

Tratamiento térmico alcalino para la reducción de ácidos nucleicos en levaduras

R. ALVAREZ Y A. ENRÍQUEZ

Dpto. Microbiología Industrial, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido: 6 de diciembre de 1982

ABSTRACT. The growth of *K. fragilis* cells yeast on pilot plant scale and the using of heat treatment with ammonium hydroxide for lowering nucleic acid content is reported in this work. Growth rates from 0,65 to 0,71 h⁻¹ were obtained. Under these conditions the biomass obtained presented a nucleic acid content of 12,08 ± 0,52. During the treatment with ammonium hydroxide 4,5% at 65°C during 30 minutes, a nucleic acid reduction of approximately 90% (it means a final nucleic acid concentration of 1,2%) with losses of biomass and proteins of 30% and 20%, respectively. By compare results under similar conditions with *S. cerevisiae* cells yeast, higher losses of proteins and biomass are observed. To all appearance due to the smaller resistant of its cell wall.

RESUMEN. En este trabajo se presenta el crecimiento de la levadura *K. fragilis* a nivel de planta piloto, así como el empleo de un tratamiento térmico en presencia de hidróxido de amonio con el fin de disminuir el contenido de ácidos nucleicos. Se obtuvieron velocidades de crecimiento de 0,65 a 0,71 h⁻¹. Bajo estas condiciones la biomasa obtenida presentó un contenido en ácido nucleico de 12,08% ± 0,52. Durante el tratamiento con hidróxido de amonio 4,5% a 65°C durante 30 minutos, se logró una reducción del contenido de ácido nucleico de alrededor del 90% (lo que equivale a una concentración final de 1,2%) con pérdidas de biomasa y proteína de aproximadamente 30% y 20%, respectivamente. Comparando resultados en igualdad de condiciones con la levadura *S. cerevisiae*, se observan mayores pérdidas de proteína y biomasa para la *K. fragilis*, debida al parecer a la menor resistencia de su pared celular.

INTRODUCCION

La utilización industrial de las levaduras para su empleo en la alimentación humana, previa disminución de los ácidos nucleicos, es altamente atrayente y por ello ha sido objeto de intenso estudio en los últimos 15 años^{1,2}.

Mediante un tratamiento adecuado es posible obtener un producto proteico de mejor calidad por la eliminación misma de los ácidos nucleicos y además porque el método de extracción tiene algunas posibilidades de aumentar la digestibilidad de la proteína microbiana y mejora las características funcionales de los alimentos donde son añadidos³.

En este trabajo se presenta el crecimiento de la cepa de levadura *Kluyveromyces fragilis*, a nivel de planta piloto, así como el empleo de un tratamiento térmico en presencia de hidróxido de amonio a diferentes concentraciones, con el fin de disminuir el contenido de ácidos nucleicos en las mismas. Se comparan estos resultados con los obtenidos anteriormente para la levadura panadera.

MATERIALES Y METODOS

El crecimiento de la levadura (*K. fragilis*) se llevó a cabo en forma escalonada desde el nivel de zaranda hasta un fermentador de 1 m³ adicionando la miel en etapas, a fin de obtener las mayores velocidades de crecimiento.

Se empleó medio miel con 2% de azúcares reductores, suplementado con SO₄(NH₄)₂ 1,6 g/l, PO₄H(NH₄)₂ 1,08 g/l y urea 0,73 g/l. Las sales utilizadas fueron de calidad comercial, simulando en todos los aspectos las condiciones industriales.

La fermentación se llevó a cabo a 34°C, pH 4,0, aire 0,93 vvm y 200 rpm.

El crecimiento del microorganismo se siguió por conteo en cámara a diferentes tiempos. Al final de la fase exponencial de crecimiento, la biomasa obtenida se centrifugó y se lavó una vez con agua corriente.

Esta biomasa fue tratada con hidróxido de amonio en concentraciones de 0,33% a 9,2% (referido en base seca de levadura), con vista a reducir el contenido de ácidos nucleicos. El proceso se llevó a cabo en un termotato, empleando como temperaturas de incubación 65 y 70°C. Una vez alcanzada la misma, la suspensión se mantuvo durante 30 minutos. Al final del tratamiento se sacaron muestras para determinar masa seca gravimétrica, % de ácidos nucleicos por el método de Rut⁴ y % de proteína por el método de Lowry⁵. A los sobrenadantes se les determinó proteína por el método anterior.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las Figs. 1 y 2 muestran las curvas de crecimiento obtenidas a escala de 100 litros y 1 m³. Como puede observarse las velocidades de crecimiento obtenidas fueron de 0,65 h⁻¹ (r = 0,99) y 0,71 h⁻¹ (r = 0,98) respectivamente, lo que implica tiempos de duplicación de 1,06 horas y 0,97 horas.

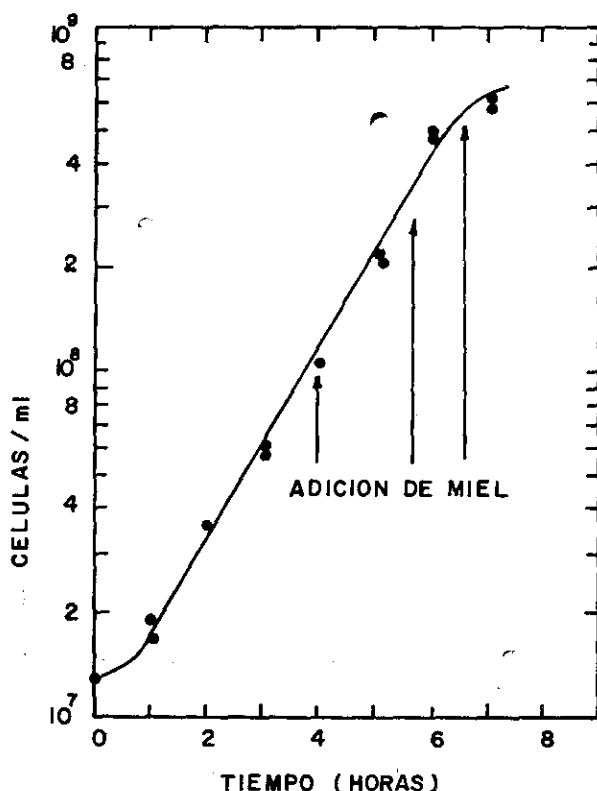


Fig. 1. Curva de crecimiento de la cepa *K. fragilis* en fermentador de 100 litros
 T = 34°C pH = 4,0 aire = 0,93 vvm
 rpm = 200 μ = 0,65 h⁻¹

La biomasa obtenida bajo estas condiciones presentó las características que pueden verse en la Tabla I.

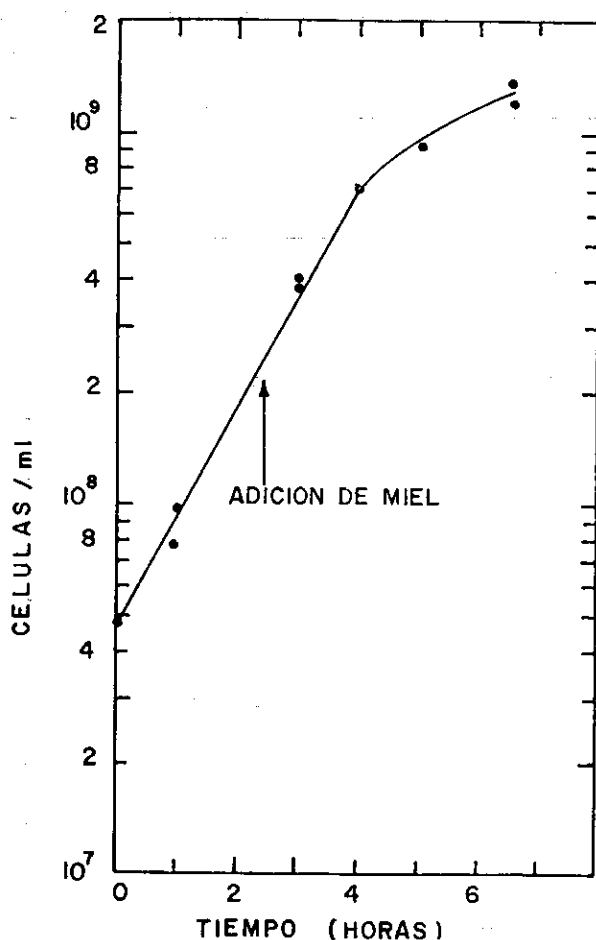


Fig. 2. Curva de crecimiento de la cepa *K. fragilis* en fermentador de 1 m³

T = 34°C pH = 4,0 aire = 0,93 vvm
rpm = 200 $\mu = 0,71 \text{ h}^{-1}$

Como puede observarse en la Tabla, el contenido de ácidos nucleicos es bastante alto, lo cual era de esperar debido a que se trabajó a altas velocidades de crecimiento ($0,71 \text{ h}^{-1}$).

TABLA I

Valores del % de masa seca, % de proteína y % de ácidos nucleicos de la biomasa obtenida

% Masa seca	23,16 $\pm$ 0,28
% Acidos nucleicos	12,08 $\pm$ 0,52
% Proteína (Lowry)	40,00 $\pm$ 1,00

En la Fig. 3 se muestran los resultados obtenidos en cuanto al % de reducción de ácidos nucleicos, el % de pérdidas de proteínas y el % de pérdidas de biomasa, para las dos temperaturas de incubación empleadas y a diferentes concentraciones de hidróxido de amonio. Como se observa en la misma, utilizando una concentración de amonio de 4,5% a 65°C se obtiene una reducción del contenido de ácidos nucleicos de alrededor del 90%, lo que equivale a un producto final con una concentración en ácidos nucleicos de aproximadamente 1,2%. Es de notar, que condiciones de tratamiento más enérgicas no influyen notablemente en la reducción de los ácidos nucleicos.

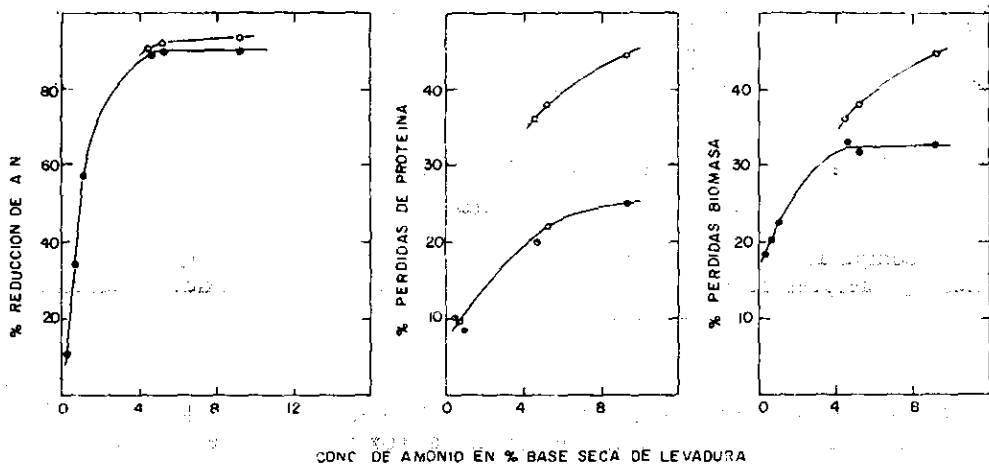


Fig. 3. Reducción de ácidos nucleicos y pérdidas de biomasa y proteína después de 30 minutos de tratamiento térmico con hidróxido de amonio a diferentes concentraciones (●) 65°C (○) 70°C.

En cuanto a las pérdidas de proteína y biomasa con los tratamientos, se observa un marcado incremento en éstas al aumentar la temperatura de incubación. Además, se observa que a 70°C, las pérdidas aumentan considerablemente con los aumentos en la concentración de hidróxido de amonio.

Es por tanto, conveniente, no aumentar la temperatura de incubación más de 65°C, ya que las pérdidas de biomasa y proteína son mucho mayores y en cambio el aumento en la reducción de los ácidos nucleicos no es apreciable. A 65°C y una concentración de amonio de 4,5% se obtienen pérdidas de biomasa y proteína de 30% y 20%, respectivamente.

La Fig. 4 presenta la comparación de las cepas *K. fragilis* y *S. cerevisiae* en cuanto a su comportamiento con el tratamiento térmico con hidróxido de amonio.

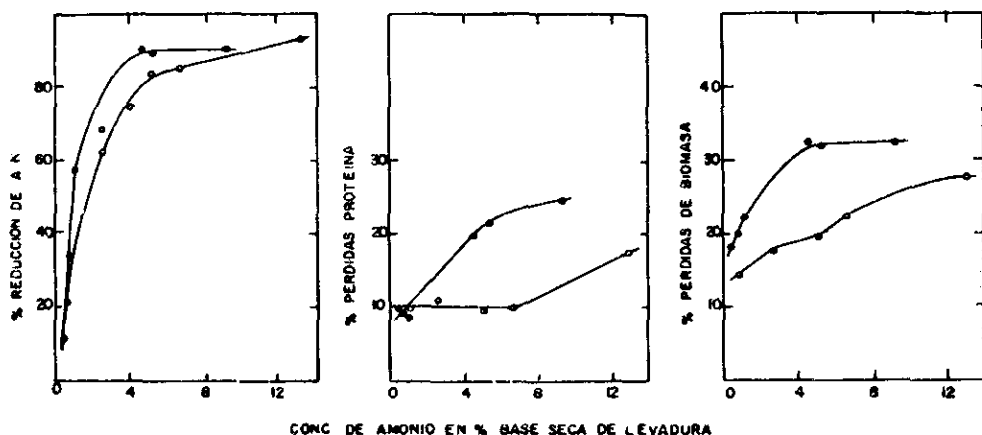


Fig. 4. Comparación del comportamiento de las cepas *K. fragilis* (●) y *S. cerevisiae* (○) después de 30 minutos de tratamiento a 65°C con hidróxido de amonio a diferentes concentraciones

En el caso de la levadura panadera (*S. cerevisiae*), la cual presenta un contenido inicial de ácidos nucleicos de aproximadamente 7% (debido a las bajas velocidades de crecimiento a nivel industrial), tratada con 4,5% de amonio a 65°C, se obtuvo una reducción de los ácidos nucleicos de aproximadamente un 80%, lo que representa un producto con un

contenido final de ácidos nucleicos de aproximadamente 1,4%. Mientras que, la *K. fragilis* con una concentración inicial de ácidos nucleicos de casi el doble (12,08%) en las mismas condiciones logró una concentración final similar.

Con relación a las pérdidas de proteína y biomasa podemos observar en la figura que la cepa *K. fragilis* presenta mayores por cientos de pérdidas, siendo mayormente incrementados a medida que se aumenta la concentración de amonio y la temperatura. La cepa *S. cerevisiae* presenta una mayor resistencia al ataque del amonio, debido al parecer a la existencia de una pared celular mucho más resistente, como lo demuestran sus menores pérdidas de proteína y biomasa, así como su menor por ciento de reducción de los ácidos nucleicos.

De lo anterior, queda evidenciado la conveniencia de trabajar a una temperatura más baja, en el mismo rango de concentraciones de amonio, con la *K. fragilis*, a fin de minimizar las pérdidas de proteína y biomasa, a la vez de economizar en el proceso técnico.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que: A velocidades de crecimiento altas, $0,65 \text{ hr}^{-1}$ y $0,71 \text{ hr}^{-1}$ como las obtenidas para la cepa de levadura *Kluveromyces fragilis*, en condiciones de planta piloto, corresponden valores también altos en el contenido de ácidos nucleicos (12,08%).

Durante el tratamiento con hidróxido de amonio quedó evidenciado que temperaturas de 65°C y concentraciones de amonio de 4,5%, logran la reducción de alrededor de un 90% de los ácidos nucleicos, con pérdidas de proteína de alrededor de un 20% y un 30% de biomasa.

La comparación de los resultados en igualdad de condiciones de la *K. fragilis* con la *S. cerevisiae*, evidencia una menor resistencia de la pared de la primera, lo cual explica el llegar a una concentración final similar de ácidos nucleicos, a pesar de casi duplicar su contenido inicial. Este efecto también se puso de manifiesto en las mayores pérdidas observadas en biomasa y proteína.

REFERENCIAS

1. VETTERLEIN G. Y KAURUFF. W. Conferencia en el V Coloquio de Tecnología de Alimentos de la Empresa Superior de Köthem, octubre 1977.
2. OTERO M. A., CABELLO A. Y CONDE J. *Revista ATAC*, 3, 49, 1982.
3. GÓMEZ J. Y VINIEGRA G. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 21, 97, 1977.
4. RUT M. *Kvasný Prmysl*. 19, 131, 1973.
5. LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. *J. Biol Chem.* 193, 265, 1951.