



**Universidad Nacional Autónoma de México**

FACULTAD DE QUIMICA

**AISLAMIENTO, PURIFICACION Y ALGUNOS  
ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LAS  
LEVADURAS:**

PICHIA BARRAGANI, TORULOPSIS AQUAMELLIS Y  
SACCHAROMYCES CARBAJALI.



DEPTO. DE PASANTES Y  
EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**Quimico Farmaceutico Biologo**

**P R E S E N T A N:**

**Silvia Calderón Martínez**

**Pedro Loarca Ramírez**

**1980.**



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.

\*

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profra. LILIA VIERNA GARCIA.  
VOCAL: Profr. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN.  
SECRETARIO: Profr. JORGE SOTO SORIA.  
1er. SUPLENTE: Profra. BEATRIZ LUNA MILLAN.  
2o. SUPLENTE: Profr. JAVIER LUMBRERAS GUERRERO.

Sitio donde se desarrolló el tema:


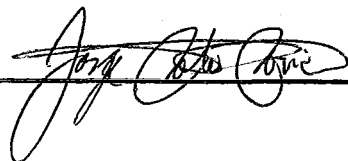
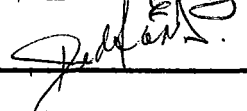
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA EXPERIMENTAL. FACULTAD DE QUIMICA

Sustentantes:

SILVIA CALDERON MARTINEZ

PEDRO LOARCA RAMIREZ

ASESOR: Profr. JORGE SOTO SORIA

A NUESTROS PADRES

CON CARIÑO Y PROFUNDA GRATITUD

A NUESTROS QUERIDOS HERMANOS

CON RESPETO Y AGRADECIMIENTO  
AL PROFESOR JORGE SOTO SORIA.

AL Dr. SERGIO SANCHEZ  
POR SU APRECIABLE AYUDA.

A NUESTROS MAESTROS.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

## I N D I C E

I.-	INTRODUCCION.....	1
II.-	GENERALIDADES.....	5
III.-	MATERIAL Y METODOS.....	36
IV.-	RESULTADOS.....	61
V.-	DISCUSION.....	74
VI.-	CONCLUSIONES.....	84
VII.-	BIBLIOGRAFIA.....	90

## I.- INTRODUCCION

Las levaduras por ser microorganismos de fácil crecimiento y por su alto contenido de proteínas y vitaminas, son consideradas como una fuente altamente alimenticia. Por esta razón el objetivo de este trabajo es contribuir a ampliar el conocimiento de levaduras aisladas del aguamiel y pulque, de las siguientes especies: Saccharomyces carbajali, Pichia barragani y Torulopsis aquame-llis.

Concretamente, se pretendió hacer una cuantificación de los ácidos nucleicos presentes en estas levaduras, siendo esto de importancia para decidir si estas levaduras pueden emplearse como alimento y por lo tanto producirse en gran escala para ayudar en la dieta humana.

Es bien sabido que las levaduras que más se emplean en la industria: Saccharomyces cerevisiae y Candida utilis tienen un alto contenido de proteínas y vitaminas, sin embargo su contenido de ácidos nucleicos también es -



alto, lo cuál es indeseable ya que el metabolismo de las bases púricas que contienen éstos, dá como consecuencia la formación de ácido úrico, que es un compuesto tóxico para el organismo; por tal motivo el empleo de la levadura como fuente alimenticia está limitada.

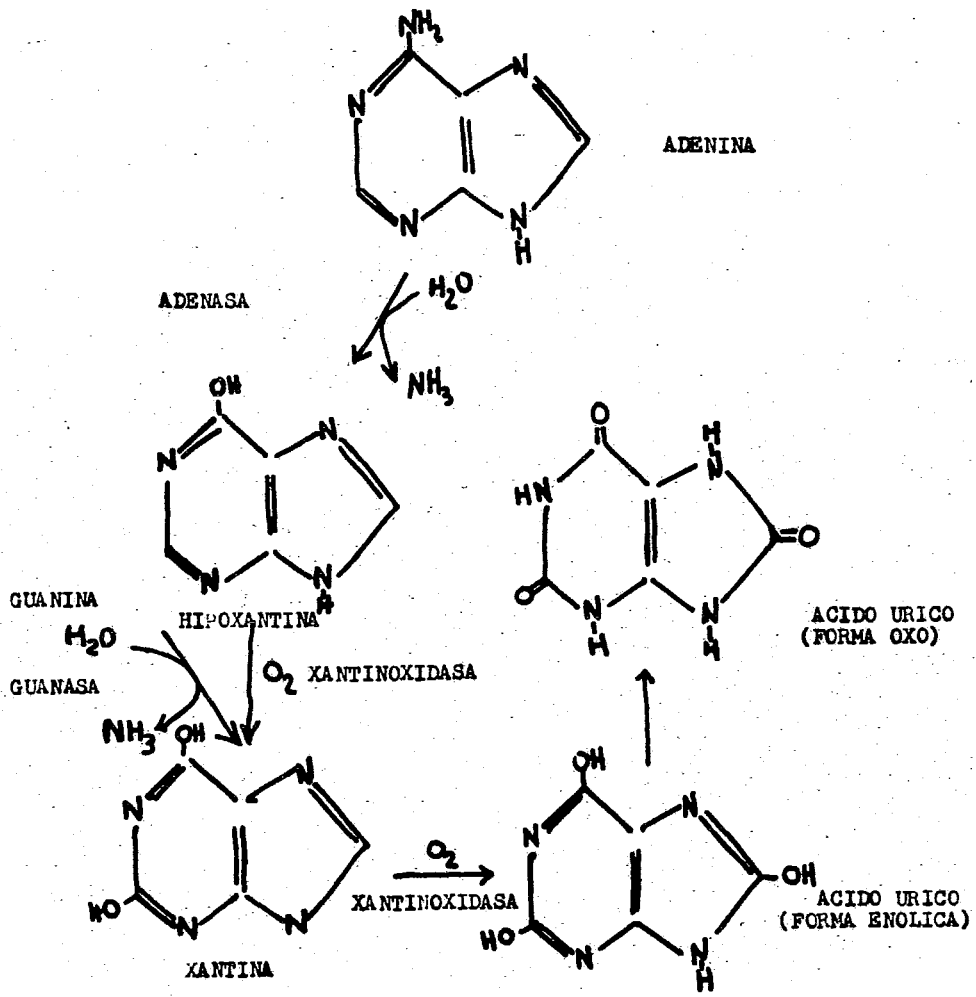
Un hecho frecuente es el consumo de pulque por un amplio sector de la población, principalmente rural; debido a que éste es un producto de origen natural, que se obtiene abundantemente de la "raspa" del maguey. El pulque por su composición, cumple cierta función alimenticia, y al parecer no tiene efectos tóxicos sobre las personas que lo consumen, muchas veces en forma rutinaria. Esta observación nos alentó a llevar a cabo esta investigación y demostrar la posible toxicidad de esta bebida en las personas que lo ingieren, puesto que en ella encontramos gran cantidad de levaduras, entre las que se encuentran, las que son motivo de este estudio.

En investigaciones anteriores (7.9), (7.10), se ha encontrado que estas levaduras, al igual que las tra-

adicionalmente empleadas, contienen un alto nivel de proteínas y no sólo eso, sino que son capaces de desarrollarse, partiendo de sustratos muy simples y baratos como la melaza de caña, el agua de cocimiento de maíz, el sulfato de amonio, etc. Esto es importante porque de ser posible la producción en gran escala de estas levaduras, ayudaría a que el proceso fuera costeable.

En este trabajo se estudiaron tres levaduras y su contenido en ácidos nucleicos, de las especies que más abundan en el aguamiel y el pulque, para efectuar así un estudio comparativo, que al final nos permitió indicar cuál es la levadura que más convendría para la producción industrial, como fuente alimenticia.

DEGRADACION DE LAS PURINAS A ACIDO URICO.



## II.- GENERALIDADES

Desde tiempo inmemorial el hombre ha utilizado - las levaduras para fermentar zumos de frutas, para esponjar el pan y para hacer sabrosos y nutritivos ciertos productos alimenticios.

Actualmente se emplean en procesos fermentativos - muy diversos; para sintetizar vitaminas, grasas y protef-  
nas a partir de azúcares sencillos y nitrógeno amoniacal.

Las levaduras son microorganismos ampliamente dis-  
tribuidos en la naturaleza. Están presentes en frutas, -  
granos, sustancias azucaradas como el aguamiel en el que-  
se encuentran en grandes cantidades, también las podemos-  
encontrar en el suelo, aire y como patógenos tanto en ani-  
males como en plantas (7.23).

Las levaduras presentan células esféricas u ova -  
les que miden de 1-5 micras de ancho por 5-30 micras o más

de longitud; son mononucleares y unicelulares. La pared celular que recubre la parte externa de la membrana citoplásmica limitante, está compuesta por polímeros de hexosas y hexosaminas. En muchas levaduras, la estructura principal macromolecular de la pared es la quitina, formada por moléculas de N-acetil glucosamina. En algunas se han identificado complejos de polisacáridos y proteínas que poseen en abundancia residuos de cistina y al parecer, la reducción reversible de sus puentes bisulfuro se relaciona con la formación de yemas. (7.03).

Las levaduras se pueden reproducir de tres maneras: Por gemación, fisión o bien por esporas sexuales. En la gemación, la célula hija es en principio mucho menor que la célula madre, mientras que en la fisión se forman dos células aproximadamente iguales.

La reproducción sexual, se logra a través de los siguientes pasos; 1) Un núcleo haploide de una célula donante (macho), penetra en el citoplasma de una célula receptora (hembra).

2) Los núcleos del macho y de la hembra se fusionan para formar un núcleo cigótico diploide. 3) El núcleo diploide origina cuatro núcleos haploides por meiosis, algunos de los cuáles pueden ser recombinantes genéticos.

Las levaduras también poseen un metabolismo heterótrofo, es decir que se nutren a expensas de compuestos orgánicos; puesto que no son organismos fotosintéticos. Sin embargo muchas especies son capaces de crecer en un medio mínimo; pueden soportar temperaturas de 50°C o más, altas concentraciones salinas, medios extraordinariamente ácidos, etc.

Una característica importante es que los hongos pueden ser inducidos, por medio de los sustratos convenientes y análogos a formar las enzimas degradativas correspondientes. (7.22).

## T A X O N O M I A

Las levaduras se han dividido fundamentalmente en dos grupos: Levaduras Ascospórogenas y Levaduras Anascospórogenas; además hay un tercer grupo de levaduras que no forman ascosporas, sino esporas semejantes a las basidiosporas, y están incluidas en la familia Sporobolomycetaceae.

## LEVADURAS ASCOSPOROGENAS.

Las levaduras ascospórogenas se incluyen en la familia Endomycetaceae, del orden Plectascales, clase Ascomycetes, división Eumycetes.

La familia Endomycetaceae se caracteriza por el desarrollo en forma de micelio, pseudomicelio, oidios o células de levaduras, juntas o aisladas. Multiplicación por división transversal o gemación.

Presentan ascas desnudas resultantes de una conju-

gación isogámica o heterogámica o bien por Partenogénesis; las ascosporas son esféricas o hemisféricas, angulares, fusiformes, de pared lisa, rugosa o con un reborde circular. Incluye especies tanto oxidativas como fermentativas. Están incluidas dentro de esta familia las siguientes subfamilias:

SUBFAMILIA A.- Eremascoideae. Incluye al género Eremascus.

SUBFAMILIA B.- Endomycoideae. Con dos géneros Endomyces y Schizosaccharomyces.

SUBFAMILIA C.- Saccharomycoideae. Comprende las tribus:

Tribu A.- Endomycopseae. Con el género Endomycopsis.

Tribu B.- Saccharomyceteae. Que incluye los géneros: Saccharomyces, Torulaspora, Pichia, Hansenula, Debaryomyces y Schwanniomyces.



Tribu C.- Nadsonieae. Son los géneros -  
 Saccharomycoides, Hanseniaspora y -  
 Nadsonia.

SUBFAMILIA D.- Nematosporoideae, Comprende los -  
 géneros: Monsoporella, Nematospo-  
 ra y Coccidiascus.

#### LEVADURAS ANASCOSPORÓGENAS.

Las levaduras anascosporógenas son aquellas que -  
 no forman esporas. Lodder las dividió en tres familias:-  
 La familia Nectaromycetaceae, Rhodotorulaceae y Torulopsi-  
 daceae. En la primera se incluyen levaduras de los nécta-  
 res de las flores y que en algunas especies se muestran -  
 en grupos de cuatro células, en forma de cruz; a veces -  
 se generan conidias en la superficie de las colonias. -  
 Mientras que en la segunda se encuentran levaduras que po-  
 seen pigmentos carotenoides rojos, amarillos y anaranja-  
 dos; no son fermentativas, siempre utilizan para la respi-  
 ración la glucosa, la levulosa, la manosa y a veces otros

azúcares; asimilan siempre asparagina, urea y peptoná. -  
Esta familia comprende sólo el género *Rhodotorula*.

En la última familia se incluyen la mayoría de las levaduras silvestres presentes en el aire, tierra, raíces, cadáveres, etc. Presentan reproducción por gemación unipolar o bipolar principalmente, aunque puede haberlas multipolares. En ciertas especies las células forman prolongaciones que asemejan tubos de copulación; pueden o no formar velos en los medios líquidos, algunos géneros forman pseudomicelios con aparatos esporíferos. No poseen pigmentos de naturaleza carotenoide, asimilan algunos azúcares y substancias nitrogenadas; son formas imperfectas de la familia *Endomycetaceae*, de la cual seguramente derivan. Comprende las subfamilias.

SUBFAMILIA *Torulopsidaeae*. No forma micelio ni pseudomicelio ni aparato esporífero. Mientras que en la SUBFAMILIA *Mycotoruloideae* si se observa micelio, pseudomicelio y aparato esporífero.

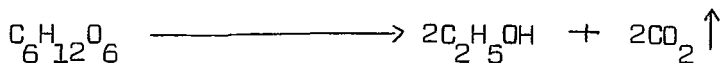
## LEVADURAS QUE FORMAN BASIDIOSPORAS.

Estas levaduras están comprendidas dentro de la familia Sporobolomycetaceae, que son hongos microscopicos, que se propagan principalmente por brotes, como en los Saccharomycetes que producen esterigmas simples, bifurcados y rara vez ramificados, forman esporas apiculadas, brillantes y hialinas que al madurar, son arrojadas de manera semejante a las esporas múltiples de los verdaderos Basidiomycetes. Las esporas cuya forma es semejante a los basidiosporas múltiples, pueden formar esporas secundarias, como la basidiosporas múltiples de los protobasidiomycetes. En esta familia Deryx incluyó dos géneros - Sporobolomyces y Bulleria. (7.07; 7.25).

## FISIOLOGIA DE LAS LEVADURAS

La degradación de los azúcares, como la glucosa, se realiza por procesos anaerobios (fermentación), o aerobios (respiración). El proceso más característico es el-

ciclo anaerobio que se conoce comúnmente como fermentación alcohólica. Representado en la siguiente ecuación:



Esta fermentación ocurre según el esquema de Embden-Meyerhof (7.22); si los cultivos se exponen a la acción del aire durante el crecimiento, el proceso fermentativo se detiene en favor de trayectorias oxidativas. Los di, tri y polisacáridos deben ser hidrolizados previamente para poder ser fermentados por las levaduras (7.25).

La capacidad que tienen ciertas levaduras de asimilar compuestos como la xilosa, la D-ribosa, almidón, asparagina, etc; sirven como una de las bases para la identificación de las levaduras (7.26).

Las levaduras están constituidas de proteínas, lípidos, azúcares, vitaminas y ácidos nucleicos. Se ha visto que estos últimos se encuentran en alta concentra-

ción, cuando menos en las levaduras hasta hoy estudiadas. En virtud de la importancia que tienen los ácidos nucleicos, se han desarrollado varios métodos destinados a la determinación de su concentración; antes de mencionar dichos métodos es conveniente recordar la bioquímica del ácido ribonucleico (RNA) y del ácido desoxirribonucleico (DNA).

## ACIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos están constituidos por unidades estructurales llamadas mononucleótidos, que constan de tres componentes característicos: 1) Una base nitrogenada; 2) Un azúcar de 5 átomos de carbono y 3) Acido fosfórico. (7.18).

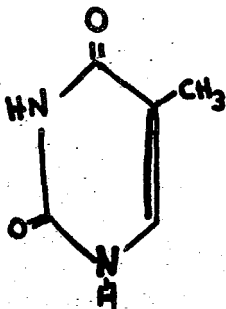
Las bases nitrogenadas son de dos clases: Bases Púricas y Bases Pirimídicas. En los nucleótidos existen por lo general 2 bases púricas que son: la Adenina y la Guanina (A y G respectivamente) y tres bases pirimídicas-

que son: Uracilio, Timina y Citosina (U, T, C respectivamente).

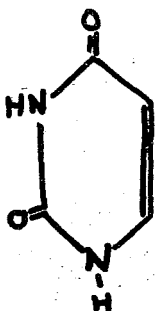
Las propiedades de las bases púricas y pirimídicas son muy semejantes; su solubilidad en el agua es muy limitada, todas ellas existen en formas tautómeras. Los átomos de los nitrógenos del anillo de la pirimidina y de la purina son debilmente básicos con valores de  $pK'$  de 9 a 10, por encima del cuál pierden sus protones. Todas las bases púricas y pirimídicas absorben fuertemente la luz ultravioleta en la zona de 260 y 280 nanometros, la longitud de onda de máxima absorción es aproximadamente de 260 nm. Esta propiedad es útil para el análisis cuantitativo de bases libres, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleícos. Las bases se separan facilmente mediante cromatografía en papel o en capa fina.

Cuando los nucleótidos se someten a hidrólisis parcial y pierden su grupo fosfato se obtienen los nucleósidos que son N-glucósidos de las bases nitrogenadas en que

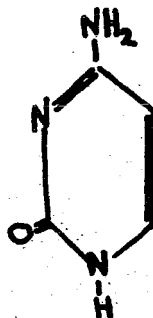
## PIRIMIDINAS



TIMINA  
(5-Metil-2,4-Deoxipirimidina)

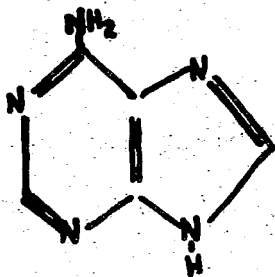


URACILO  
(2,4-Dioxipirimidina)

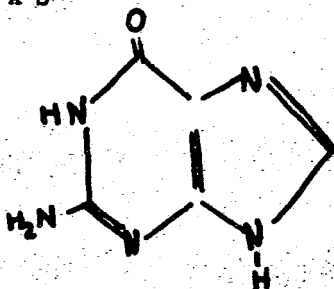


CITOSINA  
(2-Oxi-4-Aminopirimidina)

## PURINAS



ADENINA  
(6-Aminopurina)



GUANINA  
(2-Amino-6-Oxipurina)

el átomo de carbono 1 de la pentosa se une por enlace beta-glucosídico al átomo de nitrógeno N<sub>1</sub> de la pirimidina o al N<sub>9</sub> de la purina. La pentosa siempre se encuentra como furanosa. Los nombres triviales de los nucleósidos principales son: Adenosina, Guanosina, Citidina, Uridina, 2-desoxiadenosina, 2-desoxiguanosina, 2-desoxicitidina y 2-desoxitimidina. Los nucleósidos son más solubles en el agua que los nucleótidos de los que provienen. Se separan fácilmente por cromatografía de papel o capa fina, son más estables en disoluciones alcalinas, pero se hidrolizan fácilmente al calentarlos con ácidos. Los nucleósidos pirimidícos son más resistentes a la hidrólisis que los nucleósidos purínicos. (7.18).

Las purinas A y G y la pirimidina C son comunes tanto al RNA como al DNA, pero algunos ácidos desoxirribonucleícos contienen 5-hidroximetilcitosina.

Los nucleótidos de pirimidina son difíciles de hidrolizar mientras que los de purina son relativamente fá-



ciles de hidrolizar, por lo que en las reacciones de control de los azúcares sólo los pertenecientes a los nucleótidos de purina reaccionan.

Los nucleótidos son ésteres fosfóricos de los nucleósidos en los que el ácido fosfórico esterifica uno de los grupos hidroxílicos libres de la pentosa. Se encuentran en forma libre en las células, por hidrólisis parcial de los ácidos nucleicos, debido a la acción de las nucleasas; predominando los que poseen el fosfato en posición 5'; ya que las reacciones enzimáticas de síntesis y de ruptura de los ácidos nucleicos ocurren a través de los 5' fosfatos de los nucleósidos.

En el caso de los desoxirribonucleótidos existen 2 sitios susceptibles de esterificarse, los 3' y los 5' de la desoxirribosa; mientras que en el caso de los ribonucleótidos la posición 2', 3' y 5' pueden esterificarse. Se conoce también un 2' 3'-Fosfato cíclico de adenosina.

Los mononucleótidos de ambas series son ácidos

fuertes ya que los valores de  $pK'$  de los dos protones dissociables del ácido fosfórico son 1.0 y 6.2 aproximadamente. A pH de 7 los nucleótidos libres existen, por lo tanto, fundamentalmente en la forma de  $R-O-PO_3^{2-}$  en donde R es el grupo nucleósido. Los mononucleótidos se separan fácilmente por electroforé<sup>s</sup>is en papel o por cromatografía de intercambio iónico, de papel o de capa fina. El grupo 5'-Fosfato de los mononucleótidos es relativamente estable a la hidrólisis ácida, sin embargo la enzima 5'-Nucleótidasa puede hidrolizar el fosfato en esta posición sin atacar el enlace N-Glucosídico.

Todos los ribonucleósidos y los 2-desoxirribonucleósidos se encuentran también en la célula en la forma de 5'-difosfatos y 5' trifosfatos, es decir, en forma de ésteres de los ácidos 5'-pirofosfórico y 5'-trifosfórico de los nucleósidos. Los grupos fosfato específicos de estos compuestos se denominan por alfa, beta y gamma.

Los grupos fosfato de estos nucleósidos pueden ser hidrolizados selectivamente por enzimas específicas. Tam

bién se hidrolizan completamente por ebullición con ácido clorhídrico 1N durante 7 minutos, sin que se divida el enlace alfa-fosfato, pero este procedimiento hidroliza también el enlace N-glucosídico.

Los nucleósidos 5'-trifosfato, actúan como precursores ricos en energía de las unidades mononucleótidas en la síntesis enzimática del DNA y del RNA; durante estas reacciones pierden un grupo pirofosfato terminal y se transforman en los restos monofosfatos de nucleósidos de los ácidos nucleicos.

La unión de varios desoxirribonucleótidos enlaza dos covalentemente, constituyen el ácido desoxirribonucleico, mientras que la unión de los ribonucleótidos constituyen el ácido-ribonucleico; ambos ácidos comparten cierto número de propiedades físicas y químicas, puesto que sus unidades mononucleótidas se encuentran unidas covalentemente, mediante puentes fosfodiéster de la posición 3' de un mononucleótido a la posición 5' de otro (7.18).

DNA (Acido Desoxirribonucleico).

El DNA está constituido por cuatro unidades mononucleotídicas:

1) Acido desoxiadenosín-5'-fosfórico (Acido desoxiadenilico; dAMP);

2) Acido desoxiguanosín-5'-fosfórico (Acido desoxiguanilico; dGMP);

3) Acido desoxicitidín-5'-fosfórico (Acido desoxicitidilico; dCMP);

4) Acido desoxitimidín-5'-fosfórico (Acido desoxitimidilico; dTMP); que se hallan unidas en diferentes secuencias, mediante puentes 3'-5' Fosfodiéster, según la especie del organismo del que provenga.

Además del DNA nuclear pueden existir moléculas de DNA que constituyen plasmidios o episomas. El DNA nuclear está asociado con proteínas básicas llamadas histonas.

RNA (Acido Ribonucleico).

Existen tres tipos principales de RNA; el RNA mensajero (RNAm); el RNA ribosómico (RNAr) y el RNA de transferencia (RNAt). Con un peso molecular característico cada uno y una determinada composición de bases agrupadas - en una sola cadena. En la mayoría de las células hay de 5 a 10 veces más RNA que DNA.

RNA mensajero (RNAm).

El RNAm consta de cuatro bases: A, G, C y U, se sintetiza en el núcleo durante el proceso de transcripción, a partir del DNA cromosómico. Las bases del RNA son complementarias de las del DNA cromosómico. Después de este - proceso el RNAm pasa a los ribosomas en donde actúa como - patrón en la ordenación secuencial de los aminoácidos, - durante la síntesis de las proteínas. Los tripletes de - nucleótidos (codones) del RNAm, especifican la secuencia - aminoácídica de modo colineal.

RNA de Transferencia (RNAt)

Las moléculas del RNAt son relativamente pequeñas, actúan como portadoras de aminoácidos para la síntesis proteica. Contienen de 75 a 90 unidades mononucleotídicas; existe cuando menos un RNAt para cada uno de los veinte aminoácidos que se encuentran en las proteínas. El RNAt puede encontrarse en forma libre o "cargado" con sus aminoácidos correspondientes, en este caso el grupo carboxilo del aminoácido se haya esterificado al grupo 2' o 3' hidroxilo del resto del ácido adenilico terminal situado al extremo de una cadena polinucleotídica del RNAt; se caracterizan por contener hasta un 10% de bases secundarias, que son en su mayoría formas metiladas de las bases normales; contienen además mononucleótidos poco frecuentes, como los ácidos pseudouridilico y ribotimidilico.

El grupo hidroxilo 2' ó 3' del ácido adenilico terminal se esterifica enzimáticamente por un alfa-aminoácido específico y rinde la forma activa o de transferencia, es decir el aminoacil RNAt.

### RNA ribosómico (RNAr).

El RNAr constituye hasta el 75 % del resto de - - los ribosomas, se puede extraer con fenol apareciendo en tres formas características que sedimentan a 23 S, 16 S y 5 S respectivamente. La función del RNAr aún no está - clara. (7.18).

Los ácidos nucleicos pueden ser hidrolizados por - la acción de enzimas tales como el veneno de la serpiente de cascabel o la fosfodiesterasa del Bazo bovino que son - exonucleasas, así como la desoxirribonucleasa I del pán - creas bovino y la ribonucleasa II cristalizada del bazo, - el timo, etc; que son endonucleasas; la acción de éstas - enzimas es selectiva sobre ciertos enlaces del polinucleó - tido.

La hidrólisis puede ser también lograda por medio - de la acción de ácidos y bases. En medio ácido a pH de 3 se logra una hidrólisis selectiva del DNA por la ruptura - de los enlaces beta-glucosídicos entre las bases púricas -

y la desoxirribosa; los enlaces pirimidina-desoxirribosa y los del esqueleto permanecen inalterados, la substancia resultante se denomina ácido purínico.

El DNA no es hidrolizado por las bases, mientras que el RNA si lo es, obteniéndose una mezcla de nucleósidos 2' y 3' fosfatos y además pequeñas cantidades de 2', 3'-monofosfatos cíclicos de nucleósidos (7.18).

#### DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS

La estimación de los ácidos nucleicos se basa en reacciones más o menos específicas, o propiedades de bases orgánicas, pentosas y fosfato; los cuáles se consideran generalmente que existen en cantidades equimoleculares en las moléculas patrón. Ha sido costumbre cuantificar las bases por espectrometría ultravioleta, aunque se conocen reacciones químicas específicas; los azúcares por las reacciones colorimétricas de la pentosa con el orcinol y de la desoxirribosa con la



difenilamina y otros compuestos; y el fosfato por el método de Beremblum, Chain y Heatley. (7.33, 7.12).

A continuación se mencionan algunos de los métodos más comunmente empleados en la determinación de los ácidos nucleicos.

Los primeros métodos se basaban en la hidrólisis alcalina de los ácidos nucleicos. Actualmente este tratamiento se ha abandonado definitivamente por la comprobada inestabilidad del RNA bajo estas condiciones. Durante un tiempo este tratamiento fue sustituido por el uso de soluciones salinas de alta fuerza iónica que propiciaban la disociación de las nucleoproteínas en sus componentes. Más recientemente se observó que el empleo de detergentes como el Dodecil sulfato de sodio permitían obtener moléculas de RNA de mayor peso molecular que con otros métodos. (7.17).

La preparación de ribonucleato de sodio con el empleo de Dodecil sulfato de sodio consiste primero en

la separación de ribonucleoproteínas, usando solución-salina fisiológica que las aparta del material insoluble. A continuación estas se precipitan a un pH de 4.5 en frío. El RNA es disociado gradualmente del complejo de ribonucleoproteína mediante el Dodecil sulfato de sodio, que parece bloquear la acción de las enzimas que pueden degradar parcialmente al ácido nucleico. Este último se precipita entonces en presencia de un cloruro de sodio molar, adicionando 2 volúmenes de etanol. Un segundo tratamiento con el detergente, proporciona una mayor desproteínización, la cual se completa por centrifugación a alta velocidad en frío y a pH de 4.5 (7.08).

Se han empleado métodos para la preparación de RNA con el hidrocioruro de guanidina, obteniéndose un producto de peso molecular relativamente elevado y casi libre de proteínas, sin embargo se requiere un tratamiento con una mezcla de cloroformo y alcohol etílico para remover la proteína residual. (7.17).

Se han empleado diferentes tipos de células —

para la obtención de ácidos nucleicos; las levaduras - constituyen una buena fuente para aislarlos, sin embargo se han obtenido resultados muy variados de RNA, esto se debe a la presencia de diferentes ácidos ribo - nucleicos en las células, a la degradación enzimática - parcial y a la parcial degradación química. (7.27).

Algunos métodos tienden a minimizar la degra - dación enzimática y otros la degradación química. Con el uso de diferentes concentraciones de detergente, y diferentes tiempos de calentamiento para efectuar una - máxima extracción del RNA; se estableció una concen - tración de 0.5% de Dodecil Sulfato de Sodio a pH de 7 y un calentamiento de 3 minutos, para lograr la completa inactivación de la ribonucleasa del páncreas bovi - no. (7.08, 7.17).

Mediante el método descrito se logra la preci - pitación del 70 % del RNA presente. También se debe - de considerar que dado que el contenido de DNA es muy - pequeño (menos del 2% del RNA), la determinación del -

RNA es practicamente cuantitativa. (7.05).

Schneider desarrolló un método basado en extracciones con ácido tricloroacético frío (TCA), alcohol y alcohol-eter, el residuo del tejido es calentado en ácido tricloroacético al 5% por 15 minutos entre 90 y 95°C. El RNA y el DNA son hidrolizados, no así las proteínas que permanecen insolubles. Siguiendo este procedimiento se separan todos los azúcares reactivos; pero cantidades apreciables de fósforo quedan unidas a las proteínas. (7.26).

El método de Schneider puede verse afectado por una precipitación incompleta de la proteína. Otra dificultad es la interferencia de la absorción del ácido tricloroacético en la medición por ultravioleta de los ácidos nucleicos, No obstante, el método es útil ya que no se requiere la separación del DNA y RNA para su estimación, ya que la determinación se basa en reacciones coloridas características para las pentosas y deoxipentosas.

Ogur y Rosen logran la separación de los ácidos nucleicos aprovechando que el RNA se solubiliza con ácido perclórico 1N a 4°C por 18 horas, mientras que el DNA permanece insoluble, sin embargo puede solubilizarse por tratamiento con ácido perclórico 0.5 N durante 20 minutos a 70°C. (7.20).

Como ya se mencionó antes la cuantificación de los ácidos nucleicos también se puede efectuar en base a las reacciones de sus azúcares constituyentes con ciertos reactivos, ejemplos de esas reacciones son las siguientes: Prueba de la Difenilamina; Prueba de la p-Nitrofenilhidrazina, Prueba del Indol, Prueba de la Cisteína, Prueba del Triptofano; útiles para cuantificar el DNA; Prueba del Floroglucinol y Prueba del Orcinol que nos permiten medir las cantidades de RNA. (7.05, 7.12).

La prueba de la Difenilamina se basa en la formación de un color azul cuya máxima absorción ocurre entre 595 y 600 nm; cuando el DNA es calentado a 100°C

con el reactivo en una mezcla de ácido acético glacial y ácido sulfúrico; al parecer el color se debe a la formación de *w*-hidroxilaevulaldehído que subsecuente mente se condensa con la difenilamina.

Con objeto de tener mayor especificidad se utiliza la diferencia de las densidades ópticas a 595- y 650 nm. (7.33).

La prueba de la *p*-Nitrofenilhidrazina se fundamentalmente en la reacción que ocurre entre este compuesto y la deoxirribosa, formando un compuesto colorido cuando esta en presencia de ácido tricloroacético caliente. La densidad óptica se lee a 560 nm. en donde se detecta un color púrpura. La prueba anterior y ésta tienen sensibilidad semejante.

En la prueba del Indol ocurre la formación de un compuesto de color amarillo-café cuando el DNA se calienta con Indol en solución de ácido clorhídrico. Este método es 10 veces más sensible que la reacción de la Difenilamina; se utilizan extracciones con-

ácido perclórico ya que el ácido tricloroacético inhibe la reacción con el Indol. (7.12).

Mediante la reacción de la Cisteína y el ácido sulfúrico con el DNA se puede hacer una estimación directa del DNA, puesto que las pentosas no dan reacción colorida con el ácido sulfúrico y la cisteína. Se encontró que la concentración óptima de Cisteína para un máximo desarrollo de color fue de 0.05 ml. de hidrocioruro de cisteína al 5% con 5 ml. de ácido clorhídrico al 70%. No obstante este método no es específico puesto que el reactivo se combina también con el ácido fosfoglicérico, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato, etc.; lo cual no importa cuando se utiliza el método de Schneider (mencionado con anterioridad, 7.30).

El método del Triptofano no es específico para el DNA, puesto que reacciona también con el RNA. Con el primero da un color rojo y con el RNA un color verde. (7.05).

En los métodos colorimétricos para la determi-

nación del RNA no se cuenta con la misma especificidad que en los métodos para la determinación del DNA, debido a que se utilizan reacciones más o menos generales para las pentosas. Se trata de aumentar la especificidad aumentando el pH, la temperatura, en fin bajo condiciones cuidadosamente controladas que favorezcan la conversión de ribosa a furfural, que es capaz de reaccionar con varias sustancias cromogénicas. Una de las más empleadas es el Floroglucinol, que no reacciona con el DNA; otro método emplea orcinol con floruro férrico o cloruro cúproso como catalizadores. Un tercer método es el de la p-Bromofenilhidrazina en el que el furfural es extraído por el xileno antes de efectuar la reacción. (7.11).

Otros métodos que se emplean para la cuantificación de los ácidos nucleicos son aquellos que se basan en la absorción de sus bases púricas y pirimídicas en la región ultravioleta; para ello los ácidos nucleicos son hidrolizados con ácido tricloroacético o ácido perclórico, puede existir interferencia por la presen-



cia de aminoácidos aromáticos, lo cual se compensa empleando un blanco tratado de la misma manera que el problema.

Las bases púricas y pirimídicas no sólo se pueden determinar por absorción ultravioleta sino también por medio de reacciones coloridas específicas. Por ejemplo la Timina que forma un color rojo con el reactivo diazo de Koessler y Hank en solución alcalina y en presencia de un agente reductor. El Uracilo brominado y la Citosina reducen el arsenotungstato. Las demás bases no reaccionan después de la brominación. La Guanina produce un grado significativo de color después de la brominación, pero puede ser fácilmente removida por precipitación con sales de plata. La extinción producida por el Uracilo es casi el doble de la obtenida por la cantidad equimolecular de Citosina, (7.11, 7.05).

La cuantificación de los ácidos nucleicos también se puede lograr por el análisis del fósforo. Por ejemplo el método de Berenblum, Chain y Heatley que de

termina la cantidad de ácido fosfórico del núcleo y — el fósforo de las fosfoproteínas, habiendo eliminado completamente los lípidos y los compuestos fosforados-ácido solubles. Considerando que la cantidad de las — fosfoproteínas en la mayoría de los tejidos es mucho — menor que la cantidad del fósforo de los ácidos nucleícos, el método nos dá una buena aproximación de la — cantidad de fósforo presente en los ácidos nucleícos.— (7.27).

A partir de los compuestos fosforados obteni — dos por el procedimiento anterior, Schmidt y Thannhau — ser hacen la determinación; para ello la mezcla de las fracciones obtenidas por el procedimiento anterior es particionada en sus componentes por hidrólisis alcali — na con sosa o potasa 1N durante 16 horas; el DNA perma — nece insoluble mientras que el RNA se transforma inte — gramente en nucleótidos sin formarse fosfato inorgáni — co y el fósforo de las fosfoproteínas, se convierte — totalmente a fosfato inorgánico. (7.26).

## III.- MATERIAL Y METODOS

## 3.1.- Equipos

3.1.1.- Cristalería en general

3.1.2.- Mesa rotatoria de 200 rpm.

3.1.3.- G-24 Enviromental Incubator Shaker,

New Brunswick Scientific CO; Inc;

New Brunswick, N. J. U.S.A.

3.1.4.- Westhalia Separator A.G.

Oelde/Alemania; Tipo; L.W.A. 206

12 rpm?

3.1.5.- Centrifuga LOURDES.

Mod. No. 1019

Volts. 115, 60 ciclos, watts 1150.

3.1.6.- Automatic Refrigerated Centrifuge.

RC2-B SORVALL.

3.1.7.- Superspeed Refrigerated Centrifuge RC-5

Dupont Instruments SORVALL.

3.1.8.- Balanza analítica Mettler, modelo B5.

3.1.9.- Balanza granataria OHAUS 1201.

3.1.10.-Autoclave Modelo A1252/LE, para fermentador.

3.1.11.-Espectrofotómetro Ultravioleta.

Carl Zeiss Germany; Modelo PMQII, 48954.

3.1.12.-Espectrofotómetro Zeiss

Industrias Carl Zeiss de México; Modelo PM2A.

3.1.13.-Colorímetro; Spectronic 20.

Bausch & Lomb.

3.1.14.-Microscopio de Contraste de Fases.

R E I C H E R T.

3.1.15.-Microscopio Optico.

3.1.16.-Branson Sonic Power Company

Danbury Connecticut Sonifier

Power Supply B-12, watts 150.

## 3.1.17.- Homogenizador.

Tri-R Instruments Rockville Centre; N.Y.

Modelo K45; serie 6725.

## 3.1.18.- Vortex Jr. Mixer.

Scientific Industries Inc.

Springfield Masso 1103

Modelo K-500-J.

## 3.2.- MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

## 3.2.1.- Medio de Aislamiento.

Melaza.....	10.0 G.
Extracto de Levadura.....	1.0 g.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	0.5 g.
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0.2 g.
Agar.....	2.0 g.
Agua destilada.....	c.b.p. 100 ml.
pH.....	5.0

NOTA: Para el medio líquido no se utilizó agar.

## MEDIOS DE IDENTIFICACION

## 3.2.2.- Medio de Beijerinck para azúcares.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	0.5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0.1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0.05 g
Agar.....	2.0 g
Agua destilada.....	c.b.p. 100 ml
pH.....	5.0

NOTA.- Los azúcares utilizados en el ensayo fueron: -  
 Manosa, Fructuosa, Sacarosa, Arabinosa, Dextro  
 sa, Lactosa, Galactosa y Rafinosa en cantida -  
 des de 1%.

## 3.2.3.- Medio de Beijerinck para nitrógeno.

Glucosa.....	2.0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0.1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0.05 g

Agar..... 2.0 g

Agua destilada..... c.b.p. 100 ml.

NOTA.- Fuentes de nitrógeno  $\text{NO}_3^-$ , Urea, Asparagina y Peptona; se utilizaron cantidades al 1%.

### 3.2.4.- Medio de Fermentación.

Melaza..... 1000.0 g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ..... 50.0 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... 10.0 g

Agua de cocimiento de maíz..... 50.0 g

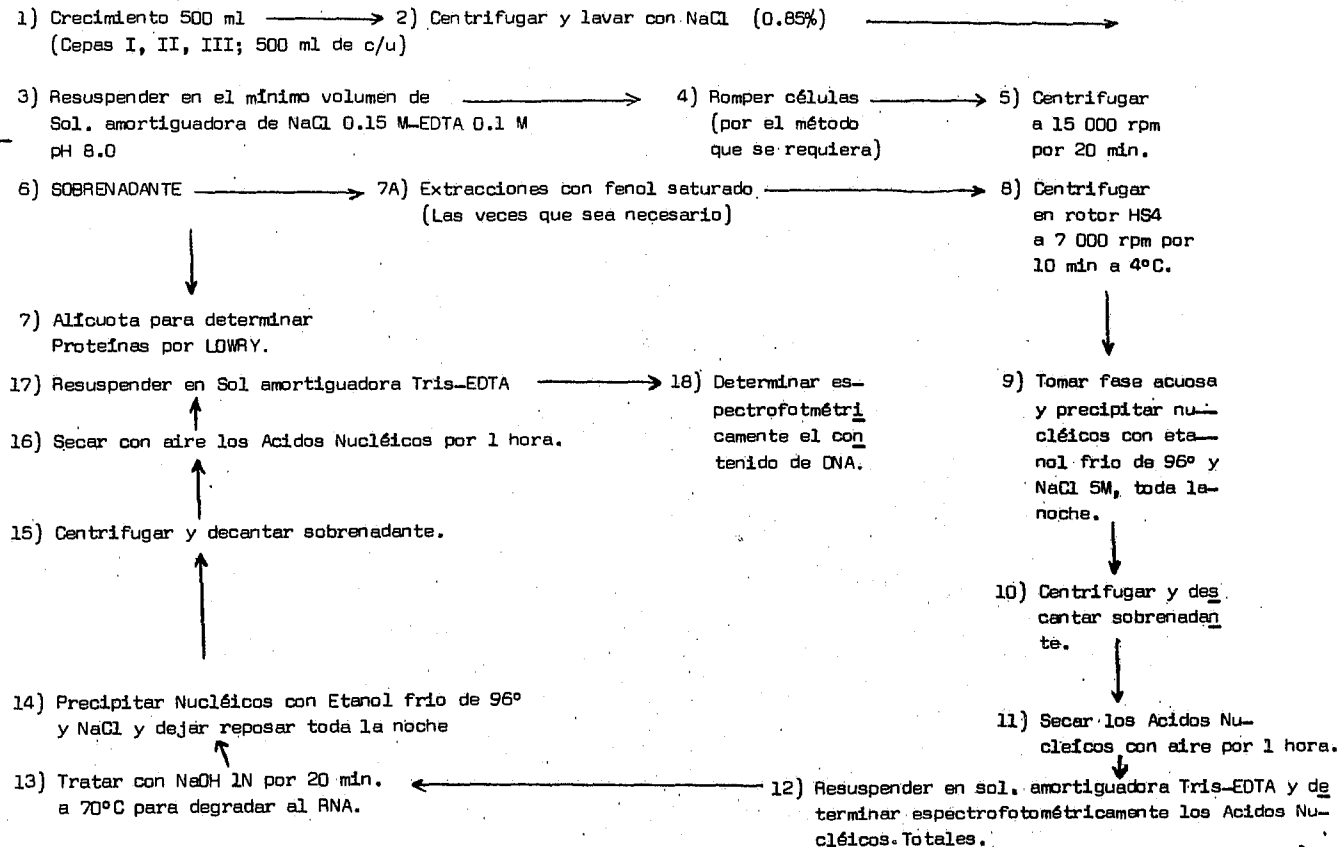
Agua destilada ..... c.b.p. 10 000 ml.

pH..... 5.0

NOTA.- A estos tres medios se les ajusta el pH a 5.0

Los medios antes citados se prepararon disol -  
viendo en agua destilada las cantidades de cada uno de  
los componentes. Posteriormente el medio ya preparado  
se le ajustó el pH y se esterilizó en el autoclave a -  
121°C por 20 minutos.





NOTA: Cepa I: *Saccharomyces carbagali*.  
 Cepa II: *Pichia barrageni*.  
 Cepa III: *Torulopsis aquamellis*.

### 3.3.- METODOS

#### 3.3.1.- Método de Aislamiento:

El aislamiento de las levaduras se efectuó por el método de la estria, inoculando una asada de agua - miel en placas de medio para aislamiento (3.2.1). De las colonias desarrolladas se tomaron aquellas, cuyas características morfológicas correspondieron a las descritas por Ruiz Oronoz (7.23). Dichas colonias se inocularon en caldo (3.2.1); para observar las características macroscópicas y desarrollo en medio líquido.

De las cepas seleccionadas, se procedió a obtener cultivos puros.

3.3.2.- Obtención de Cepas Puras de las Levaduras: Pichia barragani, Torulopsis aquamellis y Saccharomyces carbajali aisladas del aguamiel

El método empleado para obtener cultivos puros,

fué una modificación del método de Lindner (7.21); con sistente en lo siguiente: se efectuaron diluciones de las cepas aisladas desde  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  y de éstas se colocaron de 3 a 5 gotitas en un cubreobjetos previamente esterilizado a la flama, el cuál se invirtió sobre un portaobjetos excavado, que contenía una gota de agua estéril, de tal manera que las gotitas quedaron dentro de una pequeña cámara estéril y húmeda. Con la ayuda del microscopio y con el objetivo de 100 X se ob servaron las gotas y se marcaron aquellas, en las cuáles, hubo una sola célula; después por medio de un pequeño papel filtro estéril se absorbió la gota y se depositó en un tubo con caldo estéril (3.2.1); después de la incubación se observó el desarrollo de la levadura.

### 3.3.3.- Métodos de identificación.

#### 3.3.3.1.- Método de Beijerinck para Azúcares:

Para clasificar a las cepas en estudio, fué -

necesario seguir el método ideado por Beijerinck, para la asimilación de azúcares, en el cuál se utilizó el medio de Beijerinck (3.2.2.). El medio fundido se virtió en una caja de petri que contenía 2 ml. de la suspensión de levaduras, se homogenizó la mezcla y se espero a que solidificara, después se procedió a colocar una pequeña cantidad de los azúcares prueba en sitios de la placa previamente marcados. Posteriormente se incubaron las cajas a una temperatura de 28°C; observando los resultados a las 24 y 48 horas.

### 3.3.3.2.- Método de Beijerinck para Nitrógeno:

Para determinar la asimilación del nitrógeno, también se empleó el método auxonográfico de Beijerinck utilizándose para ello el medio de Beijerinck (3.2.3). El procedimiento fué similar al método de Beijerinck para azúcares, sólo que en lugar de azúcares se probaron diferentes fuentes de nitrógeno. Los resultados se observaron a las 24 y 48 horas.

### 3.3.4.- Pruebas de Fermentación:

También se realizaron pruebas de fermentación de azúcares, empleando para ello el método de Henrici, (7.23). Para ello se utilizó agua peptonada que contenía 2% de los siguientes azúcares: Glucosa, Levulosa, Xilosa, Manosa, Galactosa, Sacarosa, Maltosa, Lactosa, Rafinosa y Arabinosa.

Se utilizaron tubos de 25 cm por 150 mm, dentro de los cuales se colocaron pequeños tubos de Wassermann invertidos (10 cm por 75 mm), para recoger el gas. Se colocó el agua peptonada con el azúcar que se iba a probar, se inocularon con la cepa problema y después de la incubación a 28°C se hizo la lectura a las 24 horas.

Para complementar la identificación de las cepas, se observaron las características morfológicas de las mismas y se compararon con las descritas por Ruiz Oronoz.

### 3.3.5.- Determinación de azúcares reductores:

Con el objeto de conocer la concentración de los azúcares reductores presentes en el medio de cultivo se utilizó el método de Underkoffler y Guymon (7.32).

### 3.3.6.- Método de Obtención de Cultivos Concentrados de las levaduras.

Antes de proceder a la elaboración del Medio de Cultivo, se llevó a cabo un tratamiento de la melaza, con el objeto de eliminar los sólidos presentes que pudieran contaminar a la levadura obtenida en la fermentación.

La melaza se llevó a una dilución 1:3 y se ajustó el pH a 8.5 con hidróxido de potasio, se esterilizó en el autoclave durante 10 minutos a 1 atmósfera de presión y 120°C de temperatura. Después se llevó

a cabo la separación de los sólidos precipitados por medio del separador centrífuga Westphalia (3.1.4).

Posteriormente la melaza se llevó a un pH de 4.5 con ácido clorhídrico, esterilizándose nuevamente y centrifugando. Finalmente se agregó 1.0 g de carbón activado por litro de melaza y se centrifugó nuevamente.

Teniendo la melaza ya tratada, se procedió a elaborar el Medio de Fermentación, como se indica en (3.2.4).

La fermentación propiamente dicha, se inició con la propagación de una cepa de 24 horas de crecimiento. Posteriormente esta cepa se resembró en un tubo de 10 ml de medio, el cuál se incubó durante 24 horas a 28°C y en agitación en una mesa rotatoria (3.1.2). Al cabo de este tiempo la levadura obtenida se utilizó para inocular un matraz de 500ml, el cual, a su vez se mantuvo también en agitación y a 28°C du -

rante 36 horas. De este último matraz se tomaron 3 -  
alícuotas de 2 ml. cada una para determinar el peso de  
levadura obtenido por mililitro de medio de cultivo. -  
Estas muestras se procesaron en forma similar que el  
resto de la levadura obtenida como se describe más ade  
lante. Este procedimiento se realizó con las cepas -  
de Saccharomyces carbajali, Pichia barragani y Torulop  
sis aquamellis.

Una vez concluida la fermentación se llevó a -  
cabo la recuperación de las células, mediante la cen -  
trífuga Westphalia(3.1.4). La levadura obtenida se la  
vó una vez con agua destilada, otra vez con agua acidu  
lada con HCl al 1%, un tercer lavado con alcohol etili  
co y finalmente se deshidrató con éter. La levadura-  
así obtenida, se dejó secar a temperatura ambiente.

Las muestras destinadas a la determinación del  
peso de la levadura, se llevaron a peso constante a -  
70°C; para poder calcular los miligramos de levadura -  
por ml. de suspensión de células obtenidas en la fer -



mentación. En la levadura seca se determinó el % de proteínas por el método de Kjeldahl.

El procedimiento anteriormente descrito se realizó para cada una de las cepas en estudio.

3.3.7.- Obtención de Levadura para la Determinación de Acidos Nucléicos:

Se inoculó un matraz con 25 ml de medio de fermentación con una cepa de 24 horas de crecimiento, se incubó 24 horas a 28°C; a su vez éste volumen sirvió de inóculo para un matraz de 500 ml de medio de fermentación, éste último se incubó 36 horas a 28°C y con agitación. Se llevó a cabo la separación de las células centrifugando en una centrifuga RC-5 (3.1.7). El sedimento obtenido se lavó con ácido clorhídrico al 1% y con NaCl al 0.85 % 5 veces, obteniéndose un sobrenadante transparente. El sedimento obtenido se resuspendió en amortiguador de cloruro de sodio 0.15 M -EDTA 0.1 M, se centrifugó entonces a 10, 000 rpm en la centrifuga Lourdes (3.1.5), por 10 minutos a 40°C.

METODOS EMPLEADOS PARA LA LIBERACION DE LOS ACIDOS  
NUCLEICOS.

3.3.8.- Rompimiento de Células por medio de Perlas Styroport;

Se resuspendió la levadura en 15 ml de amortiguador de NaCl 0.15 M-EDTA 0.1 M. Se agregaron perlas styroport y se agitó durante 30 minutos en un agitador Vortex (3.1.18). Posteriormente se separaron las perlas mediante centrifugación y se agregó otra pequeña cantidad de amortiguador con el propósito de lavar las perlas y recuperar al máximo el extracto adherido a ellas. Después se centrifugó en una centrifuga Lourda des (3.1.5), por 25 minutos, a una velocidad de 12,000 rpm.

Se separó el sobrenadante y de éste, se tomó una alícuota de 1 ml para determinar proteínas por el método de Lowry (7.5); inmediatamente después se tomaron partes iguales del homogenado y de fenol saturado,

se centrifugó en rotor HS4 (3.1.7) a 7,000 rpm por 15 minutos. De las tres capas separadas (fenol-proteína-acuosa), se extrajo la fase acuosa, para nuevamente repetir la extracción con fenol; este procedimiento se efectuó cuatro veces y al final se obtuvo la fase acuosa en la que se precipitaron los ácidos nucleicos con etanol frío de 96° y NaCl 5 M, la solución se dejó reposar toda la noche en refrigeración. Transcurrido este tiempo se obtuvieron los ácidos nucleicos, se decantó el sobrenadante y se procedió a secarlos con aire durante 1 hora.

Una vez secos se resuspendieron en 10 ml de amortiguador Tris 10 mM- EDTA 1 mM, se hicieron diluciones 1:100 y 1:1000 de cada cepa y se leyeron en el espectrofotómetro ultravioleta (3.1.11), a 260 y 280 nm.

El sobrenadante restante se trató con sosa 1 N y se calentó en baño de agua a 70°C por 20 minutos, una vez frío se precipitó nuevamente con etanol de

96° frío (empleando dos volúmenes de alcohol por uno-  
de sobrenadante), y 0.2 ml de NaCl 5 M; se dejó repo-  
sar toda la noche, al día siguiente se secaron los áci-  
dos nucleícos con aire por 1 hora; se resuspendieron -  
en 5 ml de amortiguador Tris 10 mM - EDTA 1 mM y se -  
prepararon diluciones 1:100 y 1:1000, leyendose nueva-  
mente a 260 y 280 nm.

### 3.3.9.- Rompimiento de las Células con Fenol:

Una vez lavadas las células con NaCl al 0.85%,  
se resuspendieron en amortiguador de NaCl 0.15 M -EDTA  
0.1 M, se les añadió un volumen igual de fenol satura-  
do; el cuál estaba en una probeta graduada con tapón -  
esmerilado y se agitó durante 10 minutos para extraer-  
los ácidos nucleícos; posteriormente se vertió en tu-  
bos de vidrio corex de 60 ml y se centrifugó a 7,000-  
rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C en una  
centrifuga RC-5 (3.1.7); después de centrifugar se se-  
paró la fase acuosa y con ella se repitió el procedi-  
miento antes descrito.

Después de las extracciones con fenol saturado se precipitaron los ácidos nucleicos con etanol de 96° frío y 0.2 ml de NaCl 5M, se dejó toda la noche en reposo; posteriormente se separó el sobrenadante y se secaron los ácidos nucleicos precipitados con aire durante un período de una hora, una vez secos éstos, se resuspendieron en 10 ml de amortiguador Tris 10 mM - EDTA 1 mM y se prepararon diluciones 1:100 y 1:1000, para luego leer en el espectrofotómetro ultravioleta (3.1.11), a 260 y 280 nm.

Inmediatamente después el resto del sobrenadante se trató con 2 ml de hidróxido de sodio 1N, se calentó 20 minutos en un baño de agua a 70°C y se precipitó con etanol de 96° frío y NaCl 5 M, se dejó reposar toda la noche; se decantó el sobrenadante y se secaron los ácidos nucleicos con aire durante 1 hora y se resuspendieron en 5 ml de amortiguador Tris 10 mM - EDTA 1 mM; se prepararon nuevamente diluciones 1:100 y 1:1000, leyendose estas a 260 y 280 nm, para obtener el DNA.

3.3.10.- Rompimiento de las Células por medio del Sonicador y del empleo de perlas Styroport:

Una vez lavadas las células con NaCl al 0.85% por cinco veces, se resuspendieron en amortiguador de NaCl 0.15 M-EDTA 0.1 M. Se sonicaron durante 30 minutos, en el sonicador (3.1.16), manteniendo la temperatura adecuada para evitar el sobrecalentamiento, para ello se utilizó un baño de hielo picado. Después se completó la ruptura de las células en el Vortex, agregando a la suspensión perlas Styroport; posteriormente se separaron las esferas centrifugando a 5,000 rpm en la centrífuga Lourdes (3.1.5), durante 10 minutos, después se realizó un lavado de las esferas con NaCl 0.15 M-EDTA 0.1 M para recuperar lo más posible el sustrato. Inmediatamente se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 minutos, para eliminar los residuos de las levaduras.- De aquí se tomó una alícuota de 0.2 ml. para determinar proteínas por el método de Lowry (7.05).

El extracto celular se trató con fenol saturado 1:1, se centrifugó, previa agitación en probeta de tapón esmerilado, a 7,000 rpm por 10 minutos para sepa

rar las tres fases (fenol, proteína y acuosa), se recuperó la acuosa y se repitió la extracción con fenol 4 veces más.

De la última extracción se separó la fase acuosa y se precipitó con etanol de 96° frío y NaCl 5 M; - como se indicó antes por cada mililitro de la solución se ponen 2 ml de etanol de 96°, y del volumen total - de etanol que se agregó se adicionó la centésima parte de NaCl 5 M; se dejó toda la noche en refrigeración y - al día siguiente se separó el precipitado; se secaron - los ácidos nucleicos con aire, se resuspendieron con - amortiguador Tris 10 mM-EDTA 1 mM y se hicieron diluciones 1:100 y 1:1000 leyéndose a 260 y 280 nm.

Más tarde la solución se trató con NaOH 1N y - se calentó en baño de agua a 70°C por 20 minutos; se - reprecipitó con etanol de 96°C frío y 0.2 ml de NaCl - 5 M, se dejó reposar toda la noche, se decantó nueva - mente el sobrenadante, se secaron los ácidos nucleicos y se resuspendieron en amortiguador Tris 10 mM - EDTA - 1 mM; después se hicieron diluciones 1:100 y 1:1000 y - se leyó a 260 y 280 nm, para obtener las lecturas del - DNA.

### 3.33.11.- PROTEINAS:

#### a) Determinación de Proteínas por Lowry (7.05):

- 1.- Tomar una alícuota del problema y llevarla a 1 ml con agua (no olvidar el estándar y el blanco).
- 2.- Adicionar 5 ml de la solución de proteínas, agitar y dejar reposar 10 minutos, La solución de proteínas está formada por  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0.1 N; tartrato de sodio y potasio al 1% y sulfato de cobre pentahidratado al 0.5 %.
- 3.- Una vez transcurridos los 10 minutos - se adicionan 0.5 ml del reactivo de Folin-Cicalteau (1:3), se agita inmediatamente y se deja reposar por 30 minutos.



4.- Por último leer a 625 ó 600 nm, en fotocolorímetro (3.1.13).

b) Determinación de Proteínas por Kjeldhal:

Se utilizó el método de Kjeldahl (7.01); las determinaciones se hicieron por duplicado, utilizando 0.5 g de muestra.

3.3.12.- Método de Nessler para la Determinación de Amonio (7.14):

Con el objeto de determinar la cantidad de amonio presente en las levaduras lavadas, ~~utilizadas~~ para las determinaciones de proteínas, se realizó el método siguiente:

Se hizo primero una extracción de 2.0 g de levadura, a los cuáles se les añadió 20 ml de solución de NaCl al 10% acidificada con HCl, hasta un pH de 2.5; se agitó durante 30 minutos, se filtró y se lavó-

el matraz que se usó para la extracción de la levadura con 25 ml de NaCl, los cuáles se agregaron en pequeños volúmenes.

La determinación del amonio, se hizo aforando el extracto anterior a 50 ml con el mismo reactivo, de esta solución se tomó una alícuota de 5 ml y se le agregaron 2 ml de tartrato de sodio al 10%, 80 ml de agua destilada y 5 ml del reactivo de Nessler, el cuál se mezcló rápidamente y se aforó a 100 ml; se leyó después de 25 minutos en el colorímetro (3.1.12).

Curva Patrón: Para la elaboración de ésta, se tomaron alícuotas entre 3 y 30 ml de solución patrón de 0.001 meq por ml. Se procesaron como se indicó antes; agregando la misma cantidad de NaCl usada en las extracciones.

Los cálculos se hicieron mediante la siguiente fórmula:

$$\text{NH}_4^+(\text{meq}/100 \text{ g de levadura}) = \frac{\text{Dilución} \times \text{meq de la curva} \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

## IV.- R E S U L T A D O S

4.1.- Resultados de la determinación de la concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo (Método de Underkoffler).

La curva estándar para la determinación de los azúcares reductores se muestra en la gráfica I.

El volúmen de tiosulfato de sodio que se gastó al titular la muestra problema (medio de fermentación), fué de 6.6 ml, los cuáles al interpolarse en la curva-estándar dan como resultado una concentración de 8.7 mg de sacarosa por ml, dato que debe ser corregido multiplicando po 2, considerando la dilución que se realizó durante el proceso de inversión de la sacarosa. El valor corregido 8.7 mg/ml se multiplicó por 2, obte - niéndose un valor de 17.4 mg/ml. Fue necesario efec - tuar una dilución más con el objeto de que el volúmen- gastado en la titulación del problema ya hidrolizado - se pudiera interpolar en la Curva Estándar; por lo tanta

to es necesario multiplicar el valor obtenido por la última dilución realizada. Con lo que obtuvimos finalmente una concentración de 87 mg/ml o sea 8700 mg/100 ml. Que finalmente una concentración de 87 mg/ml o sea 8700 mg/100 ml. Que finalmente equivale a una concentración de 8.7 % de azúcares reductores totales en le medio de cultivo.

Esto se realizó con el objeto de conocer la concentración de melazas presentes en la producción de la levadura de cada una de las cepas en estudio (I, II, III), lográndose además estandarizar el contenido de azúcar en los medios de fermentación.

Las levaduras aisladas Saccharomyces carbajali, Pichia barragani y Torulopsis aquamellis fueron denominadas con los números I, II y III respectivamente, con el objeto de facilitar el manejo de sus datos.

4.2.- Descripción de las características macroscópicas de los cultivos:

GRAFICA # I  
CURVA ESTANDAR DE SACAROSA.

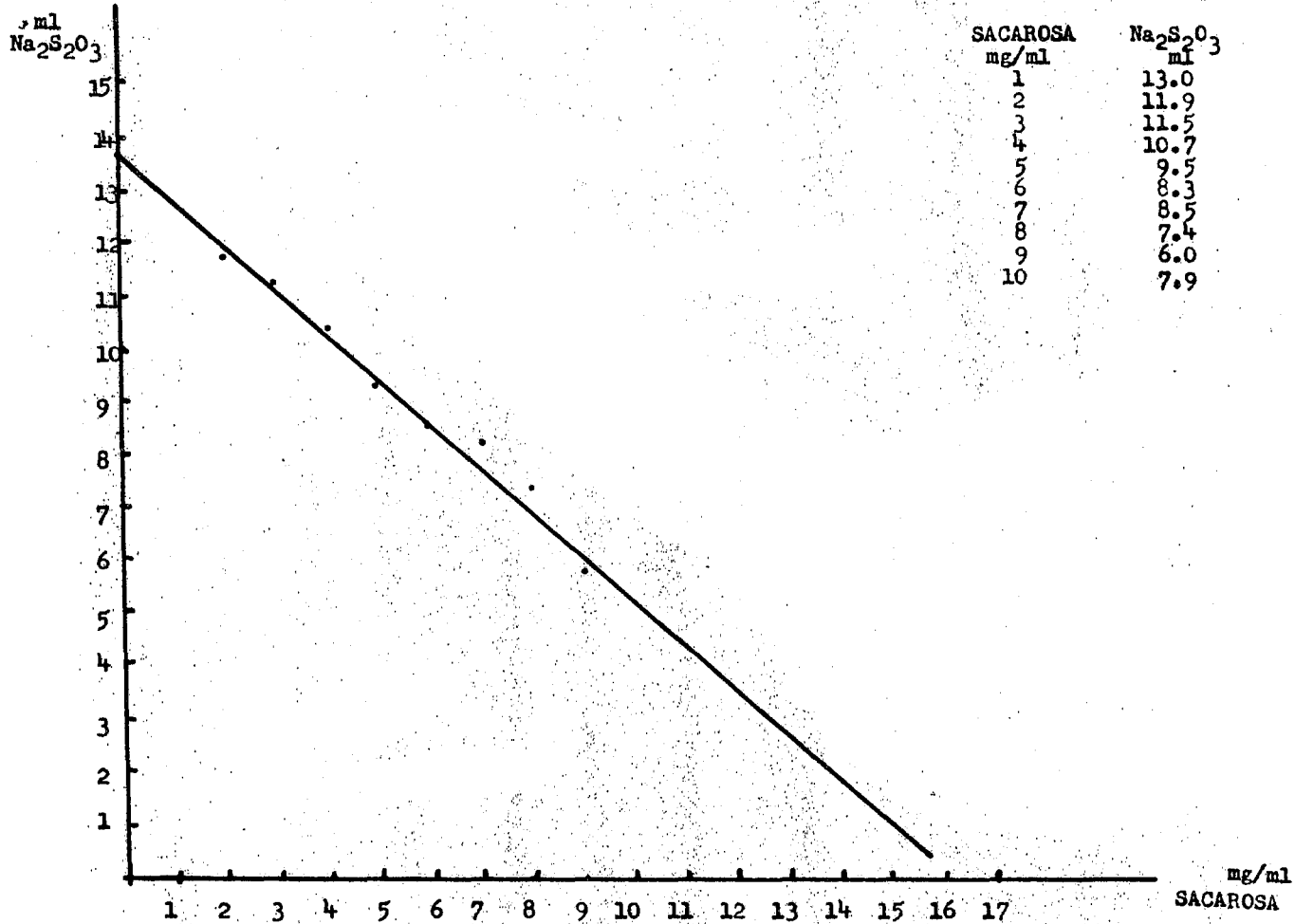


TABLA # 1: CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE  
CULTIVO DE LAS LEVADURAS AISLADAS

M E D I O      S O L I D O

CEPA	TIEMPO DE DESARROLLO	FORMA DE LA COLONIA	SUPERFICIE	COLOR	BORDE
S. Carbajali	48 horas	Circular	Rugosa Pulve- rulenta.	Blanco Grisáceo.	Ondulado
P. barragani.	48 horas	Circular	Rugosa con - estrias en - la periferia.	Blanco grisáceo	Ondulado
T. aquamellis	48 horas	Circular	Lisa con al- gunas estrias muy finas.	Moreno- oscuro	Entero

M E D I O      L I Q U I D O

CEPAS	TIEMPO DE DESARROLLO	COLOR Y CANTIDAD SEDIMENTO	FORMACION DE VELOS	FORMACION DE ANILLOS	TURBIDEZ
S. carbajali.	24 horas	Blanco y Abundante	---	---	---
P. barragani.	24 horas	Blanco y Abundante	Seco y Opaco de color blan- co-grisáceo	Seco sin bri- llo de color- blanco-grisáceo	---
T. aquamellis.	48 horas	Blanco y escaso	Completo de co- lor blanco gri- sáceo.	Muy fino de co- lor blanco-gri- sáceo.	---

TABLA # 2: CARACTERÍSTICAS MICROBIOLOGICAS DE  
LAS LEVADURAS.

CEPAS	TIEMPO DE DESARROLLO	CELULAS	AGRUPACION	BROTOS
S. carbajali.	48 horas	Esféricas, ovals y Elipticas; algunas alargadas en forma de pera.	en forma aislada	Unipolares.
P. barragani.	48 horas	Elipticas y ovals algunas alargadas.	en forma de cadenas	Unipolares y Bipolares.
T. aquamellis.	48 horas	Circulares, Ovals y algunas de tipo eliptico.	en forma aislada.	Unipolares.



TABLA # 3: CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS LEVADURAS.

a) Pruebas de Fermentación (Método de Henrici).

AZUCAR	CEPA I	CEPA II	CEPA III
Arabinosa	-	-	-
Fructuosa	+	-	-
Glucosa	+	-	-
Lactosa	-	-	-
Manosa	+	-	-
Rafinosa	+	-	-
Sacarosa	+	-	-
Xilosa		-	-

b) Pruebas de Asimilación de Azúcares (Método Auxonográfico).

AZUCAR	CEPA I	CEPA II	CEPA III
Arabinosa	+	-	+
Fructuosa	+	+	+
Glucosa	+	+	+
Lactosa	+	-	-
Manosa	+	+	+
Rafinosa	+	-	-
Sacarosa	+	-	+
Xilosa	+	-	-

c) pruebas de Asimilación de Nitrógeno. (Método Auxonográfico).

Fuente de Nitrógeno	CEPA I	CEPA II	CEPA III
Asparagina	+	-	+
Nitrato de Potasio	-	-	+
Peptona	+	+	+
Sulfato de Amonio	+	+	+
Urea	-	-	+

De acuerdo a los resultados anteriormente mencionados, se deduce que las cepas I, II y III son respectivamente: Saccharomyces caribajali, Pichia barragani y Torulopsis aquamellis.

TABLA # 4: Resultados de la obtención de proteína por el Método de Lowry

a) Cepa I

Determinación I (Rompimiento de células por perlas Styroport)

Alicuotas	D. O.	Valor obtenido en mg/ml
0.01 ml	0.1308	32.7
0.05 ml	0.588	29.4
0.1 ml	1.2	30.0

Determinación II (Rompimiento de células por Sonicador y perlas Styroport).

Alicuotas	D.O.	Valor obtenido en mg/ml
0.01 ml	0.112	28.0
0.05 ml	0.63	31.5
0.1 ml	1.188	29.7

Tomando en cuenta los valores obtenidos, se sacó un promedio, el cuál corresponde a: 30.216 mg de proteína por mililitro.

b) Cepa II

Determinación I (Rompimiento de células por perlas Styroport).

Alicuotas	D.O.	Valor Obtenido en mg/ml
0.01 ml	0.06	15.0
0.05 ml	0.225	11.25
0.1 ml	0.79	19.75

Determinación II (Rompimiento de células por Sonicator y perlas Styroport).

Alícuotas	D. O.	Valor Obtenido en mg/ml
0.01 ml	0.067	16.72
0.05 ml	0.695	13.90
0.1 ml	0.1551	15.51

El valor promedio sacado de las determinaciones es de 15.4 mg de proteína por mililitro.

c) Cepa III

Determinación I (Rompimiento de células por perlas Styroport).

Alícuotas	D. O.	Valor Obtenido en mg/ml
0.01 ml	0.073	18.25
0.05 ml	0.325	16.25
0.1 ml	0.636	15.9

Determinación II (Rompimiento de células por Sonicator y perlas Styroport).

Alícuotas	D. O.	Valor Obtenido en mg/ml
0.01 ml	0.068	17.0
0.05 ml	0.324	16.2
0.1 ml	0.7	17.5

El promedio de los valores obtenidos en las dos determinaciones es de 16.85 mg de proteína por mililitro.

TABLA # 5: Resultados obtenidos del peso seco de las levaduras.

TABLA DE PESO DE LEVADURA

CEPA	DETERMINACION			PROMEDIO
	1	2	3	
S. carbajali.	161.4 mg/ml	156.9 mg/ml	162.8 mg/ml	160.37 mg/ml
P. barraganii.	138.05 "	140.3 mg/ml	139.0 mg/ml	139.12 mg/ml
T. aquamellis	113.05 "	119.5 mg/ml	109.0 mg/ml	113.85 mg/ml

TABLA # 6: Resultados de la determinación de Acidos Nucléicos:

Cepa I (Ruptura de células por perlas Styroport y por  
Sonicador con perlas Styroport).

DETERMINACION	D.O.	NUCLEICOS TOTALES	DNA %	RNA %
1	0.43	7.66 %	0.12042	7.53
2	0.383	7.463 %	0.1309	7.317
3	0.458	7.53 %	0.146	7.396
Promedio		7.5 %	0.13244	7.414

Cepa II (Ruptura de células por perlas Styroport y por  
Sonicador con perlas Styroport).

DETERMINACION	D. O.	NUCLEICOS TOTALES	DNA %	RNA %
1	0.362	8.6738 %	0.1725	8.5
2	0.774	8.35 %	0.1833	8.1667
3	0.715	8.0306 %	0.2022	7.885
Promedio		8.35146%	0.1859	8.1889

Cepa III (Ruptura de células por perlas Styroport y por  
Sonicador con perlas Styroport).

DETERMINACION	D.O.	NUCLEICOS TOTALES	DNA %	RNA %
1	0.456	9%	0.170242	8.83
2	0.372	8.64 %	0.1497	8.49
3	0.57	8.9 %	0.2028	8.6972
Promedio		8.846 %	0.174247	8.6724

TABLA # 7: Resultados de la determinación de proteínas por el método de Kjeldahl:

Cepa	ml de HCl 0.094 N	Nitrógeno Total %	Proteína %
I	1) 30.0	7.896	49.35
	2) 30.6	8.05	50.3125
		Promedio:	49.8
II	1) 34.3	9.28	56.425
	2) 35.4	9.32	58.25
		Promedio:	57.33
III	1) 29.1	7.66	47.875
	2) 29.0	7.6328	47.705
		Promedio:	47.8

TABLA # 8: Resultados de la determinación de  $\text{NH}_4^+$  de la levadura seca por el método de Nessler:

Fórmula empleada

$$\text{NH}_4^+ \text{ (meq/100 g de levadura)} = \frac{\text{Dilución} \times \text{meq de la Curva} \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

Datos de la Curva Estándar de Amonio (Método de Nessler).

Tubo	ml del Estándar	Concentración en meq %	Abs.
1	3	0.003	0.132
2	6	0.006	0.2291
3	9	0.009	0.3010
4	12	0.012	0.4310
5	15	0.015	0.6021
6	18	0.018	0.7696
7	21	0.021	0.9825

8	24	0.024	1.1249
9	27	0.027	1.1427
10	30	0.030	1.5229
Cepa I	...	...	1.6198
Cepa II	...	...	1.862
Cepa III	...	...	0.4260

Los valores interpolados en la curva son los siguientes:

CEPA	Meq de la curva
I	0.039
II	0.026
III	0.105

Cantidad de amonio encontrado en las levaduras:

CEPA	Cantidad del ión amonio
I	0.0017 g
II	0.0011375 g
III	0.000459 g

CEPA	% de Nitrógeno Protéico	Menos el Valor encontrado del ión amonio	Se obtiene el valor real de proteína.
I	49.8 g	0.0017 g	49.7982 g
II	57.33 g	0.0011375 g	57.32 g
III	47.8 g	0.000459 g	47.799 g

GRAFICA # II  
CURVA ESTANDAR DE AMONIO.

ABSORBANCIA

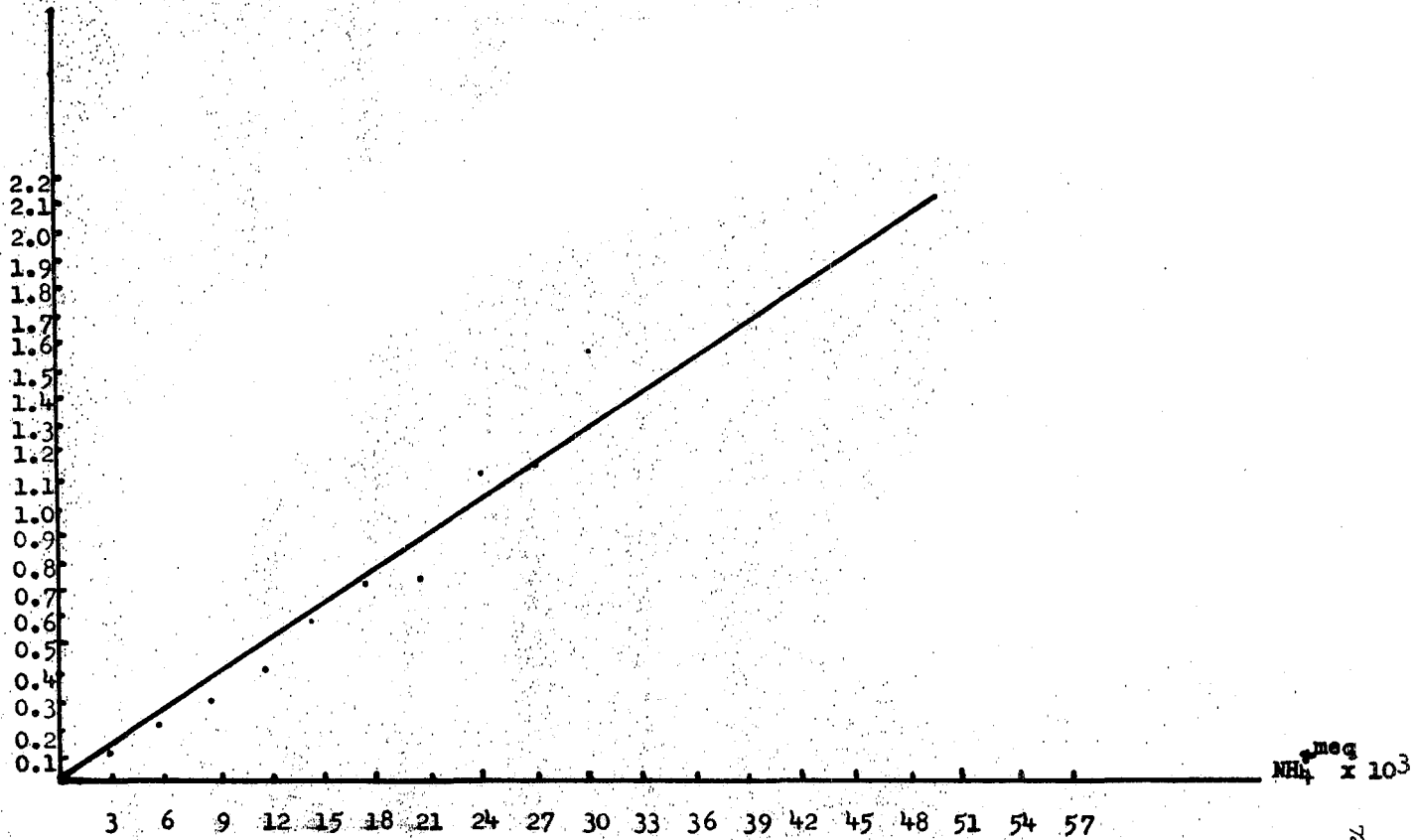


TABLA # 9: RESUMEN DE RESULTADOS

CEPAS	% de Proteínas (LOWRY)	% de Proteínas Totales (KJELDAHL)	% de Nucléicos Totales	% DNA	%RNA
<i>Saccharomyces carbagali.</i>	18.84	49.8	7.5	0.13244	7.414
<i>Pichia barragani.</i>	23.0	57.33	8.35	0.1859	8.1889
<i>Turolopsis aquamellis.</i>	20.65	47.8	8.846	0.1742	8.6724
<i>Candida utilis*</i>	...	50.0	≈ 8.0	...	...

\* NOTA: Los valores indicados para *Candida utilis* están reportados en la literatura (7.9 y 7.7)



## V.- D I S C U S I O N

El objetivo de este trabajo como ya explicamos antes, fue el de estimar el contenido de los ácidos nucleicos en las levaduras del pulque: Saccharomyces carbagali, Pichia barragani y Torulopsis aquamellis.

Existe una gran variedad de métodos para la cuantificación de los ácidos nucleicos, desde luego aquellos que involucran condiciones extremas de pH (sobre todo alcalinos) y temperatura, no son muy aconsejables; ya que se ha comprobado que el RNA es inestable bajo estas condiciones, aunque si bien tienen la ventaja de que nulifican la acción enzimática totalmente.

Kay y Dounce con el empleo de Dodecil Sulfato de Sodio obtienen un producto de elevado peso molecular y casi libre de proteínas, pero el rendimiento que obtienen es alrededor del 50 % del total del RNA. Esto se debe probablemente a que este detergente no logra la completa inhibición enzimática de la ribonucleasa; lo mismo

ocurre cuando se emplea hidrocioruro de Guanidina.

También puede deberse al gran número de manipu-  
laciones requeridas en el proceso y a la mayor dificul-  
tad para separar el reactivo de los ácidos nucleicos li-  
bres de proteínas.

Otros métodos tienen la ventaja de no requerir  
la separación del DNA del RNA; puesto que ambos ácidos -  
tienen preferencial solubilidad en ácido tricloroacético  
caliente, lo cuál los aísla de los demás componentes ti-  
sulares, cuantificandose entonces sus azúcares por reac-  
ciones colorimétricas.

Este método tiene la desventaja de no poderse-  
determinar por absorción ultravioleta, debido a la in-  
terferencia del TCA y a la incompleta precipitación de -  
las proteínas.

Schmidt-Thannhauser proponen un método que de-  
pende de la conversión selectiva del fósforo del RNA a -  
fósforo orgánico ácido soluble (mononucleótidos) por -

álcali, después de la remoción del fosfato ácido soluble y fósforo fosfolipídico. La combinación de este método con el anterior, nos permite el uso ya sea del fósforo o azúcares para la medición de los ácidos nucleicos. Scheneider sugirió la adición de una extracción con TCA caliente a la fracción ácido soluble remanente al final del procedimiento Schmidt-Thannhauser, permitiendo además el aislamiento directo de la fracción del DNA. Sin embargo la separación del RNA con TCA caliente se ha encontrado inadecuada para liberar todo el ácido presente en las levaduras del pan.

Otro método de separación basado en diferentes solubilidades en ácido perclórico es el de Ogur-Rosen. La estimación se hace por reacciones de las pentosas o por cuantificación de fósforo. Sin embargo los valores de fósforo no concuerdan con los obtenidos por mediciones en ultravioleta. Parece ser que parte de las purinas del DNA se solubilizan con el ácido perclórico frío con el RNA.

Los métodos colorimétricos para la determina -

ción del DNA, que están basados en el azúcar componente, no son específicos para la 2-Deoxirribosa, pero lo son - en mayor o menor grado para los 2-Deoxiazúcares, cuya - ocurrencia en la naturaleza en compuestos que no sean - DNA es relativamente rara, sin embargo se han encontrado diferentes sustancias que pueden interferir en éstas - reacciones. Por ejemplo en la prueba de la Difenilami - na, interfieren el ácido galacturónico y que la presen - cia de proteínas también interfiere. Dische recomendó - por esta razón hacer la lectura a dos diferentes longi - tudes de onda considerando únicamente la diferencia en - tre ambas.

Se ha encontrado también que la densidad del color se incrementa a menor temperatura y durante un lar go período de tiempo.

La prueba de la p-nitrofenilhidrazina presenta mayor sensibilidad que la de Dische, al parecer es muy - específica para los 2-Deoxiazúcares. Pero sólo los azú - cares capaces de formar furano o derivados de furano dan positiva la reacción.

La prueba del Indol es aproximadamente 10 veces más sensible que la prueba de Dische, pero el ácido-galacturónico y la arabinosa, interfieren seriamente, como el propio Ceriotti ha comprobado.

La prueba de la Cisteína es mucho menos sensible que la de la Difenilamina, en parte por la dificultad que existe en hacer una corrección adecuada del color no específico, resultante del ácido sulfúrico al 75% sobre el tejido extractado, por lo que este método da valores erróneos.

El método de la Cisteína no es considerado específico, porque el reactivo reacciona con otros compuestos como son: ácido fosfoglicérico, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato, etc., lo cuál sólo se evita cuando se utiliza el método de Schneider.

Los métodos colorimétricos para el RNA no son tan específicos como los del DNA; debido a que se requieren condiciones óptimas, puesto que se utilizan reacciones generales para las pentosas. El furfural o deriva -

dos del furfural formado es el que reacciona con varias-substancias cromogénicas.

Las reacciones más empleadas para determinar - el RNA son: la del Floroglucinol, la del Orcinol y la - Prueba de la p-Bromofenilhidrazina. La primera reacción no da color con el DNA, pero es menos sensible que la - reacción del Orcinol, lo cuál se debe probablemente al - prolongado calentamiento que destruye las 2-Deoxirribo - sas y algunas otras substancias que puedan interferir.

Los métodos basados en la determinación de - bases púricas y pirimídicas en la región ultravioleta, - tienen la desventaja de que pueden interferir los amino-ácidos aromáticos. Pero éstas se pueden determinar tam- bién por reacciones colorimétricas específicas.



Otro hecho importante que es necesario consi- derar, sobre todo en este tipo de métodos es la relación que existe entre bases púricas y pirimídicas. Por ejem- plo en las levaduras del pan, la relación purina/pirimí- dina es de 1.17 - 1.32; mientras que en las levaduras - del vino es de 1.08.

Esto es importante porque en las reacciones colorimétricas del RNA, basadas en el componente carbohidrato, solo el nucleótido de purina se hidroliza para dar pentosa; solo el enlace purina-ribosa es medido; por lo que el estandar que se emplee debe contener la misma relación purina/pirimidina.

En el caso del DNA esto no ocurre porque se ha encontrado que la relación purina/pirimidina casi siempre es de 1.

Los métodos de absorción ultravioleta permiten una rápida estimación. La hidrólisis de los ácidos nucleicos con TCA ó ácido perclórico, proporcionan un extracto donde los ácidos nucleicos pueden medirse directamente por sus componentes purina/pirimidina. El valor de estas determinaciones es muy reproducible para el mismo material. La principal limitación de los métodos ultravioleta para la estimación de ácidos nucleicos es la presencia de aminoácidos aromáticos en los materiales utilizados. La interferencia del TCA, puede corregirse introduciendo en el blanco y en el estándar ácido tricloro

roacético. (Sustancias que interfieren en la espectrofotometría son coenzimas y flavinas).

En los métodos que utilizan el análisis del fósforo es de particular importancia la eliminación de compuestos de fósforo contaminantes, de lo contrario el error es considerable. En general los métodos son complejos, por ejemplo el método de Beremblum, Chain y Heatley, constan de varios pasos, para la eliminación del fósforo orgánico así como del fósforo protéico. Por lo tanto una de las desventajas de estos métodos es que existen compuestos nucleotídicos que contienen fósforo que no son completamente removidos por la extracción de compuestos ácidos solubles y fósforo-lípidicos; lo cual da valores altos.

En los métodos de rompimiento de las células se llevó a cabo tanto por medios físicos como por medios químicos. En los primeros se emplearon perlas Styroport con agitación en el Vortex. También se logró la ruptura sonicando las células, completando la lisis con perlas Styroport. El extracto obtenido se trató con fenol para-



eliminar las proteínas y en la fase acuosa se realizó -  
la determinación espectrofotométrica de los ácidos nu -  
cléicos totales.

La ruptura química se efectuó únicamente em -  
pleando fenol; haciéndose la determinación de los ácidos  
nucleicos, por espectrofotometria.

En ambos casos se hidrolizó el RNA con hidró -  
xido de sodio, determinándose el DNA. El valor del RNA -  
se obtuvo por diferencia.

Los resultados obtenidos fueron mayores cuando  
se emplearon métodos físicos y menores cuando se empleó -  
únicamente fenol, lo que se debió a una ruptura incomple -  
ta de las células, esto fue comprobado al microscopio.

La cuantificación de proteínas se llevó a -  
cabo tanto por el método de Lowry como por el Kjeldahl, -  
obteniéndose mayores resultados con el método de Kjeldahl  
debido a que por el método de Lowry únicamente se de -

términan proteínas solubles, mientras que en el Kjeldahl se determina todo el nitrógeno protéico total presente.

Con el objeto de comprobar si la determinación de proteínas correspondía efectivamente a la cantidad de proteínas presentes en las levaduras y con el propósito de eliminar la posible interferencia del ión amonio del medio de cultivo, que pudiera haber estado contaminando la suspensión de levaduras; no obstante que se llevó a cabo un lavado exhaustivo, se hizo una determinación de amonio por el método de Nessler, en un extracto de levadura como se describe en el método 3.3.12. Los resultados obtenidos fueron tan bajos que pueden despreciarse.

## VI.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se desprenden como consecuencia las siguientes conclusiones:

Primero, que el desarrollo de las levaduras: Saccharomyces carbajali, Pichia barragani y Torulopsis aquamellis, es efectivamente muy rápido, lo cuál representa una ventaja para la obtención de proteína microbiana a gran velocidad. Puesto que en otros organismos el desarrollo es más lento y por lo tanto la producción de proteína también. (Ver TABLA # 11).

Se observó que la levadura que se multiplicó más rápidamente fue Saccharomyces carbajali, la que al parecer contribuye en mayor proporción al característico olor y sabor del pulque. Su desarrollo se obtiene a partir de sustratos muy baratos, lo que representa una ventaja más a favor del empleo de estos microorganismos.

En segundo lugar encontramos que el contenido-protéico de estos microorganismos es muy elevado sobre todo en Pichia barragani, por lo que este microorganismo es el más recomendable de los tres estudiados para emplearse como fuente alimenticia.

En cuanto al contenido de ácidos nucleicos se refiere, se encontró que es semejante al de las levaduras que más frecuentemente se emplean en la industria alimenticia, a saber, Saccharomyces cereviseae y Candida utilis; por lo que no parece existir una ventaja real en relación a este aspecto, para que estas levaduras se empleen como fuente de alimento, ya que sigue existiendo el inconveniente del alto contenido de ácidos nucleicos y la consecuente toxicidad de éstos.

Queda como objeto de estudio para trabajos posteriores, investigar algún tipo de procedimiento que haga disminuir la concentración de ácidos nucleicos sin afectar el contenido de proteínas; por ejemplo, la apli-

TABLA # 10 CONTENIDO DE PROTEINA EN ALGUNOS ORGANISMOS  
CULTIVADOS EN DIFERENTES SUSTRATOS. (7:24).

Microorganismo	Sustrato	Proteína Cruda %	Lípidos %	Carbohidratos	%
Alga	CO <sub>2</sub>	45-50	5	10-18	
Bacteria	Celulosa	58	2,5	-	
Bacteria	Metano	60	10	25-30	
Bacteria	Metanol	80	8	10	
Levadura	n-parafinas	60	9	20-23	
Levadura	Gasóleo	69	2	10-20	
Levadura	Carbohidratos	55	2	10-20	
Hongo	Licor de Sul- fito	55-60	1	-	
Hongo	Carbohidrato	35-50	5	10-20	

cación de choques térmicos, o sea cambios repentinos — de temperatura, etc.

También es conveniente hacer pruebas de niveles de toxicidad; ésto es necesario para aclarar, porque el consumo de pulqué, el cuál contiene estas levaduras — no parece afectar al menos notoriamente a las personas — que lo ingieren diariamente.

Una posible solución al problema de la toxicidad de estas levaduras, es la de separar las proteínas — de los ácidos nucleicos, para lo cuál se puede utilizar un método físico para la ruptura de las células y posterior precipitación de las proteínas, empleando algún reactivo barato como el sulfato de amonio y que además pueda ser recuperable.

Actualmente en México vivimos una etapa en la que escasean los granos destinados a la alimentación animal, hecho que ha motivado a las industrias productoras de alimentos de consumo animal, a echar mano de materias

primas, tales como el maíz y el frijol, provocando una marcada escasez de estos granos y su consecuente encarecimiento, cosa que repercute en la economía de nuestras clases más humildes cuya alimentación se basa principalmente en estos granos.

Una forma de combatir este problema tan importante, sería el aprovechamiento para alimentación animal de la proteína unicelular obtenida a partir de las levaduras del pulque, debido a que su costo de producción sería más bajo que el costo de producción del sorgo, del frijol y del maíz. Además esto provocaría la disminución del precio de los productos alimenticios de origen animal (leche, carne, huevo), y evitaría que granos que tradicionalmente han estado destinados al consumo humano se emplearían para alimentar al ganado.

TABLA # 11: Tiempo de Duplicación de Masa de -  
Diferentes Organismos. (7.24).

ORGANISMO	TIEMPO PARA 1 DUPLICACION DE BIOMASA
Bacteria y Levadura	10 - 120 minutos
Hongo y alga	2 - 6 horas
Pasto y algunas plantas	1 - 2 semanas
Pollos	2 - 4 semanas
Ganado Porcino	4 - 6 semanas
Ganado Vacuno	1 - 2 meses
Humanos	0.2 - 0.5 años.



## VII.- B I B L I O G R A F I A

- 1.- Black C. A. (1965). "Méthods of Soil Analysis". - Part 2, Agronomy No. 9 Ed. American Society of Agronomy, Inc. Publisher (E.U.A.)
- 2.- Browne, A.C. and Zerban, W.F. (1955). "Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis". Third Edition, John Wiley and Sons, Inc, New York (E.U.A.).
- 3.- Burdon L. Kenneth and Williams Robert P. (1976). - "Microbiología". Segunda Reimpresión, Publicaciones Cultural, S. A. Pág: 255-264. (México).
- 4.- Castro C. A. (1971). "Appl. Microbiology" Vol. 22:- 422-427.
- 5.- Colowiek P. Didney and Kaplan Nathan O. (1957). - "Méthods in Enzymology". Academic Press Inc; Publishers, New York, (E.U.A)..
- 6.- Colin Balde Ernesto. (1951). "Condiciones Optimas para el Desarrollo de las Levaduras que se encuentran

- en el Pulque". TESIS: Facultad de Química, U.N.A.M. (México).
- 7.- Cook H. A. (1958). "The Chemistry and Biology of Yeast". Academic Press Inc, Publishers, New York, (E.U.A.).
- 8.- Cresfield M. Arthur, Smith C. Kandric and Allen Worthington Frank. (1955). "The Journal of Biological Chemistry". Vol. 216: 185-193.
- 9.- Cruz Parra Javier. (1977). "Estudio Comparativo de Saccharomyces carbajali con Candida utilis para la Obtención de Biomasa". TESIS: Facultad de Química, U.N.A.M. (México).
- 10.- De la Cruz Herrera Noemí y Ochoa Lozano Alma Angélica. (1978). "Obtención de Cultivos Concentrados de las Levaduras (*Pichia barragani* y *Torulopsis hydrophilis*), Aisladas del Aguamiel, por Agitación y Aireación". TESIS: Facultad de Química; U.N.A.M. (México).
- 11.- Dische Z. (1956) "Methods of Biochemical Analysis", Vol. 6; p. 1.

- 12.- Glick David. (1956). "Methods of Biochemical Analysis". Interscience Publishers, Inc; New York, L.T.D LONDON.
- 13.- Gómez Hernández Gregorio Jorge. (1976). "Extracción de Acidos Nucléicos de Levadura por Calentamiento - en Medio Alcalino". TESIS ; Facultad de Química; - U.N.A.M. (México).
- 14.- Jackson, M.L. (1970). "Análisis Químico de Suelos". Segunda Edición, Ediciones Omega, S. A. (España).
- 15.- Jorgensen (1959). "Microbiología de las Fermentaciones Industriales". Editorial Acribia, Zaragoza, - (España).
- 16.- Kalb E. Vernon Jr; and Bernlohr W.Robert. (1977). - "Analytical Biochemistry". Vol. 82; 362-371.
- 17.- Kay M.R. Ernest and Dounce L. Alexander. (1953). - "Journal of the American Chemical Society". Vol. 75 4041-4044.
- 18.- Lehninger L. Albert. (1972). "BIOQUIMICA". "Las bases Moleculares de la Estructura y Función Celular". Quinta reedición. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. (España).

- 19.- Lemoine Mendoza Bertha. (1976). "Evaluación Quími -  
ca y Biológica de las levaduras Aisladas del Pul -  
que". TESIS: Facultad de Química, U.N.A.M. (México)
- 20.- Ogur M. and Rosen G. Arch. (1950). "Biochemistry".-  
Vol. 25; 262.
- 21.- Ortega Silva José Marín. (1947). "Balance de Nitró  
geno en la Elaboración del Pulque". TESIS: Facultad  
de Química: U.N.A.M. (México).
- 22.- Pelczar J. Michael Jr. and Reid D. Roger. (1977). -  
"Microbiología". Libros Mc. Graw-Hill de México, S.  
A. de C. V. (México).
- 23.- Prescott C. S. and Dunn G. C. (1959). "Industrial-  
Microbiology". Third Edition, Mc Graw-Hill Book Com  
pany, Inc, New York. (E.U.A).
- 24.- Quintero Ramírez Rodolfo. (1978). "Ingeniería Bio -  
química; Teoría y Aplicaciones".
- 25.- Rose H. Anthony (1961). "Industrial Microbiology" -  
London (Butterworths).
- 26.- Ruiz Oronoz Manuel. (1942). "Métodos de Estudios y-

Clasificación de las Levaduras, Principales Levaduras del Aguamiel y del Pulque". TESIS: Facultad de Ciencias, U.N.A.M. (México).

- 27.- Schneider. W.C. (1945). "Journal of Biological Chemistry". Vol. 161; 293.
- 28.- Schmidt G. (1957). "Methods in Enzymology". Vol. III 671-679; 687-715; 775-776.
- 29.- Sola I. (1971). "Analytical Biochemistry". Vol. 43; 217-226.
- 30.- Soto Soria Jorge (1952). "Cultivo Intensivo de Levaduras del Pulque". TESIS: Ciencias Biológicas, I.P. N. (México).
- 31.- Stumpf K. P. (1947). "The Journal of Biological Chemistry". Vol. 169; 367-371.
- 32.- Underkoffler L. A. and Guymon J.P. (1943). "Semimicromethod for the Determination of Reducing Sugar - in Fermentation Média".. J. Sci. Vol. 17; 251-256,- IOWA State Coll, (E.U.A.).