

## **Influencia de diferentes medios de suspensión en el tratamiento térmico para reducir el contenido de ácidos nucleicos en *S. cerevisiae* (levadura panadera)**

R. ALVAREZ

*Dpto. Fermentaciones, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba*

*Recibido: 30 de septiembre de 1981*

*Recibido: 23 de marzo de 1982*

**ABSTRACT.** In this work was presented the effect of 5 different suspending media in the reduction of nucleic acid content in *S. cerevisiae* (baker's yeast) using a heat treatment with only one step at 65°C during 30 and 60 minutes. Using ammonium hydroxide 0,5 N reduction of 86,5% and 91,1% for 30 and 60 minutes respectively were obtained, it means a final nucleic acid content less than 1%. Also the losses of proteins in supernatant were approximately 15% this is a value lower than the reported. No significant differences between the two heating times were found.

**RESUMEN.** En este trabajo se presentan los resultados del efecto de 5 medios de suspensión diferentes en la reducción del contenido de ácidos nucleicos en *S. cerevisiae* (levadura panadera) sometida a un tratamiento térmico de un solo paso a 65°C durante 30 y 60 minutos. Empleando hidróxido de amonio 0,5 N se obtuvieron reducciones de 86,5% y 91,1% para 30 y 60 minutos respectivamente, lo que equivale a un contenido final de ácidos nucleicos menor del 1%. Además, las pérdidas de proteínas al medio fueron de alrededor del 15% el cual es un valor menor que el reportado. No se encontraron diferencias significativas entre los dos tiempos de tratamiento.

### **INTRODUCCION**

La levadura al igual que otros microorganismos, se ve limitada en su empleo para el consumo humano, debido al alto contenido de ácidos nucleicos y la baja digestibilidad de su pared celular.

Según estudios realizados<sup>1,2</sup>, el tiempo límite permisible diario de ácidos nucleicos para los humanos es de menos de 2 g, o sea, de 20 a 30 g de levadura.

Para la extracción química de los ácidos nucleicos en levaduras se han utilizado diferentes reactivos, tales como ácidos, bases, sales y detergentes<sup>3-5</sup>.

En este trabajo se analiza la influencia de diferentes medios de suspensión en la reducción de los ácidos nucleicos, en levaduras sometidas a un tratamiento térmico de un solo paso a 65°C durante diferentes tiempos. Además, se presenta el porciento de pérdidas de proteínas con el mismo.

### MATERIALES Y METODOS

Se empleó levadura (*S. cerevisiae*) suministrada por la planta "Héroes de Bolivia", manteniéndose a 4°C no más de 7 días para ser usada en los experimentos. A la misma se le determinó masa seca, proteína por el método descrito<sup>6</sup> y ácidos nucleicos<sup>7</sup>.

Se prepararon las suspensiones aproximadamente en un 7% en masa seca de levadura.

Se utilizaron los siguientes medios de suspensión:

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| A) Hidróxido de amonio 0,025 N   | pH = 10   |
| B) Hidróxido de amonio 0,1 N     | pH = 10,8 |
| C) Hidróxido de amonio 0,5 N     | pH = 11,3 |
| D) Fosfato básico de sodio 0,1 N | pH = 9,0  |
| E) Cloruro de sodio 0,1 N        | pH = 5,0  |

El tratamiento térmico se llevó a cabo en un termostato a 65°C durante 30 y 60 minutos, después de alcanzada la temperatura en la suspensión. En cada tiempo se sacaron muestras para determinar masa seca gravimétrica y % de ácidos por el método descrito<sup>7</sup>. A los sobrenadantes se les determinó proteína por el método de Lowry<sup>6</sup>.

Los resultados fueron analizados estadísticamente para un 95% de confianza, aplicando el test "t de student" y test de Fischer<sup>8</sup>.

### RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores promedios en base seca de las propiedades de la levadura empleada en los experimentos se presentan en la Tabla I.

TABLA I

*Valores promedios de % masa seca, % de proteína y % de ácidos nucleicos en base seca en la levadura utilizada*

|                    | $\bar{X} \pm S$ |
|--------------------|-----------------|
| % Masa Seca        | $27,6 \pm 0,4$  |
| % Proteína         | $36,5 \pm 2,4$  |
| % Acidos nucleicos | $7,3 \pm 0,9$   |

La Tabla II muestra las pérdidas de biomasa con el tratamiento térmico para los diferentes medios de suspensión empleados, como puede observarse en la misma, el mayor porcentaje de pérdidas de biomasa corresponde al medio de suspensión C (hidróxido de amonio 0,5 N), o sea, en las condiciones alcalinas más fuertes. Según los análisis estadísticos no existen diferencias significativas entre 30 y 60 minutos de tratamiento

TABLA II

*% de pérdidas de biomasa en base seca a los diferentes tiempos de tratamiento térmico*

| Medio de Suspensión | % Pérdidas de Biomasa              |                                    |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|                     | 30' tratamiento<br>$\bar{X} \pm S$ | 60' tratamiento<br>$\bar{X} \pm S$ |
| A                   | $14,6 \pm 3,7$                     | $19,7 \pm 4,1$                     |
| B                   | $18,0 \pm 1,2$                     | $17,7 \pm 1,4$                     |
| C                   | $22,9 \pm 3,0$                     | $24,9 \pm 1,0$                     |
| D                   | $19,1 \pm 2,9$                     | $20,6 \pm 0,9$                     |
| E                   | $18,5 \pm 1,0$                     | $19,0 \pm 1,3$                     |

Es de destacar, que los resultados de masa seca gravimétrica en muchos casos tienen una desviación standard un poco elevada; por esa razón se realizó un balance de materiales en el medio de suspensión A, para los dos tiempos de tratamiento, obteniéndose los resultados expresados en la Tabla III.

TABLA III

*Balance de materiales con respecto a masa seca gravimétrica para 30 y 60 minutos de tratamiento*

| Biomasa tratada<br>sin lavar | Biomasa tra-<br>tada lavada | Peso seco del<br>agua de lavado |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| mg/ml                        | mg/ml                       | mg/ml                           |
| X $\pm$ S                    | X $\pm$ S                   | X $\pm$ S                       |
|                              | 30 minutos de tratamiento   |                                 |
| 66,5 $\pm$ 0,1               | 63,7 $\pm$ 2,8              | 2,8 $\pm$ 0,0                   |
|                              | 60 minutos de tratamiento   |                                 |
| 62,2 $\pm$ 1,1               | 59,9 $\pm$ 2,0              | 2,6 $\pm$ 0,0                   |

Como podemos apreciar en la Tabla, la suma de los valores de biomasa tratada lavada y el peso seco del agua de los lavados coincide aproximadamente con los de la biomasa tratada sin lavar, por lo que podemos asegurar que no se pierde biomasa en los lavados y que los mayores errores en la determinación de masa seca son producto de la manipulación al sacar la muestra.

La Tabla IV muestra el % de reducción de los ácidos nucleicos con el tratamiento, para los 5 medios de suspensión utilizados, teniendo en cuenta los valores obtenidos en la biomasa. Se observa que el mayor porcentaje de reducción corresponde al medio de suspensión C (hidróxido de amonio 0,5 N), obteniéndose una reducción de 86,5% y 91,1%, para 30 y 60 minutos de tratamiento térmico respectivamente, lo que equivale a una concentración final de ácidos nucleicos de 1,0% y 0,7%. De acuerdo a los cálculos estadísticos no hay diferencias significativas entre 30 y 60 minutos de tratamiento.

Con el medio de suspensión B (hidróxido de amonio 0,1 N), se obtiene un % de reducción de 61,2% y 71,4% para 30 y 60 minutos respectivamente, lo cual equivale a una concentración final de ácidos nucleicos de 2,8% y 2,1%. Se observaron diferencias significativas entre los dos tiempos de tratamiento.

Comparando los medios B y C, encontramos que estadísticamente las muestras difieren significativamente, y que para el C la reducción de los ácidos nucleicos es mayor que para el B.

TABLA IV

*% de reducción de los ácidos nucleicos a los diferentes tiempos de tratamiento térmico*

| Medio de suspensión | % Reducción de ácidos nucleicos |                 |
|---------------------|---------------------------------|-----------------|
|                     | 30' tratamiento                 | 60' tratamiento |
|                     | $\bar{X} \pm S$                 | $\bar{X} \pm S$ |
| A                   | $21,2 \pm 1,3$                  | $21,9 \pm 2,5$  |
| B                   | $61,2 \pm 1,9$                  | $71,4 \pm 0,5$  |
| C                   | $86,5 \pm 1,6$                  | $91,1 \pm 0,1$  |
| D                   | $10,0 \pm 2,3$                  | $24,3 \pm 3,7$  |
| E                   | $50,1 \pm 3,0$                  | $57,8 \pm 1,0$  |

Empleando el medio de suspensión A, se realizó la determinación del contenido de ácidos nucleicos en el sobrenadante, a fin de poder realizar un balance de materiales. (Tabla V.)

TABLA V

*Concentración de ácidos nucleicos en biomasa inicial, tratada y en los sobrenadantes para 30 y 60 minutos de tratamiento en el medio de suspensión A*

| mg/ml A.N.<br>inicial | mg/ml A.N.<br>Biomasa tratada | mg/ml A.N.<br>sobrenadantes |
|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| $\bar{X} \pm S$       | $\bar{X} \pm S$               | $\bar{X} \pm S$             |
|                       | 30 minutos de tratamiento     |                             |
| $6,0 \pm 0,1$         | $4,1 \pm 0,1$                 | $1,8 \pm 0,1$               |
|                       | 60 minutos de tratamiento     |                             |
| $6,0 \pm 0,1$         | $3,8 \pm 0,1$                 | $1,9 \pm 0,0$               |

En la Tabla observamos que la suma de los mg/ml de ácidos nucleicos en la biomasa tratada y en los sobrenadantes es aproximadamente igual a los mg/ml de ácidos nucleicos iniciales. Así, realizándose el cálculo del porciento de reducción de ácidos nucleicos en base a los sobrenadantes, obtenemos  $23,6\% \pm 0,7$  y  $24,7\% \pm 0,1$  para 30 y 60 minutos respectivamente, los cuales son comparables a los obtenidos en la Tabla IV.

El porciento de pérdidas, atendiendo a los valores obtenidos en el sobrenadante para los cinco medios de suspensión empleados se muestran en la Tabla VI.

TABLA VI

*% de pérdidas de proteína en el sobrenadante a diferentes tiempos de tratamiento térmico*

| Medio de suspensión | % Pérdidas de Proteínas al medio |                 |
|---------------------|----------------------------------|-----------------|
|                     | 30' tratamiento                  | 60' tratamiento |
|                     | $\bar{X} \pm S$                  | $\bar{X} \pm S$ |
| A                   | $10,8 \pm 0,6$                   | $11,2 \pm 0,3$  |
| B                   | $14,6 \pm 2,0$                   | $16,1 \pm 2,5$  |
| C                   | $15,4 \pm 5,8$                   | $16,5 \pm 5,0$  |
| D                   | $7,1 \pm 0,5$                    | $8,3 \pm 1,3$   |
| E                   | $13,6 \pm 0,4$                   | $15,5 \pm 0,5$  |

Comparando los medios de suspensión B y C, que son los que mayores porcentos de reducción de los ácidos nucleicos presentan, encontramos que las pérdidas de proteínas no difieren significativamente para 30 y 60 minutos de tratamiento, obteniéndose pérdidas de proteínas en el sobrenadante entre 15 y 16% para ambos casos.

Coincidimos con lo planteado por Gómez y Viniegra<sup>5</sup> y Zee y Simard<sup>9</sup>, en afirmar que para la extracción del ARN microbiano, no es absolutamente necesario seguir los pasos secuenciales del choque térmico, como lo describen Ohta y cols.<sup>10</sup> y Maul y cols.<sup>11</sup>. En nuestro caso obtenemos buenos resultados empleando un solo paso de incubación a 65°C en el medio alcalino durante 30 minutos.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos el medio de suspensión que parece más adecuado es el C (hidróxido de amonio 0,5 N), lográndose con el tratamiento térmico un producto con un contenido final de ácidos nucleicos menor del 1%, y para el cual el porciento de pérdidas de proteínas es de alrededor del 15%.

Para un 95% de confianza no existen diferencias significativas en cuanto al tiempo de tratamiento, tanto por el porciento de reducción como para las pérdidas de proteínas, por lo que es factible emplear el menor tiempo. (30 minutos).

## REFERENCIAS

1. WASLIEN C.I., CALLOWAY D.R., MARGEN S., AND COSTA F. *J. of Food Sci.*, 23, 294, 1970.
2. EDOZIEN J.C., UDO V.R., SCRIMSHAW N.S. *Nature* 228, 180. 1970.
3. LOVLAND J., HARPER J.M. AND FREY A.L. *Lebensm Wiss. U. Technol.* 9, 131, 1976.
4. VUKARI L.M. AND LINKO M. "Reduction of nucleic acid content of SCP" *Process. Biochem.* May 17, 1977.
5. GÓMEZ H. Y VINIEGRA G. *Rev. Soc. Quím. Mex.* 21, 97, 1977.
6. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. AND RANDALL R.J. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
7. RUT M. *Kvasný Prymysl.* 19, 131, 1973.
8. SPIEGEL M.R. "Teoría y Problemas de Estadística". Ed. Pueblo y Revolución, 1971.
9. ZEE J.A. AND SIMARD R.E. *Appl. Microbiol.* 29, 59, 1975.
10. OHTA S., MAUL S.B., SINKEY A.J. AND TANNENBAUM S.R. *Appl. Microbiol.* 22, 415, 1971.
11. MAUL S.B., SINSKEY A.J. AND TANNENBAM S.R. *Nature* 228, 181, 1970.