrados conjuntamente en las tablas III y IV; en la tabla III observamos que la actividad ribonucleásica a pH de 8.5 y a la temperatura de 37°C es baja en las muestras A y B y casi nula en la muestra C, siendo baja también la producción de nucleótidos 5'; mientras tanto a pH de 5.0 y a la temperatura de 37°C, las muestras A y B aumentan un poco más el porcentaje de hidrólisis y la muestra C lo aumenta considerablemente; al mismo tiempo el porcentaje de producción de nucleótidos 5' aumenta en las muestras A y C, siendo menor en la muestra B.

La tabla IV nos muestra que a pH de 8.5 y temperatura de 50°C la muestra A alcanza un buen porcentaje de hidrólisis y de producción de nucleótidos 5'; la muestra B tiene un porcentaje de hidrólisis bueno, pero no va acompañado de una buena producción de nucleótidos 5'; al mismo tiempo la muestra C, en estas condiciones, tiene una actividad muy baja, siendo por lo tanto escasa la producción de nucleótidos 5'. En esta tabla vemos también que a pH de 5.0 y a la temperatura de 50°C se obtienen los mayores porcentajes de hidrólisis y producción de nucleótidos a bajas concentraciones de enzimas, como vemos en las muestras A y B, pero la producción de nucleótidos 5' es un poco baja en la muestra A, acentuandose más en la muestra B la muestra C es la que presenta mayor actividad ribonucleásica, pero esta actividad no va acompañada de una buena producción de nucleótidos 5', siendo ésta un poco baja.

DISCUSION

Observando los resultados vemos que al intentar separar - el ARN de un nucleótido, como es AMP, la adsorción del ARN siempre va acompañada de un cierto porcentaje del nucleótido, no siendo posible la total separación de los 2 compuestos por medio de la resina. Esto nos lleva a utilizar la concentración de resina a la cual los 2 compuestos son adsorbidos completamente, para eluirlos variando la fuerza iónica, viendo que los resultados nos dicen que una manipulación adecuada de la fuerza iónica hace que el ARN y el AMP -- puedan ser eluidos y adsorbidos de la resina con relativa facilidad para ser separados completamente. Esto nos hace pensar que este método puede ser un medio de recuperación del ARN extraído de levadura por el método de Gómez y Viniegra (XXI), adicionando la cantidad adecuada de resina y ajustando la fuerza iónica del medio, agregando NaCl para recuperar el ARN, sin adsorber compuestos de PM menor. Es importante hacer notar que la resina fué utilizada en suspensión puede ser adicionada en polvo al medio que se encuentre en un tanque de sedimentación, lo cual ahorraria tiempo de operación, que a un nivel de producción mayor sería de gran ayuda; o también este hecho nos lleva a proponer la utilización de filtros, los cuales con una concentración adecuada de resina y variando la fuerza iónica, adsorberían y eluirían a voluntad el ARN, separándolo de compuestos de menor PM pasados através del filtro, siendo éste un método atractivo de recuperación y separación del ARN extraído de levaduras, -- aunque existe la posibilidad de investigar métodos más sencillos o económicamente más atractivos que ya estan siendo evaluados en nuestro laboratorio.

Una vez encontrado un posible método de recuperación del ARN se investigó si el ARN extraído de levaduras podría ser útil en la obtención de nucleótidos saborizantes, viendo si tienen un PM adecuado. Como se ve en los resultados el ARN esta formado por dos -- fracciones, la primera son oligonucleótidos más o menos grandes y la segunda son pequeños oligonucleótidos de 4, 3, 2 nucleótidos o mononucleótidos, esto nos indica que las 2 fracciones pueden ser -- utilizadas para su hidrólisis enzimática y además aquí se le puede aplicar el método de recuperación con la resina Cellex-D, el que -- nos ayudaría a separarlo de otros compuestos y poderlo utilizar pa-

ra la producción de nucleótidos 5'.

La hidrólisis enzimática nos muestra que a determinadas condiciones de temperatura y de pH se puede obtener una actividad ribonucleásica muy grande, siendo ésta mayor a la temperatura de 50°C y -- pH de 5.0 en las 3 muestras de enzima, llegando a alcanzar un porcentaje alto de hidrólisis en las diferentes concentraciones usadas, como se muestra en las gráficas de los hidrolizados y en las tablas I, III y IV; asimismo observamos en los otros ensayos que la temperatura de 50°C y pH 5.0 son los más favorables para la actividad ribonucleásica, mientras que cuando estas condiciones faltan, o sea a la temperatura de 37°C y a pH de 8.5 juntos, la actividad es baja en -- las 3 muestras de enzimas siendo casi nula en la muestra C tal como se observa en las tablas.

La reacción de Carbazol no funcionó con los productos provenientes directamente de los hidrolizados enzimáticos de las muestras A, B, y C, este hecho se produjo seguramente porque los hidrolizados estaban compuestos, además de mononucleótidos, por dinucleótidos, trinucleótidos, etc. los cuales al reaccionar con el carbazol, impedían hacer una diferenciación adecuada de los mononucleótidos por el color, que era aportado también por otros oligonucleótidos. Por lo tanto se consideró necesaria la separación de mononucleótidos de los otros compuestos, calculando así el porcentaje correcto de nucleótidos 5' en base a la proporción de mononucleótidos (3' y 5') producida, calculada gracias a la integración de los espectros de elución que nos proporcionaban los compuestos al ser eluidos a través de -- DEAE-Sephadex.

Para calcular el porcentaje de nucleótidos 5', se utilizó la curva estandar preparada con nucleótidos y otra con hidrolizados provenientes de enzimas de actividad conocida, como son la fosfodiesterasa de veneno que produce únicamente nucleótidos 5' y la RNasa T2 - que produce nucleótidos 3'; esta última fue tomada como la gráfica a escoger para hacer el cálculo de la producción 5', extrapolando los resultados de los hidrolizados de las 3 muestras y se escogió esta - curva por ser el resultado de la hidrólisis enzimática del ARN, en las mismas condiciones en las que se realizó la hidrólisis de las 3 muestras; en tanto que la otra curva hecha con nucleótidos, a pesar de que nos producía valores más altos, se utilizó únicamente para --

ver la tendencia aproximada que debería seguir la curva hecha con las enzimas. Estos resultados nos muestran un hecho importante, -- que la máxima producción de nucleótidos 5', no va acompañada de la máxima actividad ribonucleásica, ya que la temperatura de 50°C y -- pH de 8.5, la muestra A tiene una buena producción de nucleótidos 5' en tanto que las otras 2 muestras presentan baja producción; a la temperatura de 37°C y pH 5.0, se obtiene un porcentaje alto de nucleótidos 5', aportado por las muestras A y C, mientras que la muestra B presenta escasa productividad.

Al reunir todos estos resultados se pudieron elaborar las tablas III y IV las que nos muestran, en base a la cantidad de enzima el porcentaje de hidrólisis, de mononucleótidos y el de nucleótidos 5'. Al analizar la producción de las 3 muestras de enzimas observamos que las muestras a escoger son las muestras A y C, puesto que la muestra B si tiene actividad ribonucleásica, pero esta orientada hacia la producción de nucleótidos 3'. Esta producción posiblemente pudiera ser aumentada si dieramos más tiempo a la reacción enzimática, ya que si vemos la tabla I, a la concentración de 2.5% de NaCl que es donde se eluyen seguramente pequeños oligonucleótidos, estos pudieran ser incubados por un tiempo mayor, para ver si es posible producir un poco más de nucleótidos 5' estimulando la hidrólisis.

Estas muestras estan en forma cruda, por lo cual se puede partir de aquí para lograr su purificación, pues los resultados -- nos indican que son una mezcla de diversas RNAsas, pues vemos que la temperatura y el pH son factores decisivos en algunas de ellas, pues ya vimos que la máxima actividad ribonucleásica la encontramos a pH de 5.0 y a la temperatura de 50°C, pero la máxima producción de nucleótidos 5', la encontramos a pH de 5.0 y temperatura de 37°C y a pH de 8.5 y temperatura de 50°C; esto nos dice que tenemos una mezcla de RNAsas, pero las productoras de nucleótidos 5' necesitan, como se ve, un pH bajo acompañado de una temperatura baja o un pH alto y temperatura alta, en tanto que las otras condiciones estimulan a las RNAsas productoras de nucleótidos 3' o no estimulan ningún tipo de RNasa.

El hecho de saber si es necesaria o no una purificación, se va a decidir después de evaluar la capacidad potenciadora de los -

hidrolizados o después de probar el saborizante producido con la hidrólisis ribonucleásica y proteolítica de las levaduras, que busca la combinación de aminoácidos tales como ácido glutámico, cisteína, lisina y glicina, con nucleótidos como 5'AMP y 5'GMP, para producir un saborizante más efectivo. Este ensayo busca combinar las propiedades potenciadoras de sabor de los nucleótidos y aminoácidos que, como ya sabemos, es sinérgica. En estudios realizados anteriormente (XXIII), se supo que las levaduras a las cuales era extraído su ARN con el método de calentamiento en medio alcalino aumentaban su digestibilidad, por eso, hidrolizando el ARN e hidrolizando la proteína de la levadura que es más digerible, se busca combinar los 2 productos que pudieran ser utilizados conjuntamente como saborizantes o potenciadores de sabor, pero la evaluación de la capacidad saborizante se vera en proximas investigaciones.

El experimento anterior nos hace pensar en 2 alternativas, -- la producción de proteína unicelular conjuntamente con nucleótidos saborizantes o como nos propone el experimento, producir unicamente saborizantes mezclados ¿ Cual es la decisión más acertada ? una --- respuesta a esta cuestión la podemos encontrar en un análisis de -- costos para la producción de proteína unicelular y nucleótidos a -- partir de de melaza de caña, realizado en este laboratorio (XX), donde de se observa que el desarrollo de fabricas productoras de levadura a pequeña escala resultaría difícil por el alto costo del equipo -- utilizado, pero sí a esta producción se le integra la obtención de saborizantes a partir del ARN extraído de levaduras, haría que la - tecnología de producción fuera más costeable. Esto nos dice que la alternativa a escoger sería la combinación de los 2 procesos, en -- donde a una producción alta de proteína se le daría preferencia sobre la producción de saborizantes, mientras que a una baja produc-- ción de proteína unicelular, una producción alta de saborizantes se ría lo que haría más costeable la producción de proteína.

CONCLUSIONES

La revisión de estos datos nos lleva a proponer las siguientes conclusiones:

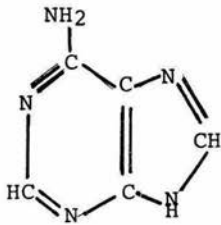
- 1.- Se encontró un método sencillo de adsorción del ARN extraído de levadura por calentamiento en medio alcalino, en el cual se puede adsorber y eluir el ARN de una resina de intercambio iónico, separándolo de compuestos de menor PM, como son los mononucleótidos, variando la fuerza iónica.
- 2.- El ARN extraído puede ser utilizado para la obtención de nucleótidos saborizantes, puesto que este compuesto de oligonucleótidos de PM relativamente alto.
- 3.- En las muestras A, B y C de enzimas estudiadas se encontró un -- buen porcentaje de actividad ribonucleásica, principalmente a temperaturas altas y pH bajos.
- 4.- Se desarrolló un método de separación de los productos provenientes de la hidrólisis enzimática, con la resina DEAE-Sephadex, con el objeto de separar pequeños oligonucleótidos de mononucleótidos, para el análisis de estos últimos por medio de la reacción de carbazol.
- 5.- El porcentaje de producción de nucleótidos 5', se calculó con la reacción de carbazol, encontrándose que las muestras A y C, son -- las muestras enzimáticas con mayor producción de nucleótidos saborizantes, a las temperaturas de 50°C y pH de 8.5 y a la temperatura de 37°C y pH de 5.0, viéndose que la mayor producción de nucleótidos 5' no se produce cuando existe mayor actividad ribonucleásica. Las muestras A y C pueden ser el origen de la purificación de RNAsas que produzcan nucleótidos 5' ya que son una mezcla de RNAsas.
- 6.- Las levaduras nos pueden servir como fuente de abastecimiento de proteína unicelular y como fuente de saborizantes. La preferencia de mayor producción de alguno de los productos será en base a la demanda y a los recursos de producción.

BIBLIOGRAFIA

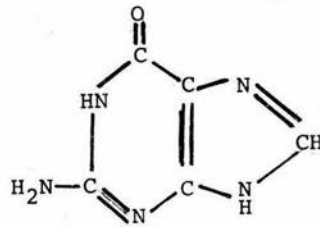
- I .- Mahler R. Henry, Biological Chemistry, 2a. Edition,
Harper and Row Publishers, U.S.A. (1966).
- II .- Lehninger, Albert L., Biochemistry, Worth Publishers,
Inc., New York (1970).
- III .- Wilkins, M.H.F. et al, Nature 172, 759 (1953).
- IV .- Watson, J.D. and Crick, T.H.C., Nature 171, 737 (1953).
- V .- Davison, J.N. The Biochemistry of Nucleic Acids, Chapman
and Hall, London (1972).
- VI .- Heppel, L.A. Ann. Rev. Biochem. 27, 613 (1958).
- VII .- Gutte, B and Merrifield, R.B.J. Amer. Chem. Soc. 91 , 501
(1969).
- VIII .- Razzel, W.E. Methods in Enzimology, Vol. XII (32).
- IX .- Tanaka, Kentaro J. of Biochemistry 50, 62 (1961).
- X .- Barnard, E.A. Ann. Rev. Biochem. 38, 677 (1969).
- XI .- Reddi, K. Methods in Enzimology Vol. XII (33).
- XII .- Linn, Stuart Methods in Enzimology Vol. XII (31).
- XIII .- Ando.T. Biochimica et Biophysica Acta 114, 158 (1966).
- XIV .- Razzel, W.E. and Khorana, H.G.J. Biol. Chem. 234, 2105
(1959).
- XV .- Barker, Robert Organic Chemistry of Biological Compounds
Prentice - Hall Inc, New Jersey (1971).
- XVI .- Shultz, Day and Libby The Chemistry and Phisiology of
Flavors, The A.V.I. Publishing Co. Inc, (1967).

- XVII .- Kuninaka, Akira, Flavor Chemistry, Cap. XV, Advances in Chemistry Series 56, American Chemical Society (Publications). Washington D.C. (1966).
- XVIII .- Yoshiaki, A. and Yamaguchi, K. Nippon Nogei Kagakai Kaishi (Japan) 43, 375 (1969).
- XIX .- Nakao, Y and col. Agr. Biol. Chem. 28, 151 (1964).
- XX .- Peschard, E y Viniegra, G. Primer Congreso de Química de América del Norte, México (1975).
- XXI .- Gómez H., J. y Viniegra, G. Primer Congreso de Química de América del Norte, México (1975).
- XXII .- Dische, Z. and Borenfreund E. J. Biol. Chem. 192, 583 (1951).
- XXIII .- Cordero, A.S.. Primera Reunión Internacional sobre la Utilización de la Caña de Azúcar en la Alimentación Animal, junio 1976, Veracruz, Ver.

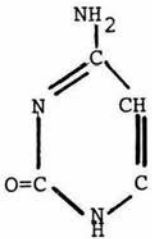
A P E N D I C E



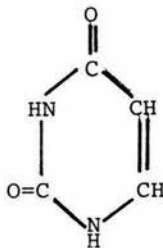
ADENINA
(6-amino-purina)



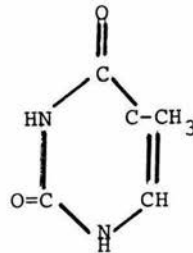
GUANINA
(2-amino-6-oxi-purina)



CITOCINA
(2-oxi-4-amino-
pirimidina)



URACILO
(2,4-dioxi-pirimi-
dina)



TIMINA
(5-metil-2,4-dioxi-
pirimidina)

FIGURA 1

Estructura de las principales bases nitrogenadas púricas y pirimidicas componentes de los ácidos nucleicos, ADN y ARN.

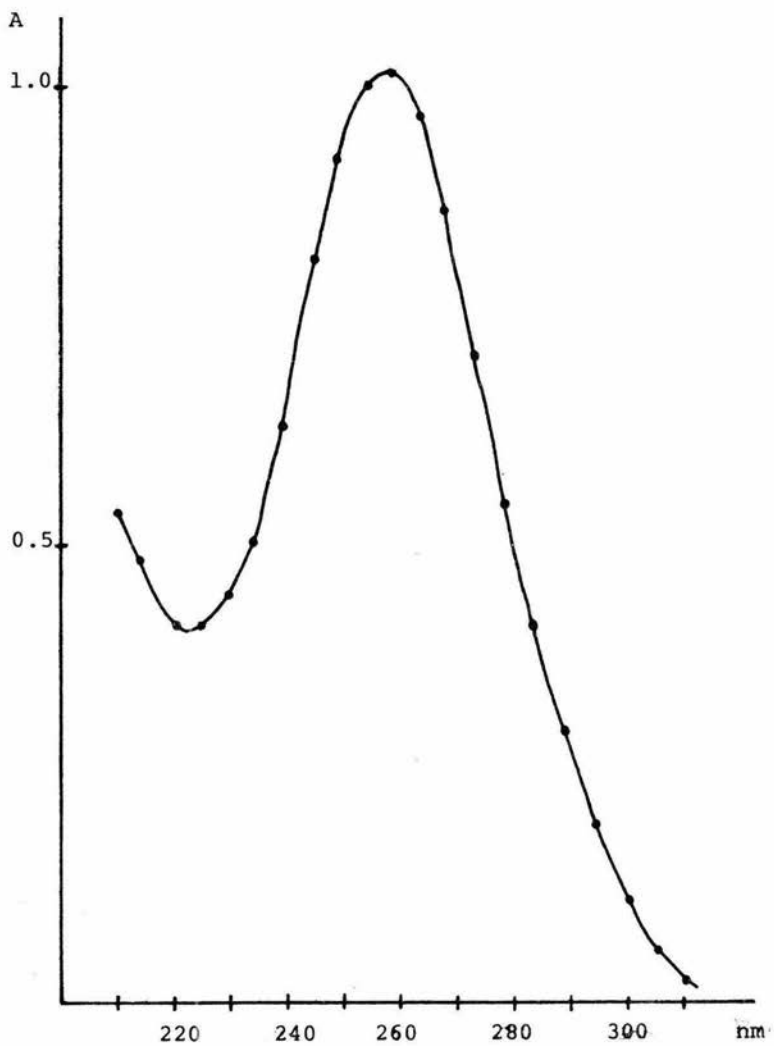


FIGURA 2

Absorbancia en la región ultravioleta de los ácidos nucleicos

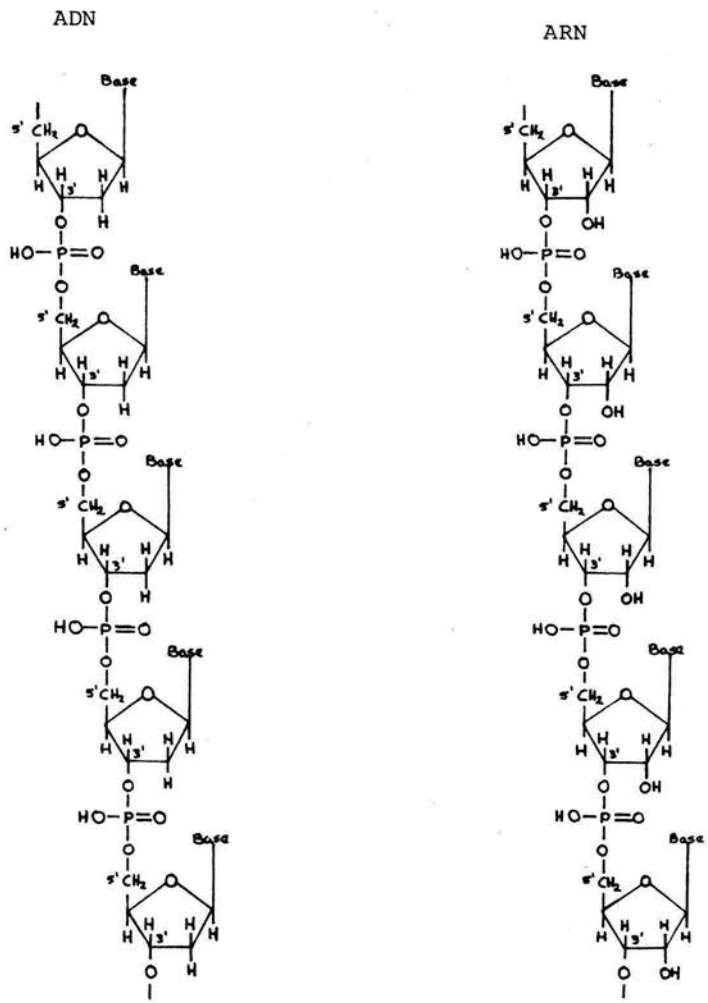


FIGURA 3

Esquema de una cadena de ADN y de ARN

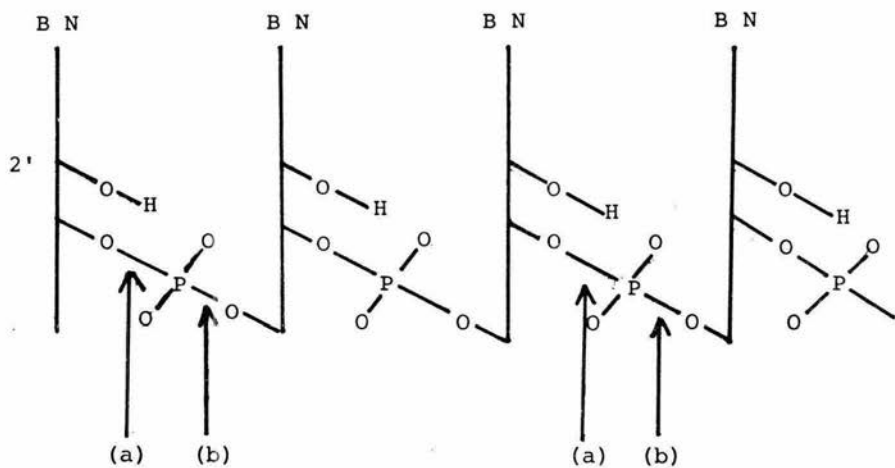


FIGURA 4

Esquema de los sitios de ataque enzimático del ARN

Hidrólisis del ADN

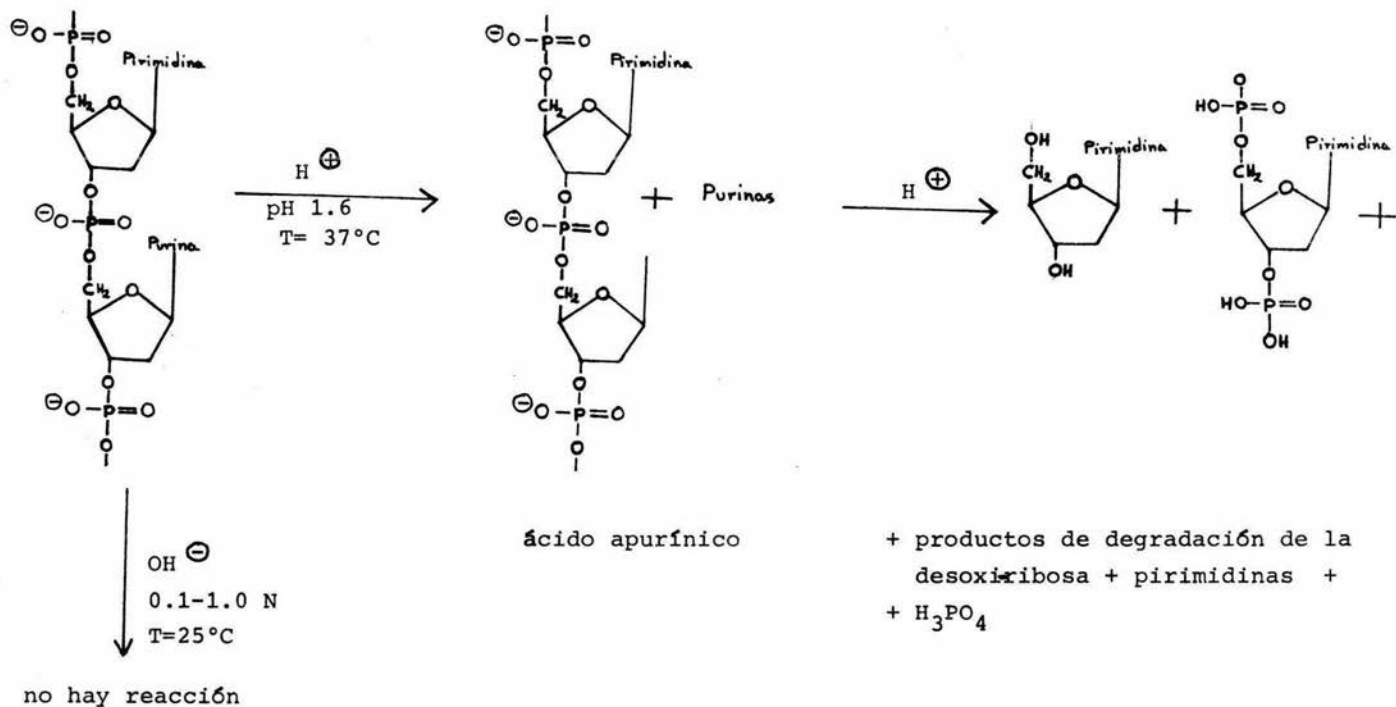


FIGURA 5

Hidrólisis química de ácidos nucleicos

Hidrólisis del ARN

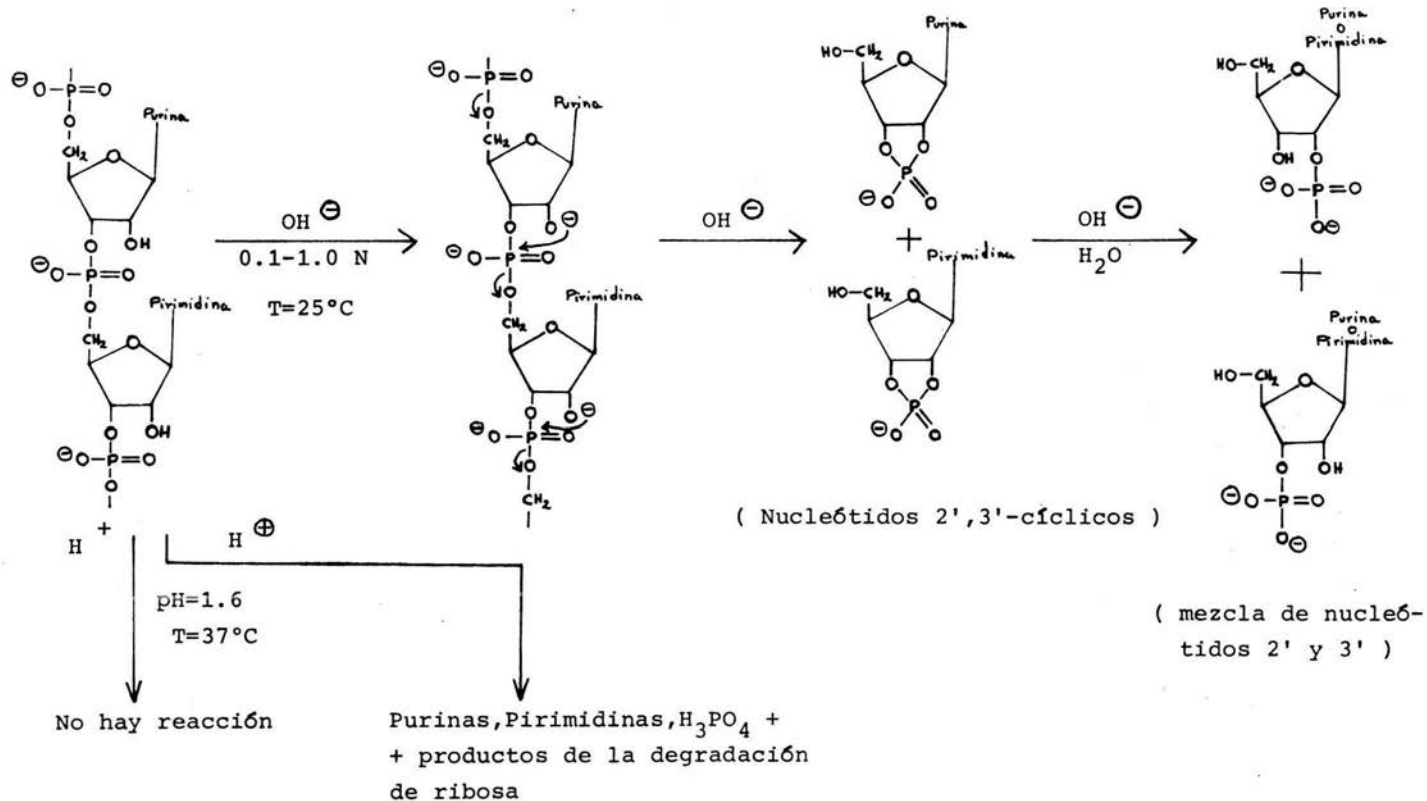


FIGURA 5

ADSORCION DE ARN Y 5'AMP A DIFERENTES VOLUMENES DE RESINA (Cellex D) AL 0.3 %

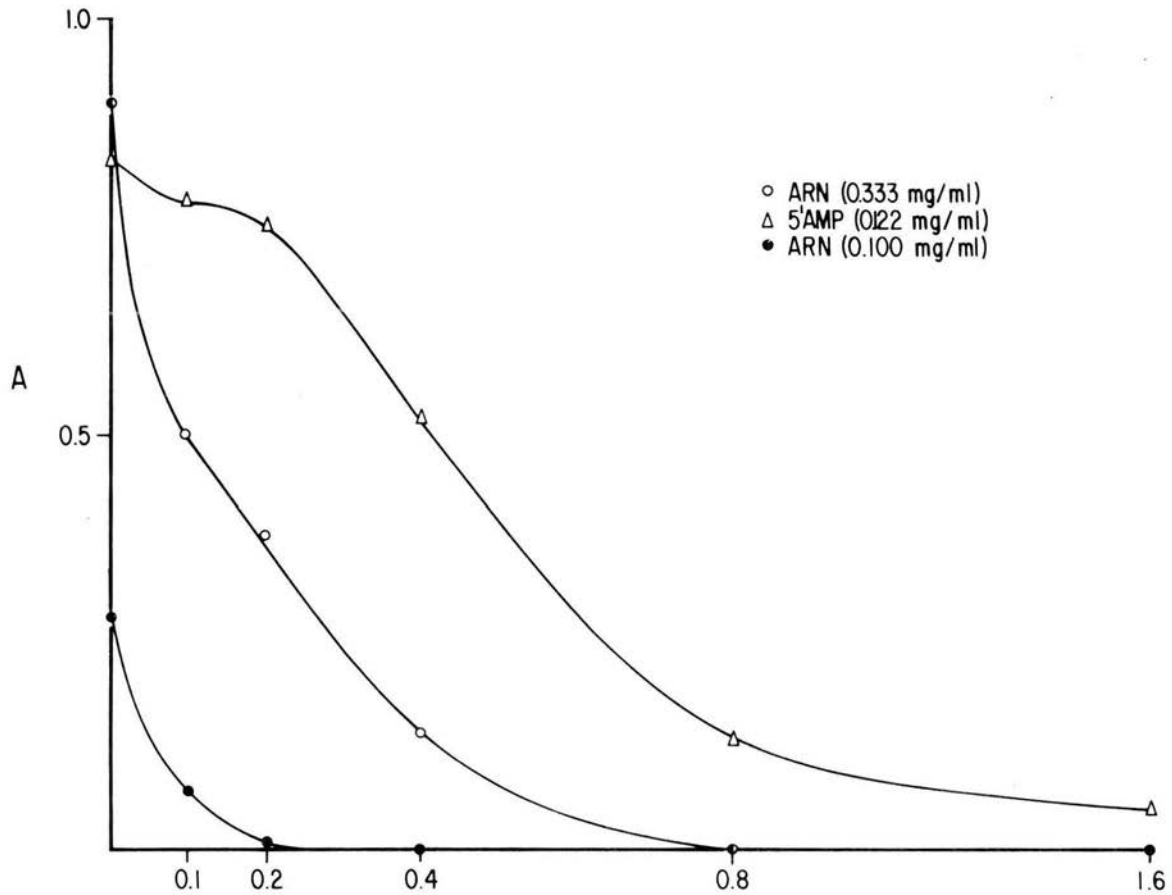
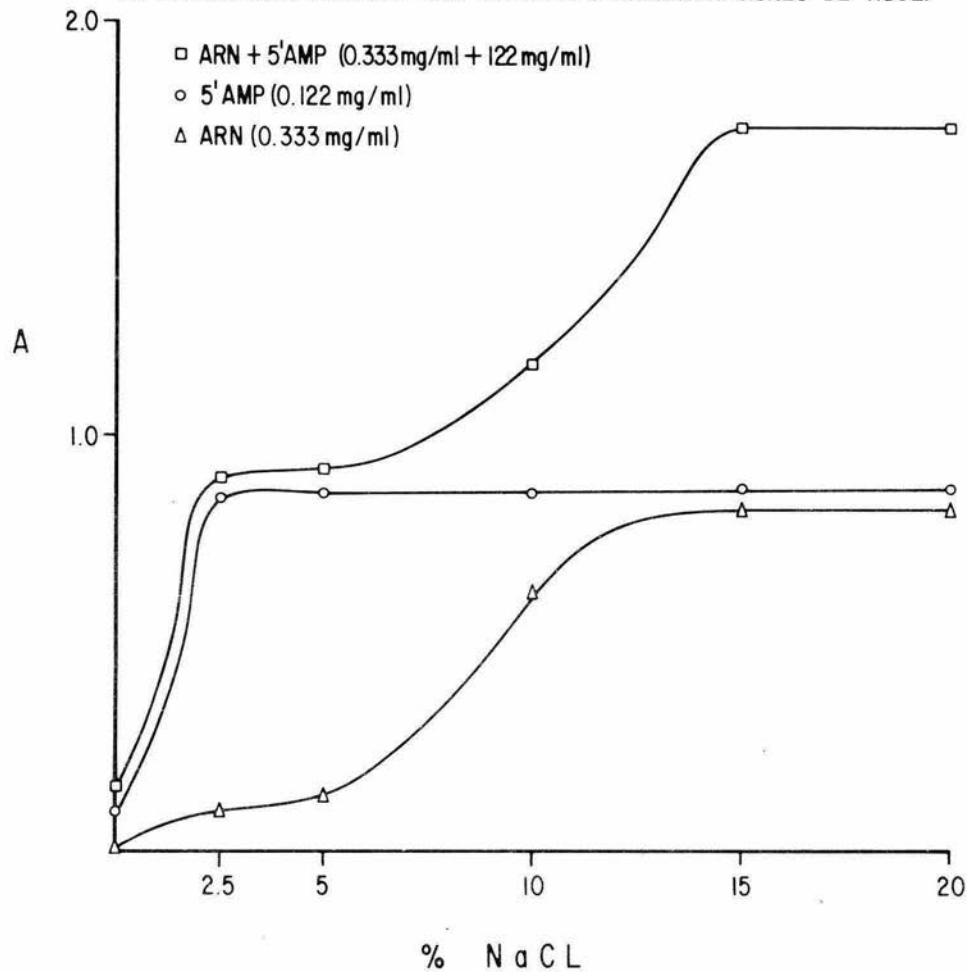


FIGURA 6

ELUCION DE RNA, 5'AMP Y UNA MEZCLA DE LOS 2 EN UNA RESINA DE INTERCAMBIO ANIONICO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl.



% NaCl
FIGURA 7

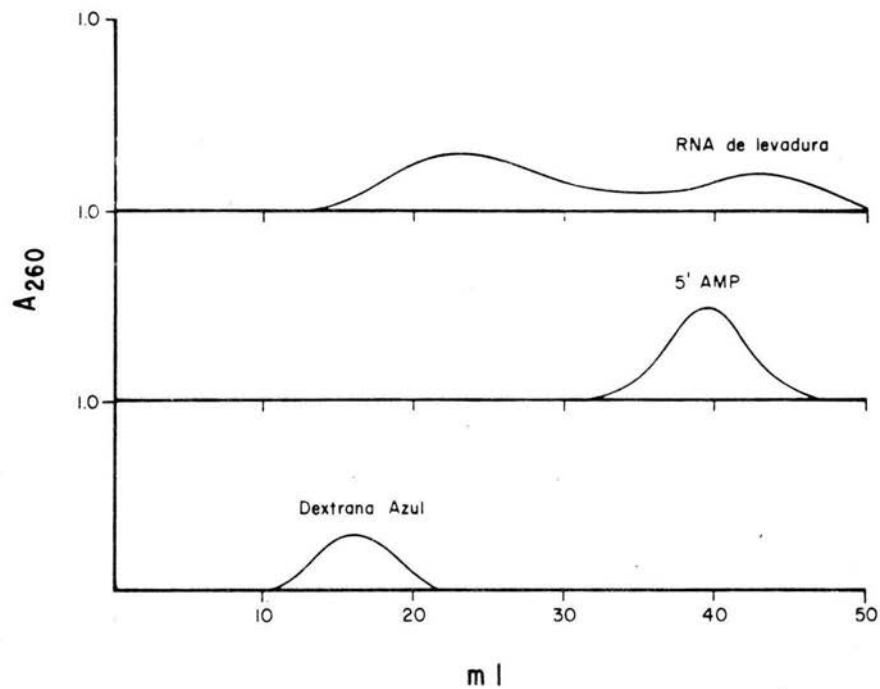


FIGURA 8

Espectro de elución de ARN extraído de levadura a través de Sephadex G-50.

ENSAYO RIBONUCLEASICO CON ARN DE LEVADURA CON DIFERENTES FUENTES DE ENZIMA.

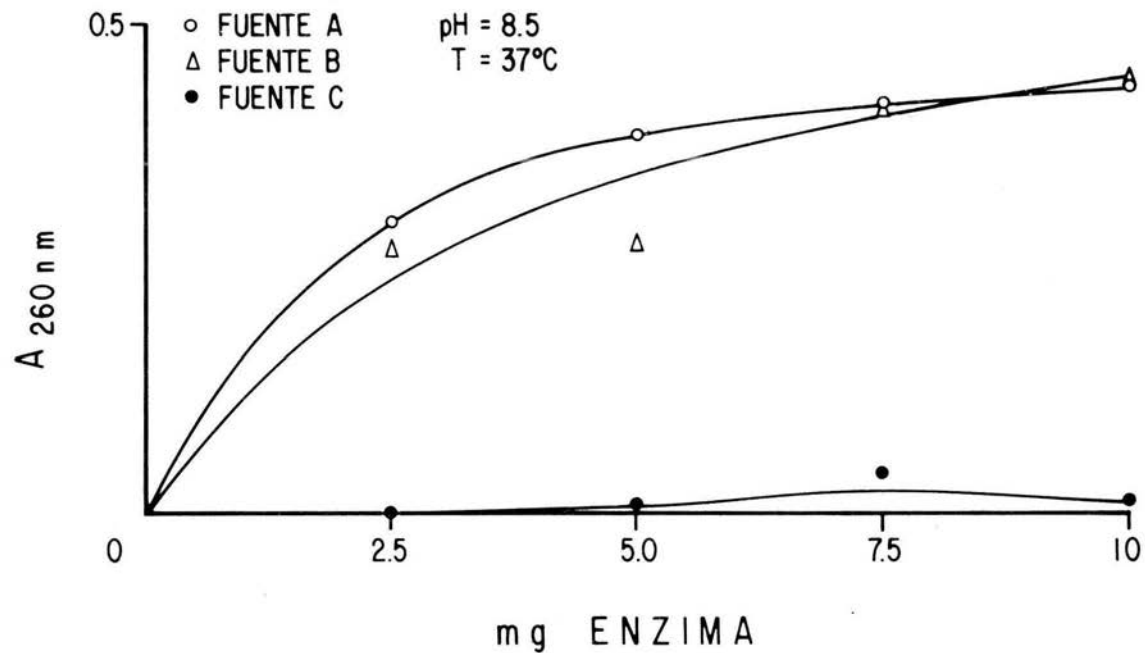


FIGURA 9

ENSAYO RIBONUCLEASICO CON ARN DE LEVADURA CON DIFERENTES FUENTES DE ENZIMA.

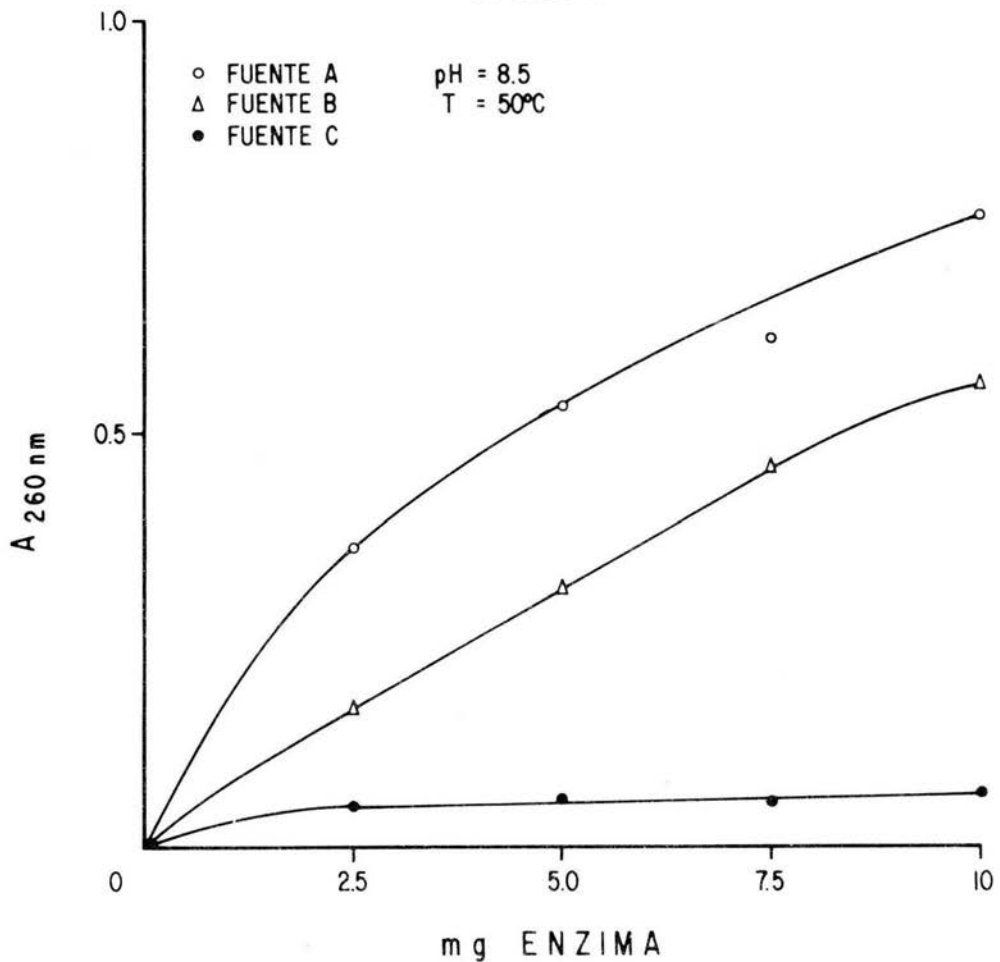


FIGURA 10

ENSAYO RIBONUCLEASICO CON DE LEVADURA CON DIFERENTES FUENTES DE ENZIMA.

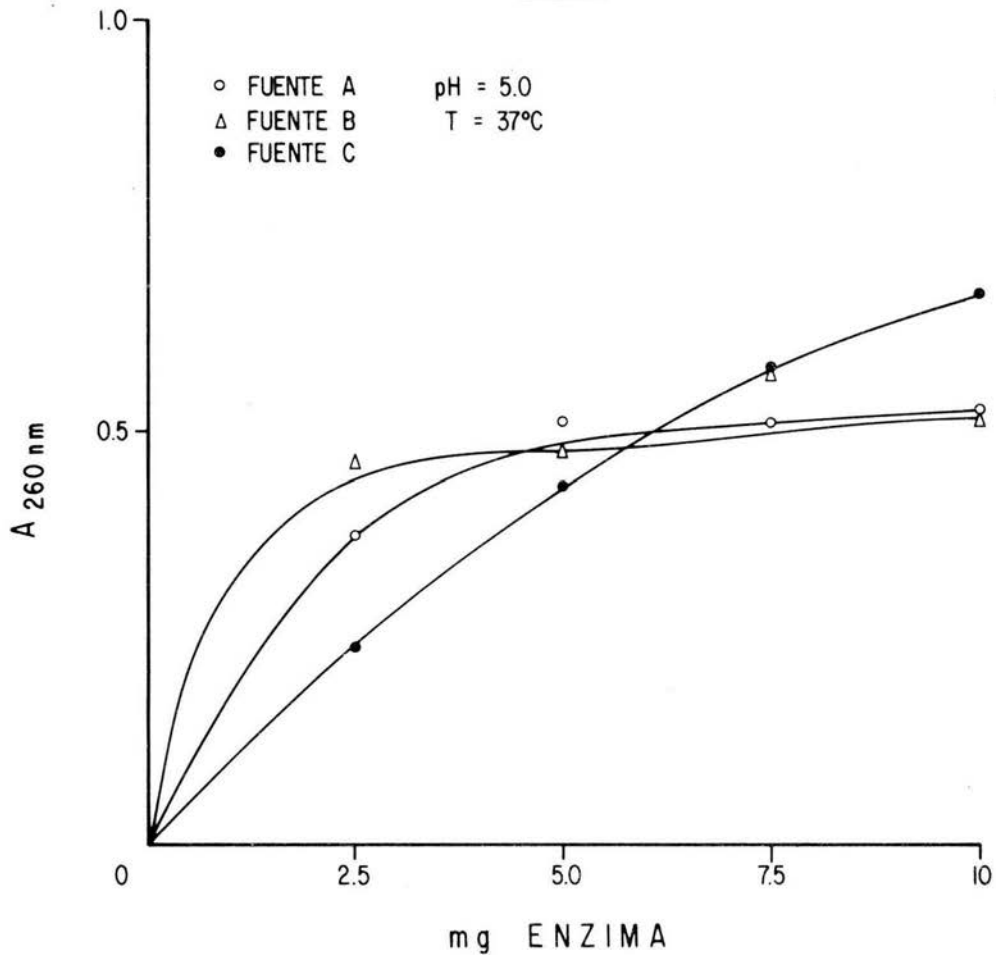
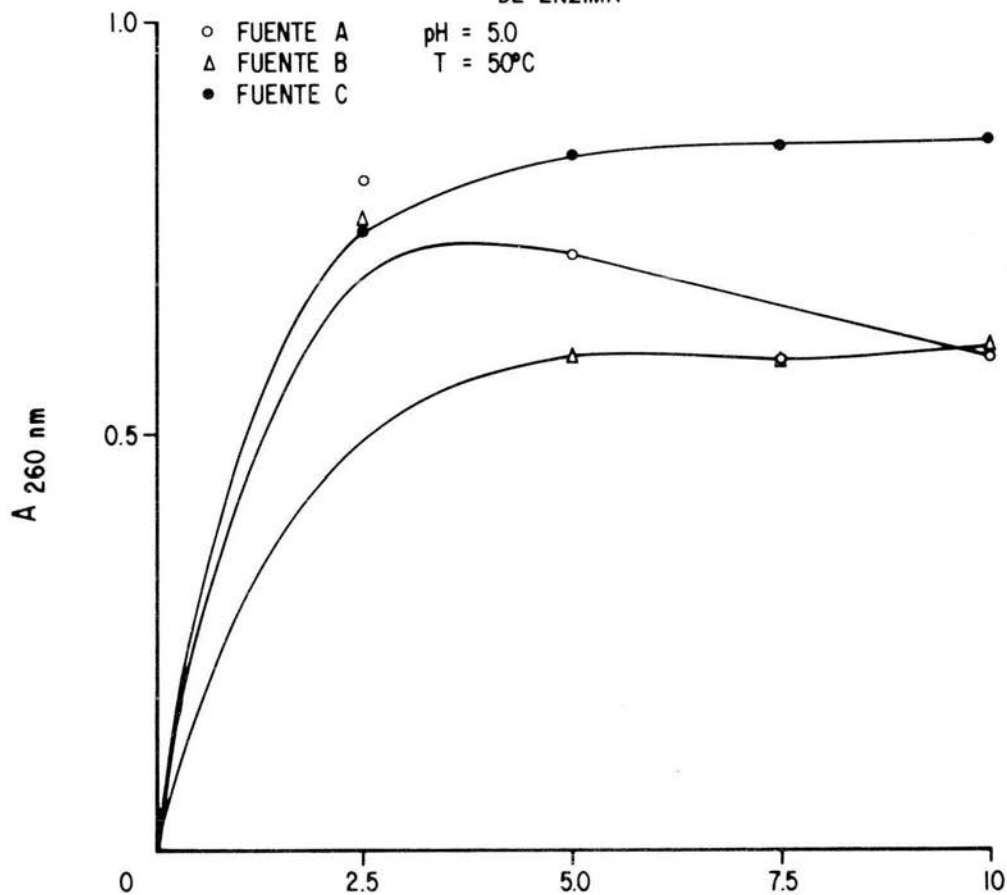


FIGURA 11

ENSAYO RIBONUCLEASICO DE ARN DE LEVADURAS CON DIFERENTES FUENTES
DE ENZIMA



mg ENZIMA
FIGURA 12

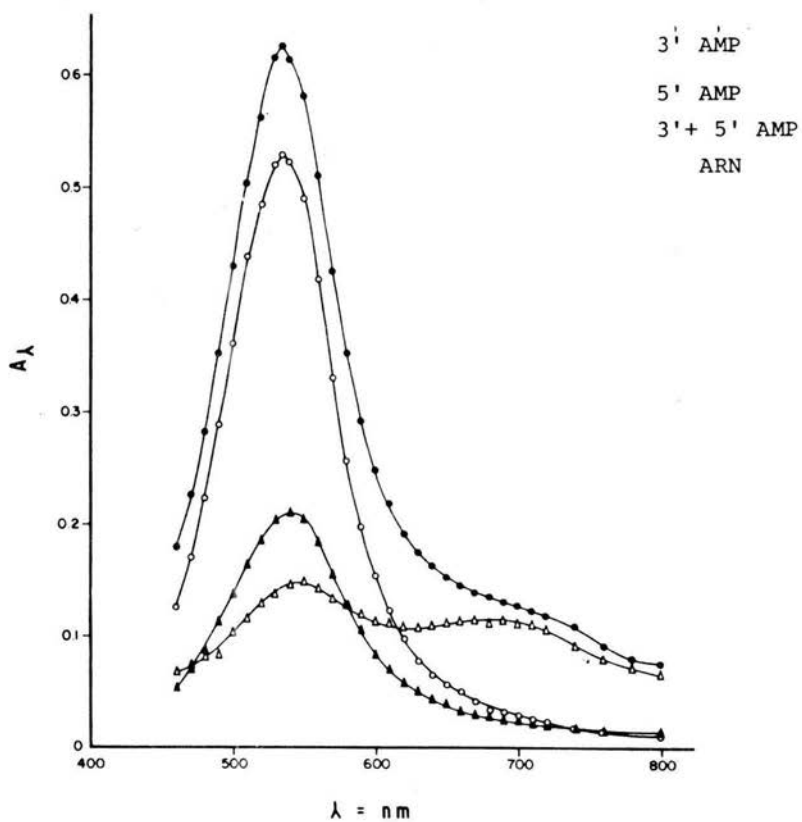


FIGURA 15

Espectro de absorción de nucleótidos y ARN con la reacción de carbanol.

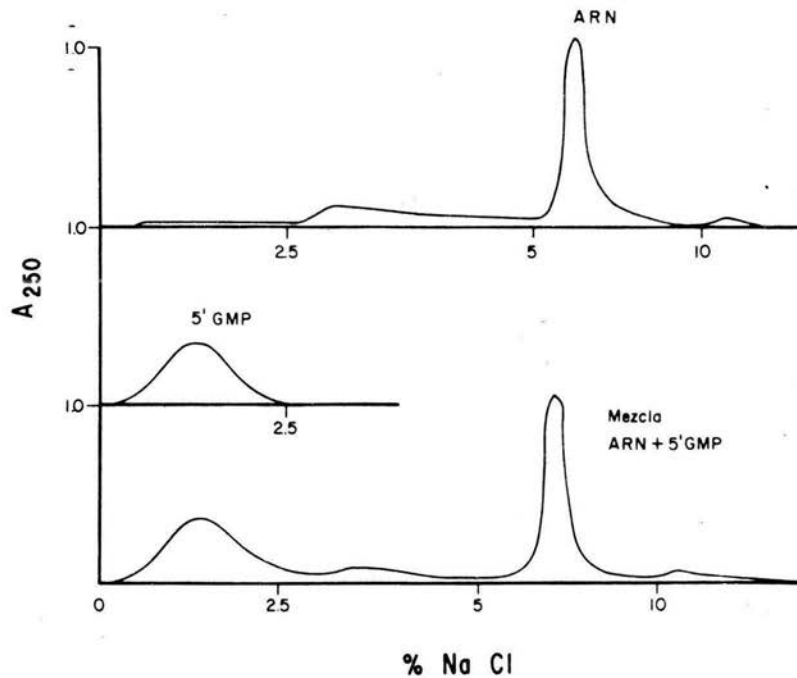


FIGURA 14

Espectro de elución de ARN y 5'GMP a través de una columna de DEAE- Sephadex.

ELUCION DE ARN HIDROLIZADO ATRAVES DE DEAE-SEPHADEX

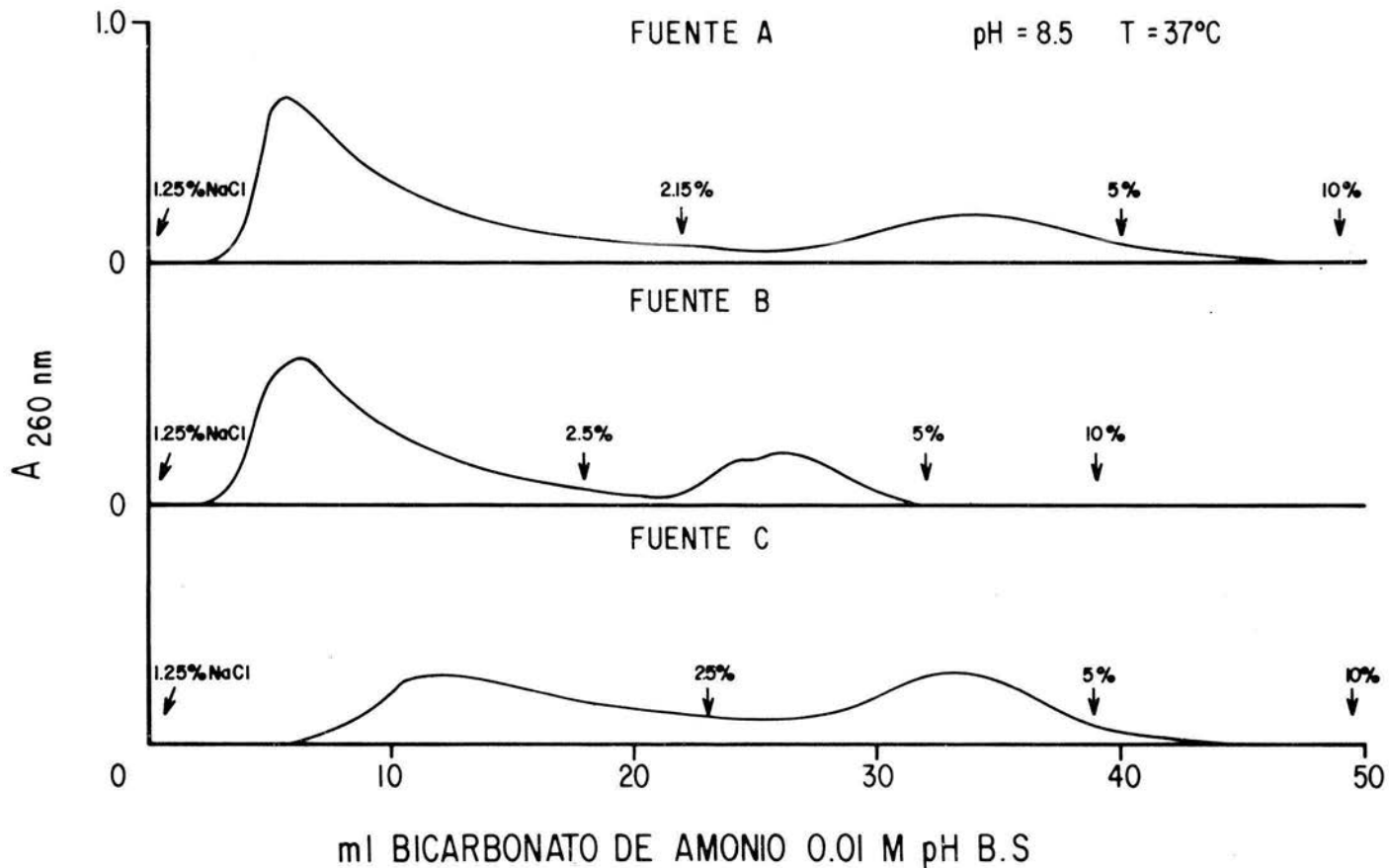


FIGURA 15

ELUCION DE ARN HIDROLIZADO ATRAVES DE DEAE-SEPHADEX

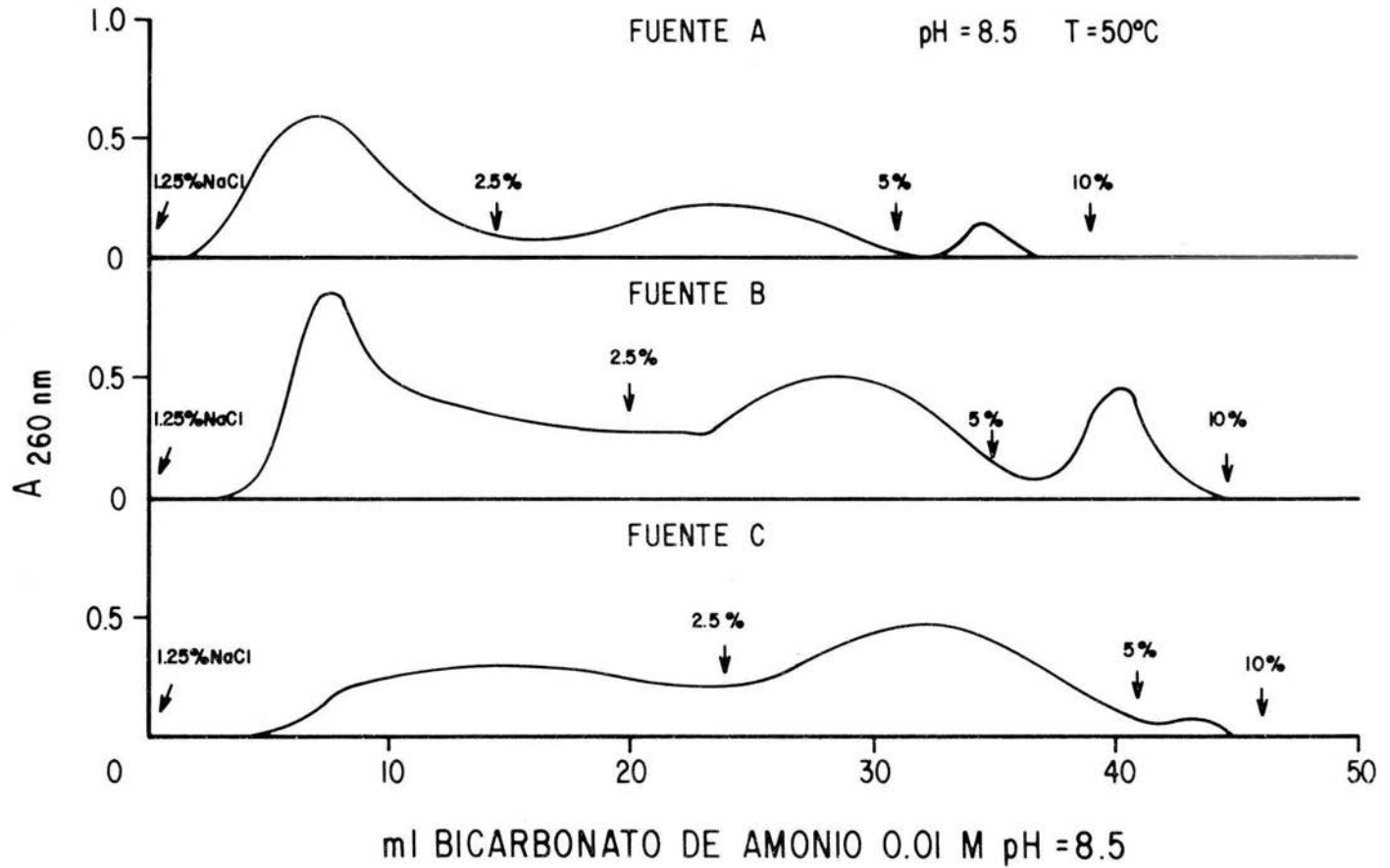
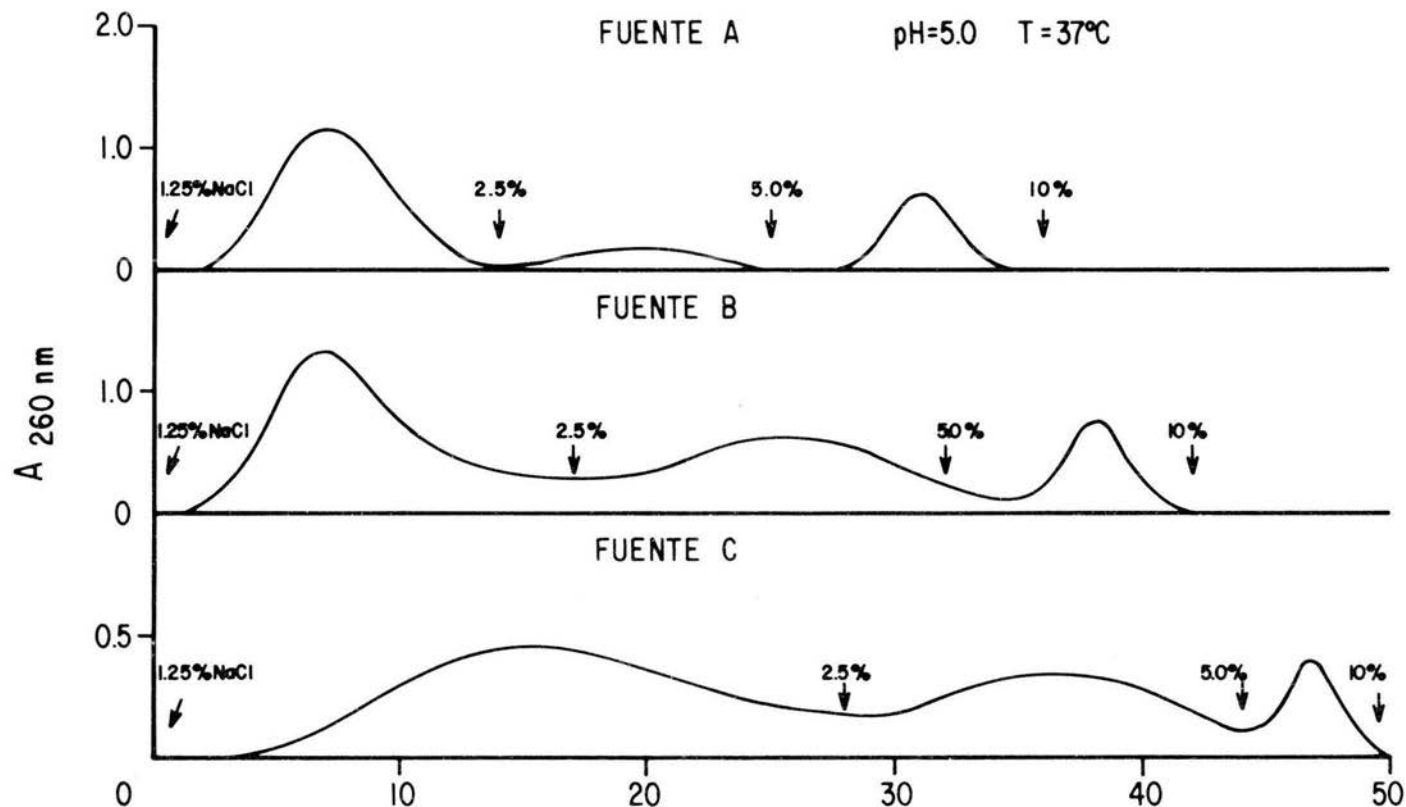


FIGURA 16

ELUCION DE ARN HIDROLIZADO ATRAVES DE DEAE-SEPHADEX



ml BICARBONATO DE AMONIO 0.01 M pH=8.5

FIGURA 17

ELUCION DE ARN HIDROLIZADO ATRAVES DE DEAE-SEPHADEX

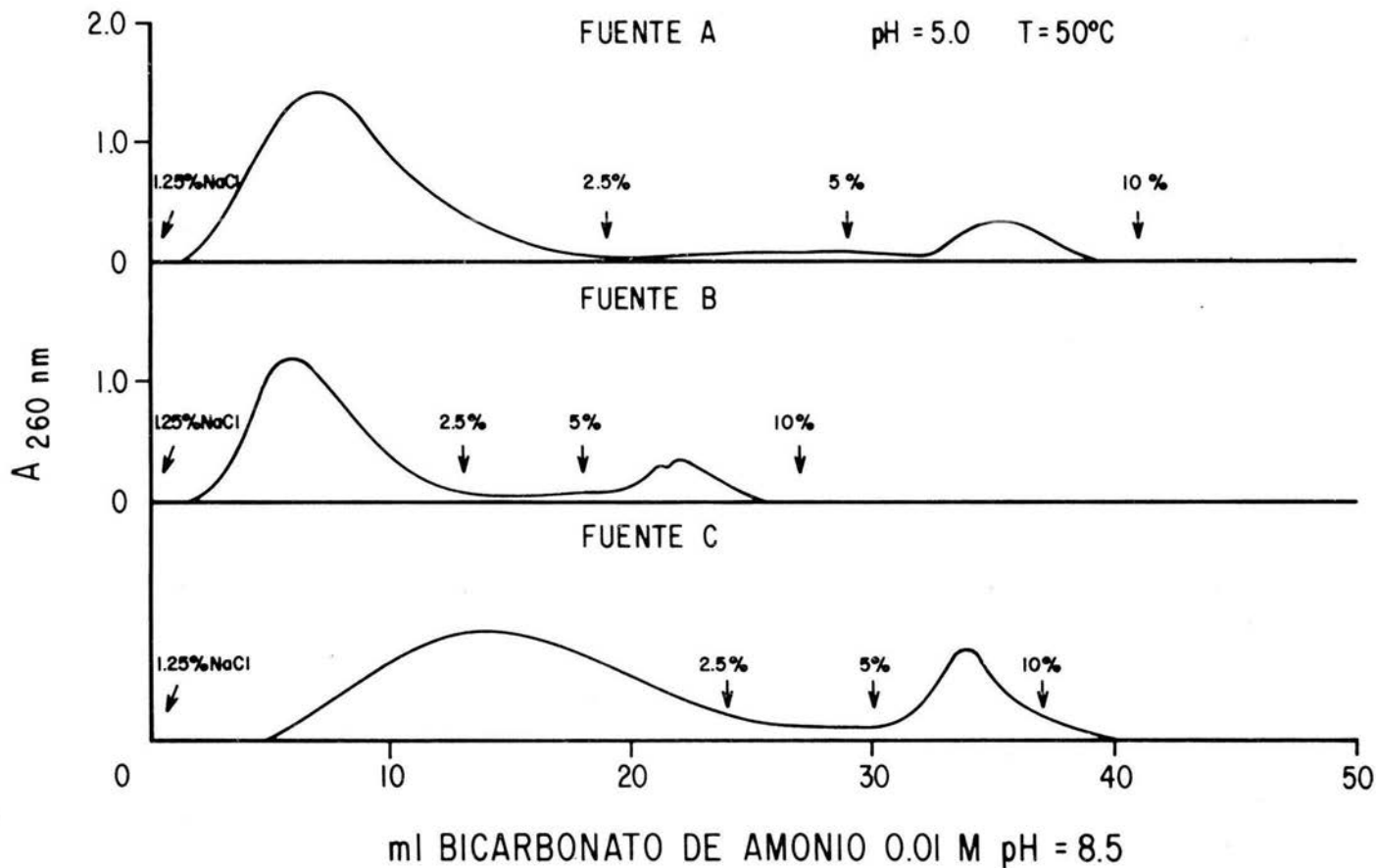


FIGURA 18

CURVAS ESTANDAR CON DIFERENTES PROPORCIONES DE 3' Y 5' AMP Y GMP Y
CON HIDROLIZADOS DE FOSFDIESTERASA DE VENENO DE VIBORA (FVV) Y CON
RNasa T₂

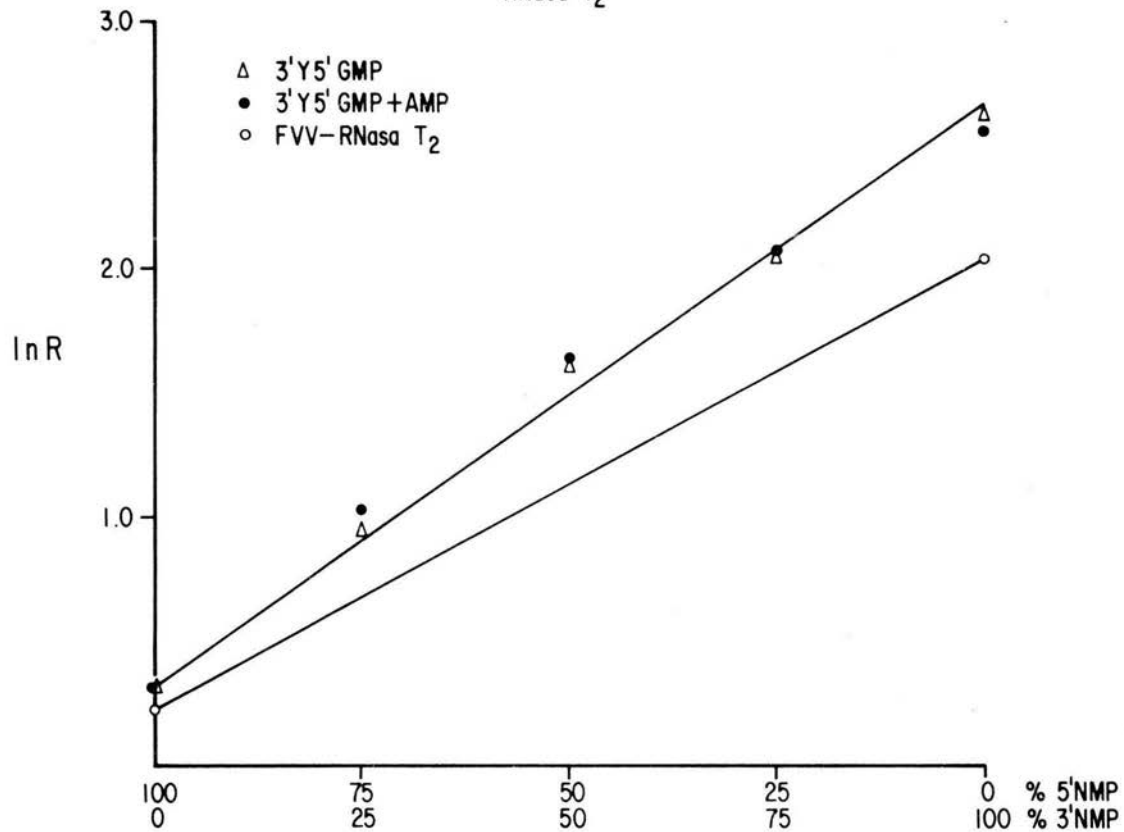


FIGURA 19

TABLA I

Porcentaje de fracciones hidrolizadas de ARN con las diferentes muestras de enzimas a través de DEAE-Sephadex a diferentes concentraciones de NaCl.

% NaCl		1.25	2.5	5.0
pH=8.5 T=37°C	Muestra A	77.02 %	21.20 %	1.78 %
	Muestra B	79.63 %	18.30 %	2.06 %
	Muestra C	58.66 %	39.72 %	1.62 %
pH=8.5 T=50°C	Muestra A	67.05 %	26.71 %	6.23 %
	Muestra B	56.78 %	33.69 %	9.52 %
	Muestra C	38.31 %	59.61 %	2.08 %
pH=5.0 T=37°C	Muestra A	71.92 %	12.48 %	15.60 %
	Muestra B	67.84 %	24.40 %	7.76 %
	Muestra C	63.17 %	27.99 %	8.84 %
pH=5.0 T=50°C	Muestra A	79.09 %	3.34 %	17.57 %
	Muestra B	84.24 %	3.28 %	12.46 %
	Muestra C	84.99 %	2.29 %	12.71 %

Tabla II

Porcentaje de producción de nucleótidos 5' (5'NMP) a diferentes temperaturas y pHs calculados con la curva estandar de AMP y GMP y con la curva de fosfodiesterasa de veneno (FVV) y con RNasa T₂.

	T= 37°C pH=8.5			T= 50°C pH=8.5		
	Ln R	% 5' NMP (AMP y GMP)	% 5' NMP (FVV-RNasaT ₂)	Ln R	% 5' NMP (AMP y GMP)	% 5' NMP (FVV-RNasaT ₂)
Muestra A	1.72	40.8	17.2	0.37	98.2	92.0
Muestra B	1.33	57.2	38.5	1.40	54.5	35.5
Muestra C	1.25	70.0	43.5	1.30	58.7	41.0
	T= 37°C pH=5.0			T= 50°C pH=5.0		
	Ln R	% 5' NMP (AMP y GMP)	% 5' NMP (FVV-RNasaT ₂)	Ln R	% 5' NMP (AMP y GMP)	% 5' NMP (FVV-RNasaT ₂)
Muestra A	0.58	89.2	80.0	1.36	56.2	37.0
Muestra B	1.59	46.5	24.5	1.74	40.0	16.5
Muestra C	0.73	82.7	71.0	1.59	46.2	24.7

Tabla III

Porcentaje de hidrólisis de ARN para la producción de nucleótidos 5' (5'NMP) calculado a diferentes concentraciones de enzima.

		T= 37°C pH= 8.5				T= 37°C pH= 5.0			
Mue stra	mg Enzima	%Hidrólisis	% NMP	% 5' NMP	mg Enzima	%Hidrólisis	%NMP	% 5' NMP	
	A	2.5	30.85	21.82	3.75	2.5	39.23	25.75	20.60
5.0		39.85	28.19	4.85	5.0	51.86	34.04	27.23	
7.5		42.96	30.39	5.23	7.5	51.86	34.04	27.23	
10.0		45.44	32.14	5.53	10.0	52.24	34.28	27.42	
B									
	2.5	28.72	21.06	8.11	2.5	48.69	29.97	7.34	
	5.0	29.04	21.30	8.20	5.0	50.16	30.87	7.56	
	7.5	43.61	31.98	12.31	7.5	59.62	36.70	8.99	
	10.0	47.2	34.62	13.33	10.0	53.73	33.07	8.10	
C									
	2.5	0	0	0	2.5	26.61	15.14	10.75	
	5.0	1	0.52	0.22	5.0	48.00	27.30	19.38	
	7.5	4.47	2.34	1.02	7.5	64.19	36.51	25.92	
	10.0	1.23	0.64	0.28	10.0	73.39	41.74	26.93	

Tabla IV

Porcentaje de hidrólisis de ARN para la producción de nucleótidos 5' (5'NMP) calculado a diferentes concentraciones de enzima.

		T= 50°C			pH= 8.5			T= 50°C			pH= 5.0		
Muestr a	mg Enzima	%Hidrólisis	% NMP	% 5' NMP	mg Enzima	%Hidrólisis	% NMP	% 5' NMP	mg Enzima	%Hidrólisis	% NMP	% 5' NMP	
		2.5	40.81	24.80		22.82	2.5	89.69		65.28	24.15	2.5	89.69
A	5.0	59.53	36.17	33.28	5.0	79.49	57.85	21.40	5.0	79.49	57.85	21.40	
	7.5	68.50	41.62	38.29	7.5	65.08	47.36	17.52	7.5	65.08	47.36	17.52	
	10.0	85.87	52.17	48.00	10.0	65.63	47.76	17.67	10.0	65.63	47.76	17.67	
Muestr a													
	2.5	19.17	9.68	3.44	2.5	84.26	65.70	10.84	2.5	84.26	65.70	10.84	
	5.0	35.20	17.77	6.31	5.0	65.85	51.34	8.47	5.0	65.85	51.34	8.47	
	7.5	51.12	25.81	9.16	7.5	65.08	50.74	8.37	7.5	65.08	50.74	8.37	
	10.0	62.33	31.47	11.17	10.0	67.29	52.47	8.66	10.0	67.29	52.47	8.66	
Muestr a													
	2.5	5.72	1.83	0.75	2.5	82.82	65.18	16.10	2.5	82.82	65.18	16.10	
	5.0	6.61	2.12	0.87	5.0	92.68	72.94	18.02	5.0	92.68	72.94	18.02	
	7.5	6.17	1.98	0.81	7.5	94.12	74.07	18.29	7.5	94.12	74.07	18.29	
	10.0	7.40	2.37	0.97	10.0	94.68	74.51	18.40	10.0	94.68	74.51	18.40	