

Reducción del contenido de ácidos nucleicos *Saccharomyces cerevisiae* (levadura panadera) por tratamiento térmico

R. ALVAREZ, J. A. AGUSTÍN Y D. HALAMA

Dpto. de Fermentaciones, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba y Dpto. de Microbiología y Bioquímica, Universidad Politécnica Eslovaca, Bratislava

Recibido: 10 de noviembre de 1980

Recibido: 30 de septiembre de 1981

ABSTRACT. The course of RNA degradation in yeast cells (*S. cerevisiae*) was checked using two methods: By measuring of ribose containing substances in the supernatant, and by checking the release of ^{14}C substances from cells pulse labeled by ^{14}C uracil. Various temperatures and pH values of suspending medium with and without heat shock at higher temperatures were used. The leakage of protein during the treatment was also checked using Lowry's method and ninhydrin method. The releasing of RNA and proteins in the supernatant using heat shock (80°C, 1 minute, at 4.5 pH) following incubation at different temperatures (50, 60 y 70°C) show that there are not significant differences between 60 and 70°C for protein and nucleic acids, and the releasing is lower than for 50°C in both cases. The effectivity of RNA hydrolysis without heat shock was strongly dependent on pH of suspending media, showing a higher leakage at higher pH values. It was shown that the reduction of nucleic acids was higher without thermal shock. Differences between heat shock for 30 or 60 seconds were negligible. The percentage of protein leakage at several pH was between 17 to 24%, with the lowest value at the lowest pH. It was shown that there is a lineal relation between the % of dry matter of yeast and the nucleic acids released to the supernatant after heat shock treatment.

RESUMEN. El curso de la degradación del ARN en células de levadura (*S. cerevisiae*) se chequeó empleando dos métodos: Por medición de las sustancias que contienen ribosa en el sobrenadante, y por el chequeo de la liberación de las sustancias con ^{14}C de las células marcadas con uracilo ^{14}C . Se emplearon varias temperaturas y valores de pH del medio de suspensión con y sin choque térmico a temperaturas mayores. La liberación de proteína durante el tratamiento se chequeó usando el método de Lowry y el método de la ninhidrina. La liberación de ARN y proteínas al sobrenadante usando choque térmico (80°C, 1

minuto a pH 4.5) seguido de una incubación a diferentes temperaturas (50, 60 y 70°C) muestra que no hay diferencias entre 60 y 70°C tanto para proteínas como para los ácidos nucleicos, y que la liberación es menor que para 50°C en ambos casos. La efectividad de la hidrólisis del ARN sin choque térmico fue fuertemente dependiente del pH del medio de suspensión, mostrando una liberación mayor a valores del pH mayores. Se mostró que la reducción de ácidos nucleicos fue mayor sin el choque térmico. No existen diferencias entre el choque térmico durante 30 y 60 segundos. El porcentaje de proteína liberada a varios valores de pH fue entre 17 y 24%, con el menor valor al pH menor. Se observa que existe una relación lineal entre el % de masa seca de levadura y los ácidos nucleicos liberados al sobrenadante después del tratamiento térmico.

INTRODUCCION

Uno de los problemas principales del uso de la proteína unicelular para el consumo humano, radica en el alto contenido de ácidos nucleicos, lo cual limita su empleo a menos de 20-30 g de levaduras diarias^{1,2}.

Con vista a poder incrementar las cantidades de levadura en la dieta, se han desarrollado diversos métodos tendientes a reducir su contenido en ácidos nucleicos, tales como: la preparación de concentrados de proteína empleando ruptura celular y luego extracción de la proteína por medios químicos³⁻⁶; extracción química utilizando diferentes reactivos tales como ácidos, bases, fenoles y detergentes^{7,8}, y el uso de procedimientos enzimáticos con células completas⁹⁻¹¹.

En el presente trabajo se empleó un choque térmico en células de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura panadera), empleando varios medios de suspensión y diferentes temperaturas de tratamiento, siguiéndose el curso de la degradación del ARN mediante determinaciones del contenido de ribosa en el sobrenadante y mediante mediciones de la liberación de sustancias radioactivas en el mismo. Además se determinaron las pérdidas de proteína.

MATERIALES Y METODOS

Levadura

En todos los experimentos se empleó levadura panadera comercial. El material se guardó a 4°C no más de 7 días.

Para llevar a cabo los experimentos, las muestras de levaduras se diluyeron en agua y se lavaron dos veces, diluyéndose luego a varias concentraciones desde 1.4 hasta 14% sobre base seca con tampón fosfato (pH 4.5).

Tratamiento térmico

De las suspensiones de arriba se tomaron 10 ml y el tratamiento térmico se llevó a cabo en dos etapas:

Primera etapa (choque térmico). A la suspensión de levaduras se le añadió una solución del tampón fosfato hirviendo en la cantidad necesaria para aumentar la temperatura hasta el valor deseado (80 ó 70°C) tan rápido como sea posible. Luego la suspensión se mantuvo a esta temperatura durante diferentes tiempos, desde 30 hasta 60 segundos.

Segunda etapa. A la suspensión anterior se le añadió tampón frío para bajar la temperatura hasta el valor deseado. Luego la suspensión se incubó a diferentes temperaturas durante 2 horas en un baño de agua con agitación intermitente.

Se sacaron muestras a intervalos durante la incubación y después de la primera etapa, se centrifugaron y los sobrenadantes fueron analizados para determinar ácidos nucleicos y aminoácidos.

Determinación del contenido de aminoácidos en el medio

A 1 ml de muestra se le añadió 0.5 ml de reactivo de ninhidrina y se puso en baño de agua hirviendo durante 15 minutos. Las muestras se enfriaron y se adicionó agua destilada hasta 10 ml. Las mediciones se realizaron en un colorímetro a 500 nanómetros. Las curvas de calibración se efectuaron en la misma forma usando como patrón ácido glutámico, con concentraciones desde 25 hasta 100 microgramos/ml.

Para determinar el contenido de ácidos nucleicos en el medio y en las células completas se empleó el método de orcinol¹². En lugar de ARN, se empleó ribosa para preparar las curvas de calibración, en concentraciones desde 20 hasta 50 microgramos/ml.

Para llevar a cabo los experimentos con sustancias radioactivas, las células de levadura se cultivaron aeróbicamente en un medio de glucosa enriquecido con peptona y extracto de levadura, a pH 5.0, en una zaranda recíprocante a 28°C. En la fase exponencial de crecimiento se toma-

ron muestras, las cuales se diluyeron con medio fresco en una proporción 1 : 9 y se cultivaron de nuevo en las condiciones anteriores. Las células se marcaron mediante adiciones de uracilo $2\text{-}^{14}\text{C}/30$ microcuries/70 microgramos. En el estado estacionario las células se lavaron con fosfato ácido de potasio 0.05 M y se resuspendieron en él, guardándose a 4°C durante 24 horas. Al cabo de ese tiempo se volvieron a lavar de nuevo y se resuspendieron en el tampón para ser utilizada en los experimentos.

Medición del contenido de ARN en el sobrenadante

De la solución patrón se pipetearon muestras de 50 microlitros en 0.5 ml del tampón contenido en tubos de ensayo de 2 ml, precalentados en un baño de agua a la temperatura deseada, y la suspensión se incubó con agitación ocasional. Las muestras se sacaron a intervalos de tiempo e inmediatamente se enfriaron en un baño de hielo. Después de una hora, las células se separaron por centrifugación y alícuotas del sobrenadante se pipetearon en planchetas y se secaron a 105°C . Después del secado la radioactividad se midió empleando un contador GM-ventana delgada.

Medición de las pérdidas de proteínas

Para la determinación de la proteína en el sobrenadante después del tratamiento térmico, se empleó el método de Lowry y cols.¹³, empleando como curva de calibración un hidrolizado de células de levadura, tomando alícuotas de 0.5–2 ml, por tanto los valores resultantes de las pérdidas son sólo desde el punto de vista comparativo, ya que el hidrolizado representa el 100% de proteína. (Fig. 1).

RESULTADOS Y DISCUSION

Todas las levaduras no tienen la misma susceptibilidad al choque térmico descrito por Maul y cols.⁹. El ARN en una variedad de especies de *Candida* y en *Hansenula polymorpha* es fácilmente liberado por el proceso de choque térmico, mientras que otras levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae* presentan poca reducción en el contenido de ácidos nucleicos¹⁴. Por esta razón, en nuestro caso aplicamos un choque térmico modificado a temperaturas mayores.

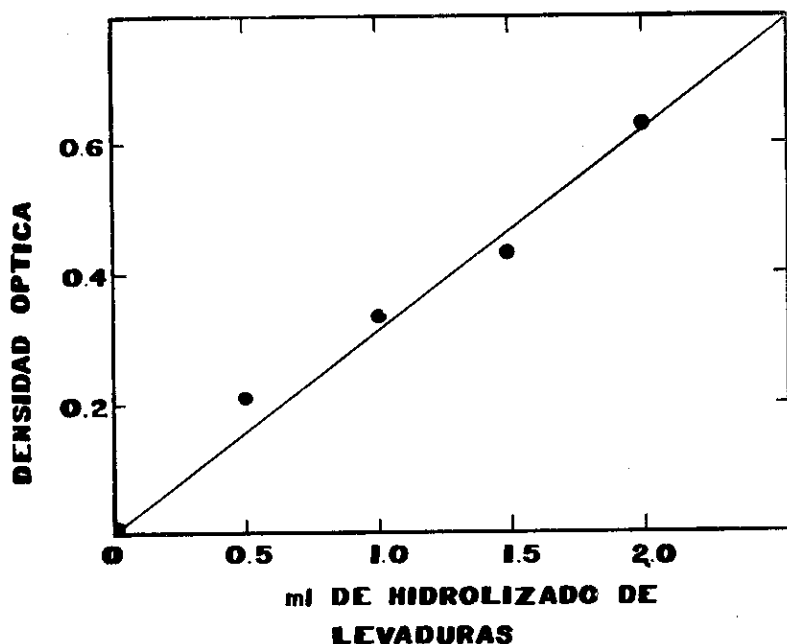


Fig. 1. Curva de calibración de proteína por el método de Lowry empleando hidrolizado de levaduras.

Se realizaron experimentos con suspensiones de levadura (14% en base seca) en tampón fosfato (NaH_2PO_4), pH 4.5; se sometieron a la primera etapa del tratamiento térmico (80°C , 1 minuto) y se incubaron a diferentes temperaturas (50 , 60 y 70°C) observándose la liberación de ácidos nucleicos y proteínas al medio. En la Fig. 2 se muestran los valores obtenidos para el contenido de ribosa y el de aminoácidos inmediatamente después de la primera etapa del tratamiento y durante la incubación a diferentes tiempos. Como puede observarse en la Fig. inmediatamente después de la primera fase del tratamiento, tanto para el contenido de ribosa como para el contenido de aminoácidos, se observa un aumento brusco, continuando más lentamente en los siguientes 30 minutos de incubación, hasta hacerse casi constante durante el resto del tiempo. Para las incubaciones a 60 y 70°C apenas se observa diferencia en los contenidos de ribosa y aminoácidos. Resulta significativo que a 50°C los valores de los nucleótidos liberados al medio son aproximadamente un 10% mayores, mientras que para las proteínas el aumento

es de aproximadamente un 30%. El porcentaje de ácidos nucleicos liberados al medio corresponde a un 20, 19 y 17% aproximadamente, para temperaturas de incubación de 50, 60 y 70°C respectivamente. En cuanto a la proteína liberada, a las mismas condiciones se obtuvo un 13, 11 y 9%, respectivamente.

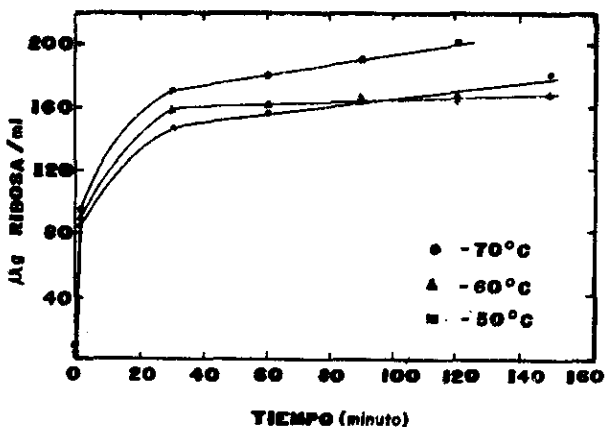
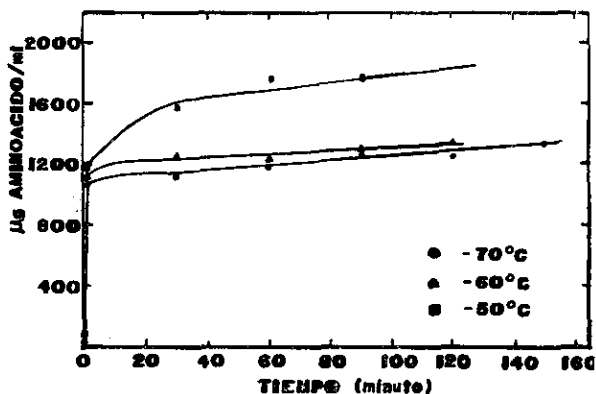


Fig. 2. Influencia de la temperatura de incubación sobre la liberación de ribosa y los aminoácidos al sobrenadante, en suspensiones de levadura (aproximadamente 14% en base seca de biomasa), sometidas a un choque térmico a 80°C, 1 minuto a diferentes tiempos de incubación.

En vista de que las pérdidas de proteínas se hicieron más apreciables que el ligero aumento de ácidos nucleicos al medio a 50°C, se escogió como temperatura de incubación 65°C para el resto de las experiencias. Según Castro y cols.¹⁵, la temperatura óptima y el pH óptimo de la ribonucleasa pancreática para la hidrólisis del ARN es de 55 a 65°C a un pH de 6.7-8.0.

Empleando células marcadas de *Saccharomyces cerevisiae* con uracilo ^{14}C se realizaron experiencias empleando el mismo tampón (NaH_2PO_4 0.1 N), sometidas a la primera fase del tratamiento (80°C, 1 minuto), seguida de una incubación a 65°C en un caso, y en el otro se realizaron experiencias sólo incubando, sin ningún tratamiento previo. Como se observa en la Fig. 3, la extracción de los nucleótidos de las células fue mayor cuando la suspensión se incubó solamente, en comparación con aquellas que fueron inicialmente sometidas a la primera etapa del tratamiento.

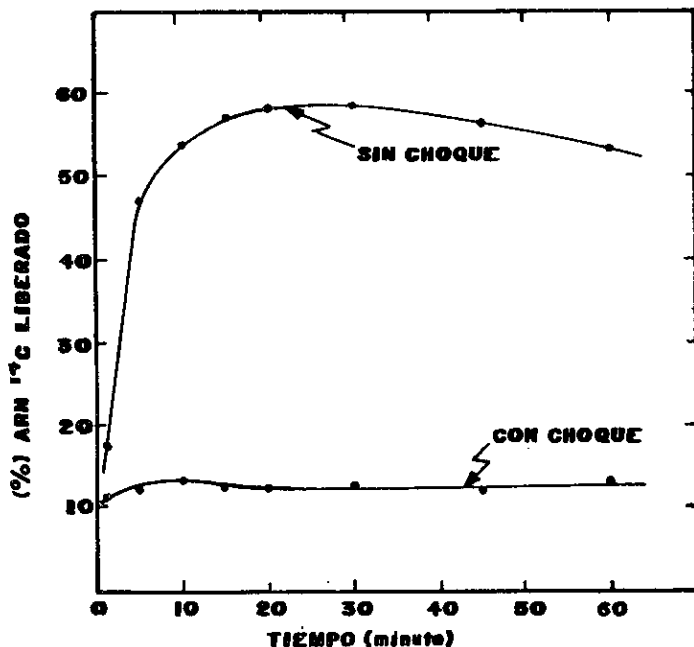


Fig. 3. % de ARN ^{14}C liberado a diferentes tiempos de incubación a 65°C en células de *S. cerevisiae* en NaH_2PO_4 0.1 N, empleando choque térmico (80°C, 1 minuto) y sin él.

La Tabla I nos muestra la influencia del tiempo de choque térmico sobre el % de ARN ^{14}C liberado, para un choque inicial de 70 ó 80°C, seguido de una incubación a 65°C durante 30 minutos. Se observa que no existen diferencias significativas entre 30 y 60 segundos de tiempo de choque. Por otro lado, el valor obtenido sin choque, sólo incubando las muestras, es mayor tanto para 80°C como para 70°C de temperatura de choque; lo cual hace pensar que a temperaturas por encima de 65°C ocurre una inactivación parcial de las ribonucleasas.

TABLA I

*Liberación de ARN ^{14}C en (%) a diferentes temperaturas y tiempos de choque térmico en células de *S. cerevisiae* usando NaH_2PO_4 0.1 N como medio de suspensión*

Choque Térmico	Tiempo seg.	Temperatura °C	% de ARN ^{14}C liberado
No	—	—	65.29
Si	30	70	40.58
Si	60	70	39.26
Si	30	80	18.94
Si	60	80	17.38

La Fig. 4 nos muestra el curso de la degradación del ARN empleando hidróxido de amonio 0.5 N como medio de suspensión. Como se puede observar en este caso no existen grandes diferencias en cuanto al porcentaje de sustancias radioactivas liberadas al medio, cuando se empleó el choque o sin él. Es probable que en este caso sólo ocurra una degradación química del ARN, en condiciones alcalinas fuertes, sin ningún proceso enzimático, como ha sido indicado en la literatura^{7,8}.

La Fig. 5 muestra el efecto del pH sobre la liberación de sustancias radioactivas. Como vemos, en la gráfica se pueden distinguir 3 fases diferentes. En el rango de pH (2.2 a 4) el porcentaje de sustancias radioactivas liberadas al medio decrece con la disminución del pH. Es probable que en medios más ácidos ocurra lo contrario, como parece in-

dicar la curva. En el estrecho rango de 4 a 4.5 se observa un aumento brusco del porcentaje de sustancias radioactivas con ligeros incrementos de pH, presentando un punto de inflexión a pH 4.2. Para valores por encima de 5 se observa una dependencia casi lineal entre ambas variables.

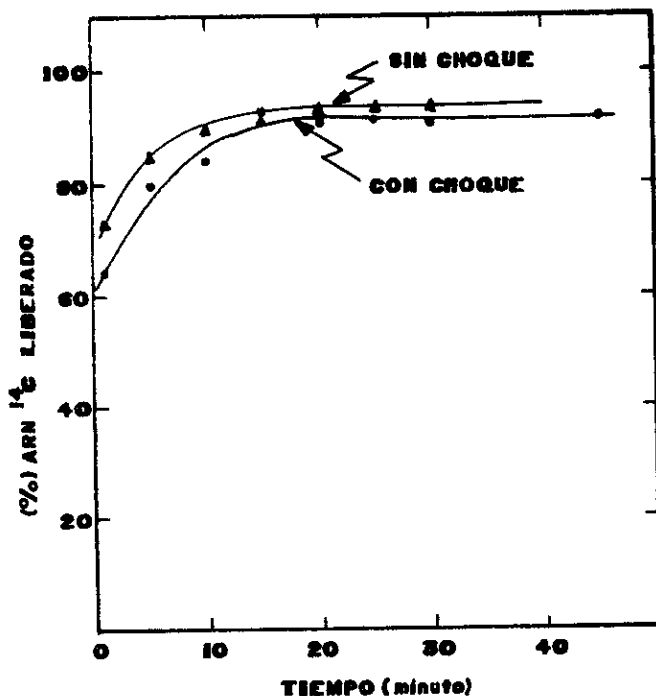


Fig. 4. % de ARN ¹⁴C liberado a diferentes tiempos de incubación a 65°C en células de *S. cerevisiae* suspendidas en hidróxido de amonio 0.5 N, empleando choque térmico (80°C, 1 minuto) y sin él.

La Fig. 6 muestra la relación entre las sustancias que contienen ribosa en el medio y la concentración de masa seca inicial de la suspensión. Se observa una relación lineal, aproximadamente a 45°C, o sea, que para un incremento de 10 veces en el % de masa seca se obtiene un aumento de 10 en el contenido de ribosa. Los datos se relacionan bastante bien, con un coeficiente de correlación de 0.989.

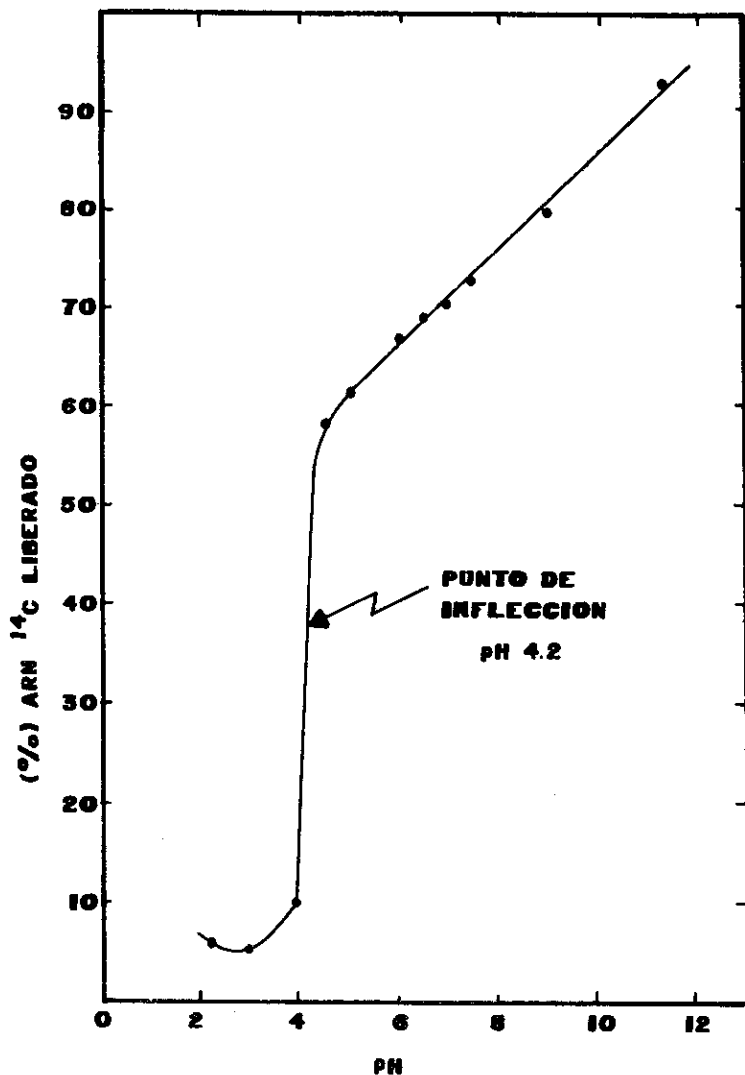


Fig. 5. Influencia del pH del medio de suspensión sobre el % de ARN ¹⁴C liberado en células de *S. cerevisiae* suspendidas en ácido cítrico 0.1 N, ajustando al pH deseado con NaOH 2 N, e incubadas a 65°C durante 30 minutos sin previo choque térmico.

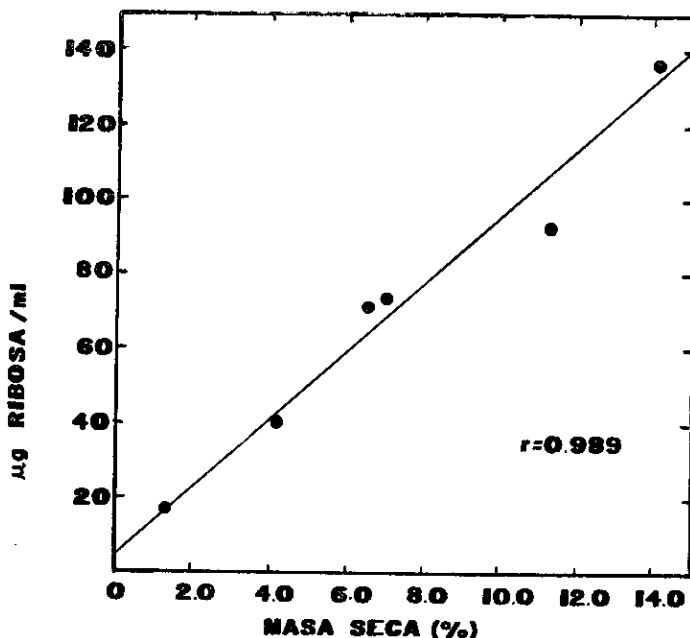


Fig. 6. Relación entre la liberación de ácidos nucleicos después del tratamiento térmico y el % en masa seca de levadura en la suspensión.

Con vista a determinar las pérdidas de proteínas durante el tratamiento a diferentes valores de pH, se determinó proteína en los sobrenadantes por el método Lowry. En la Fig. 7 se muestra el % de proteína liberada al medio para valores de pH entre 2.3 y 7.0, los cuales corresponden a 17 y 24%, respectivamente.

CONCLUSIONES

En los experimentos desarrollados con el choque térmico, se determinó que la temperatura de incubación influye tanto en la disminución del contenido de ácidos nucleicos como en las pérdidas de proteínas; presentándose los valores mayores en ambos casos a 50°C.

Comparando los resultados de los experimentos con y sin choque térmico puede apreciarse que se obtuvieron mejores resultados sin choque

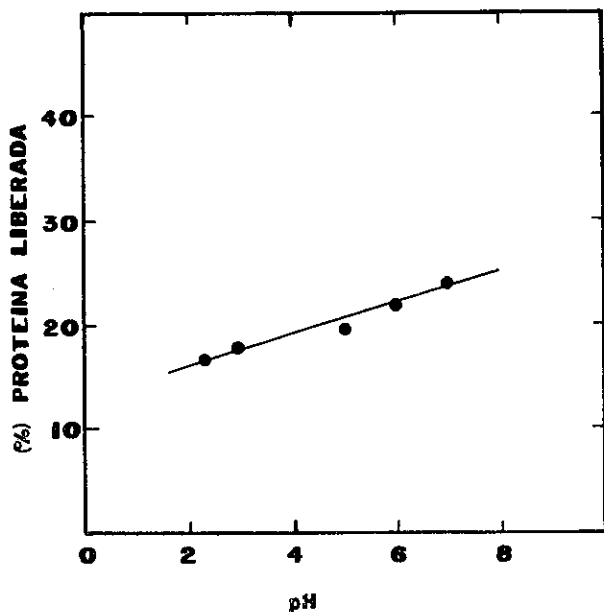


Fig. 7. Influencia del valor de pH del medio de suspensión sobre el porcentaje de proteína liberada al medio por las células de *S. cerevisiae*, después de 30 minutos de incubación a 65°C en ácido cítrico 0.1 N ajustado al pH deseado con NaOH 2 N, usando el método de Lowry.

térmico, lo cual pudiera estar explicado por la inactivación parcial de las endonucleasas a temperaturas superiores de 65°C.

En los experimentos realizados a distintos valores de pH se observó un incremento en la liberación de los ácidos nucleicos a medida que se aumenta el valor de pH, presentando tres fases diferentes. Entre pH (2.2-4.0) se incrementa la liberación a medida que se aumenta el pH. Probablemente, a valores de pH menores puede ocurrir una rápida degradación química, como ocurre por encima de 12.0.

Entre pH (4-4.5) se observa que para pequeñas variaciones del pH se obtienen bruscos incrementos en la liberación de ARN, con un punto de inflexión a pH 4.2. Para valores de pH por encima de 5 se obtiene una dependencia casi lineal entre la liberación de los nucleótidos al medio y el aumento de pH.

REFERENCIAS

1. WASLIEN C. I., CALLOWAY D. H., MARGEN S. AND COSTA F. *J. of Food Sci.*, 35, 294, 1970.
2. ENDOZIEN J. C., UDO V. R. AND SCRIMSHAW N. S. *Nature*, 228, 180, 1970.
3. HEDENSKOG G. AND EBBINGHUS L. *Biotech. and Bioeng.*, 14, 447, 1972.
4. HEDENSKOG G. AND MOGREN H. *Biotech. and Bioeng.*, 15, 129, 1973.
5. VANANUVAT P. AND KINSELLA J. E. *Agr. and Food Chem.*, 23, 216, 1975a.
6. VANANUVAT P. AND KINSELLA J. E. *J. of Food Sci.*, 40, 336, 1975b.
7. LOVLAND J., HARPER J. M. AND FREY A. L. *A review. Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 9, 131, 1976.
8. VUKARI L. AND LINKO M. *Process. Biochem.*, May 17, 1977.
9. MAUL S. B., SINSKEY A. J. AND TANNENBAUM S. R. *Nature*, 228, 181, 1970.
10. OHTA S., MAUL S. B., SINSKEY A. J. AND TANNENBAUM S. R. *Appl. Microbiol.*, 22, 415, 1971.
11. CANEPA A., PIEBER M., ROMERO C. AND TOHA J. C. *Biotech. and Bioeng.*, 14, 173, 1972.
12. HERBERT D., PHIPPS P. J. AND STRANGE R. E. "Chemical analysis of Microbial cells". *Methods Microbiol.* 5B, (J. R. Norris, D. N. Ribbons eds. Academic Press, London), 209, 1972.
13. LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
14. SINSKEY A. J. AND TANNENBAUM S. R. "Removal of nucleic acids in SCP". *Single Cell Protein. II*, (Tannenbaum S. R., Wang D. I. C., Eds. Mit Press., London, England) 158-178, 1975.
15. CASTRO A. C., SINSKEY A. J. AND TANNENBAUM S. R. *Appl. Microbiol.* 22, 422, 1971.