

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

100

EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS DE
LEVADURA POR CALENTAMIENTO
EN MEDIO ALCALINO

196

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

GREGORIO JORGE GOMEZ HERNANDEZ

México, D. F.

1976



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.

CLAS. Yelil
ADQ. 1976
FECHA 11-1-
PROC. 199

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

Presidente: Prof. Carlos del Río Estrada
Vocal: Prof. Alfredo Echegaray Alemán
Secretario: Prof. Gustavo Viniegra González
1er. Suplente: Prof. Jorge Soto Soria
2o. Suplente: Profa. Dolores Lastra Azpilicueta

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

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

SUSTENTANTE

Gregorio Jorge Gómez Hernández

ASESOR DEL TEMA

Dr. Gustavo Viniegra González

A MI MADRE

A MIS QUERIDOS HERMANOS

A MIS AMIGOS

Y

A TI

AGRADECIMIENTOS

Quedo profundamente agradecido al Dr. Gustavo Viniegra por la ayuda y estímulo que me brindó durante en el transcurso de este trabajo, al Dr. Rafael Palacios, al Dr. Horacio Merchant y a su colaborador Julián Coello, por la valiosa ayuda que me brindaron para el desarrollo de este trabajo. Finalmente, agradezco a todos aquellos que de un modo u otro, mediante su crítica constructiva, sugerencias y observaciones hicieron factible realizar este trabajo.

Este trabajo fue financiado por la O.E.A. y durante su desarrollo estuve becado por el CONACYT.

INDICE

	Págs.
OBJETIVO	1 - 2
ANTECEDENTES	3 - 6
GENERALIDADES	7 - 18
MATERIAL Y METODOS	19 - 24
RESULTADOS	25 - 40
DISCUSION	41 - 45
RESUMEN	46 - 47
BIBLIOGRAFIA	48 - 50

OBJETIVO

Con el presente trabajo, se pretende contribuir a la búsqueda de métodos prácticos para poder aprovechar de manera integral, a las levaduras de mayor interés industrial en México, a saber: Saccharomyces cerevisiae y Candida utilis, que son ricas fuentes de proteínas y actualmente no son aprovechadas para consumo humano, por su elevado contenido de ARN.

Por otra parte, S. cerevisiae es un subproducto de las destilerías del alcohol, que es desechado por las cañerías y que posteriormente podría actuar como un contaminante ambiental. De esta forma, se generan dos problemas: a) desperdicio de proteínas y otros subproductos de interés comercial y b) costos en el tratamiento de aguas para su descontaminación.

Con este estudio se trata de establecer que ambos problemas pueden ser solucionados si se crea una metodología atractiva en términos económicos, para: la recuperación, producción e industrialización de los productos derivados de las levaduras existentes en México, contribuyéndose también, aunque en forma parcial, al problema nutricional existente en el país por medio de: a) creación de nuevas fuentes de trabajo en la industria cañera, b) utilización de tecnología propia para la producción de alimentos y aditivos saborizantes obtenibles de los ácidos

nucleicos de las levaduras, y de los que se hablará más adelante.

ANTECEDENTES

Desde hace tiempo ha existido interés por poder extraer el ácido ribonucleico (ARN) en forma altamente polimerizada de la célula pero, como señalaron tiempo atrás diversos autores como Crestfield et al (1955), Loring, et al (1952), etc., la extracción del ARN era posible solo mediante condiciones extremas de pH y temperatura y durante tiempos prolongados, obteniéndose como resultado un ARN degradado. Esta degradación no sólo se debía a factores físicos y químicos sino también a factores biológicos; representados por las ribonucleasas, enzimas que hidrolizan el ARN y que son excretadas durante el proceso de extracción de los ácidos nucleicos, como lo señalaron Bucher y Allen (1950), aún en la presencia de inhibidores como los empleados por -- Volkin y Carter (1951) que usaron el clorhidrato de guanidina ó el agente tensioactivo, duodecilsulfato de sodio, que utilizaron Kay y Dounce (1953). Aunque el interés de los autores citados fue de tipo académico, establecieron, sin embargo, un precedente para subsecuentes trabajos ya con un enfoque más práctico. Así surgieron los trabajos de -- Nakao et al (1964), quien intentó disminuir el contenido de ARN con valores de pH ácido y alcalino y con tiempos prolongados de incubación, utilizando para ello diversos géneros de levaduras con el propósito de obtener, en forma directa, monocleótidos excretados con el grupo fosfato en la posición 5' del azúcar ribosa, que pueden ser utilizados en la industria alimenticia como mejoradores del sabor.

Recientemente, los estudios de Viniegra y Peschard (1975), establecieron que el proceso de industrialización de levaduras a pequeña o mediana escala, no es costeable para México si solo se produce o utiliza al microorganismo como fuente proteínica, por lo tanto, se propuso que la producción limitada de proteína, es atractiva si se recupera el ARN de la levadura, además de otros productos.

Cabe aclarar que la producción de las levaduras a gran escala por los métodos presentes en Europa, Japón y E.U.A. tampoco es atractiva para México pues supone inversiones masivas en equipo y tecnología extranjera y según lo han mostrado Peschard y Viniegra (1975), tampoco ofrece una fuente barata y abundante de proteínas que compitan con la soya u otras proteínas vegetales.

Sin embargo, existe aún la posibilidad de simplificar dramáticamente el proceso de tecnología eliminando la necesidad de compra de equipo costoso por lo que cabe mencionar que aún se puede pensar en la disponibilidad de proteína microbiana como fuente barata de proteínas para animales monogástricos (en donde se incluye al hombre). A pesar de estas perspectivas, no se ha podido emplear la levadura como fuente de proteína debido al alto contenido de ARN en estos microorganismos -- pues, como lo señala Edozién, et al (1970), se pueden presentar trastornos en las articulaciones debido a la hiperuricemia o elevación del ácido úrico en el torrente sanguíneo, por la carencia de una uricasa que --

degrade el ácido úrico, proveniente del catabolismo de los ácidos nucleicos. En relación a este problema, diferentes autores se han dedicado a disminuir el contenido de ácidos nucleicos en varios géneros de levaduras sin dañar en forma notoria las proteínas, pero sin prestar atención a la calidad del ARN polimerizado.

De los diversos autores que han atacado el problema, sobresalen los trabajos de: Maul, et al (1970), que estableció un proceso que consiste en un tratamiento de incubaciones secuenciales a diferentes temperaturas, dando previamente un choque térmico en condiciones ácidas; el de Ganepa, et al (1972), que sigue un proceso parecido al del autor anterior pero, antes de dar el choque térmico, las levaduras son dializadas por un tiempo prolongado de varias horas y luego tratadas termicamente a pH 12; finalmente el trabajo de Zee y Simard (1975), en el que, sin choques térmicos pero en condiciones extremas de acidez y alcalinidad se logró disminuir el contenido de ácidos nucleicos de las levaduras.

Nakao, et al (1964), consideraron que para cada género diferente de levadura debería establecerse un pH característico para ésta y así poder extraer el ARN, además del establecimiento de otras condiciones experimentales como las que anteriormente se señalaron, a saber: tiempo y temperatura, principalmente.

En este trabajo se tratará de mostrar que no es necesario - el proceso de choque térmico, y también se tratará de encontrar las condiciones óptimas para la recuperación del ARN para después poder hacer comestible la proteína microbiana obtenida durante el proceso. De esta forma no sólo se orientará este estudio, como lo hicieron los autores - arriba citados, a la recuperación de la proteína pues, comercialmente - es poco lucrativa (aunque nutricionalmente es más valiosa) sino también a la obtención del ARN mediante el proceso que posteriormente se describirá.

Por lo tanto, se pretende contribuir a un mejor conocimiento fundamental para la industrialización integral de las levaduras como son: S. cerevisiae y C. utilis, de gran importancia industrial en México para que se puedan producir a pequeña o mediana escala (menos de --- 2000 toneladas al año) y vender a precios competitivos como fuentes de saborizantes y de proteínas alimenticias.

GENERALIDADES

Las levaduras S. cerevisiae y C. utilis pertenecen a las -- clases de los Ascomycetes y Fungi imperfecti, ambas clasificadas dentro de los Eumycetes. El género Saccharomyces se puede reproducir ocasio-- nalmente en forma sexual por medio de ascosporas y asexualmente por ge-- mación (Blastosporas). C. utilis no se reproduce en forma sexual hacien-- dolo, de forma exclusiva, a través de blastosporas, es decir, asexual-- mente. Ambos géneros son organismos unicelulares (nunca forman mice--- lio). La forma de la levadura, en los dos casos, es alargada y ovalada donde Saccharomyces es una levadura más grande que Candida.

La pared celular de las dos levaduras, químicamente muy si-- milares se constituyen principalmente de glucanas y mananas embebidas - en una matriz compuesta de lípidos y proteínas. Esta pared es muy grue-- sa y extremadamente resistente a los métodos físicos usuales para rom-- per células como son: sonicación, choque osmótico y calentamiento. En-- tre los tratamientos químicos, se sabe que resisten el tratamiento alca-- lino y ácido. Los polisacáridos que componen el 90 % de la pared celu-- lar forman un retículo organizado en forma de microfibrillas que le con-- fieren rigidez a la pared celular. La glucana de la pared celular de - la levadura es un polisacárido muy ramificado con enlaces 1 - 6 y 1 - 3. Cuando se trata S. cerevisiae con hidróxido de sodio y calor se disuel-- ven las mananas de la pared, dejando un esqueleto de glucanas, por con--

siguiente, se puede pensar que las glucanas constituyen el componente estructural de la pared de esta levadura -Rose (1968- ya que las glucanas ramificadas son más resistentes al tratamiento mencionado -Rakoff y Rose (1971).

Las levaduras tienen componentes de interés nutricional como las vitaminas del grupo B y que son: tiamina, riboflavina, piridoxina (esta última no se encuentra en Saccharomyces pero si en Candida). Ambas levaduras contienen ácido fólico, ácido pantoténico, niacina, biotina, ácido p-amino benzóico e inositol solo en Saccharomyces -Cook, - (1958)- lo que las hace ser una fuente de estos compuestos de mucho interés nutricional.

Del análisis integral de las levaduras se encontró que del 40 % al 50 % su peso seco, lo constituyen las proteínas que, por otra parte, contienen cantidades importantes de amino ácidos esenciales en la alimentación de mamíferos, a saber: isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina -Stokes y Guinness (1946)- que son fundamentales para la dieta alimenticia y el balance nitrogenado.

Así mismo, se encontró también un alto contenido de ácido ribonucleico (el contenido de ácido desoxiribonucleico es relativamente pequeño en relación al ARN) siendo el 8 % en Candida y el 16 % en Saccharomyces, aproximadamente.

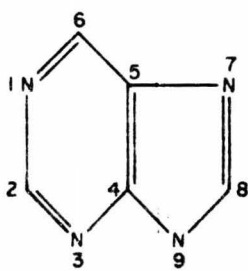
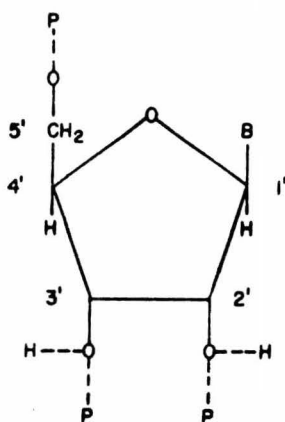
Acidos Nucleicos

Cabe ahora mencionar algunas de las características químicas y estructurales de los ácidos nucleicos.

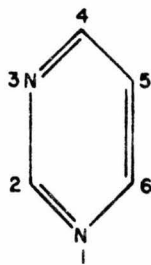
El ARN es un polímero que se constituye de monómeros, compuestos de: un grupo fosfato, azúcar ribosa y una base nitrogenada, purica o pirimídica (a estos monómeros se les conoce como nucleótidos). Las bases pueden ser adenina, guanina, citosina y uracilo (a las primeras dos se les conoce como bases puricas y las segundas como bases pirimídicas). Tanto la base como el grupo fosfato se encuentran unidas al azúcar ribosa como lo muestra la figura 1.

El grupo fosfato puede estar colocado en las posiciones 2', 3', ó 5' por esto la unión probable del ester fosfato se muestra con líneas a trazos en la figura 1. La razón de este hecho se discutirá párrafos adelante. Los nucleótidos se enlazan unos a otros mediante enlaces fosfodiester formándose polímeros de cadena larga ó ARN. Si la cadena no es tan larga, no más de 10, se les conoce como oligómeros.

La estructura y composición química del ácido desoxirribonucleico no varía mucho con respecto a la del ARN, salvo que en lugar de uracilo, una de las bases pirimídicas del ARN, no se encuentra en el ADN y en su lugar esta la timina. El azúcar, la desoxirribosa, no cuenta con el grupo hidróxilo en la posición 2" de la ribosa.



I
BASE PURICA



II
BASE PIRIMIDICA

Fig. 1. Representación gráfica de un nucleótido y una base. En la figura (a) las líneas punteadas representan los posibles sitios en donde se puede formar un enlace con un grupo fosfato o un hidrógeno, en las posiciones 2', 3' y 5'. En (b) se representan las bases nitrogenadas, que se unen al azúcar ribosa por las posiciones 9 ó 1, respectivamente.

Cuando el ARN se pone en presencia de un álcali y a temperatura ambiente se produce una mezcla de isómeros 3' y 2'. Los mecanismos de la reacción, propuestos para la formación de los isómeros, se ha visto que siguen la secuencia de pasos que a continuación se describirán y se esquematizan en la figura 2:

Si el ARN se encuentra en una solución 0.10 N de hidróxido de sodio y a temperatura ambiente, el enlace fosfodiéster se rompe en cualquier lado del interior de la cadena del ARN, y como lo señala la letra (b) y las rayas punteadas, de la figura 2, se forman, como se dijo antes, nucleósidos 3' y 2' de monofosfato. Este tipo de hidrólisis no sucede en la serie desoxi, por la ausencia del grupo cis-OH en la posición 2', del azúcar desoxirribosa. De estos eventos puede deducirse que los polidesoxirribonucleótidos son más estables al tratamiento alcalino que los polirribonucleótidos -Mahler (1966).

Las cadenas de los ácidos nucleicos pueden sufrir también hidrólisis por la acción enzimática de algunas ribonucleasas, como las del páncreas de bovino, que hidroliza las cadenas de polirribonucleótidos originándose los mismos productos que por hidrólisis química. A este tipo de enzimas se les conoce como endonucleasas, ya que ataca los enlaces intranucleótidos, siempre que el grupo P-O este enlazado a un nucleótido con una base pirimidica sin importar que este libre el grupo hidroxilo 3' ó 5' al final de la cadena. Se ha visto que el mecanismo de reacción enzimática se inicia, primeramente, con la formación de un

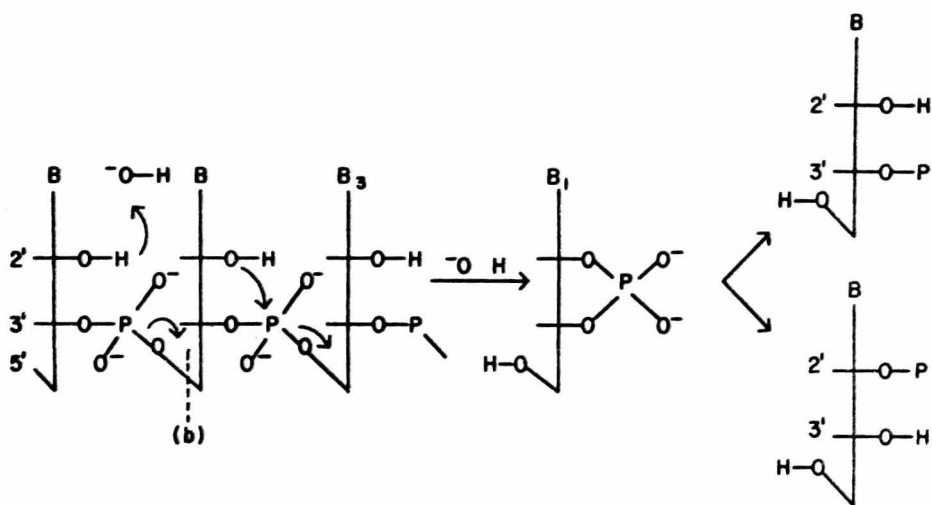


Fig. 2. Representación gráfica del mecanismo de hidrólisis del ARN, en condiciones alcalinas, por sustitución nucleofílica.

fosfato cíclico reversible. El proceso de ruptura es parecido al descrito por la figura 2 en la hidrólisis química, por esta fosfodiesterasa.

Existen otras fosfodiesterasas más inespecíficas, con respecto a la base, para hidrolizar el ARN. Por otra parte existen fosfodiesterasas que son complementarias a las ribonucleasas de páncreas de bovinos, pues inician la ruptura por las bases púricas. Sin embargo -- existen algunas enzimas con mayor especificidad ya que catalizan la hidrólisis del fosfodiéster donde se encuentra la guanina, como lo hace la T 1 (que se encuentra en el complejo enzimático takadiastasa), o la T 2 que rompe los enlaces internucleótidos donde se encuentra la adenina.

Existen otros tipos de enzimas que pueden romper enlaces no solamente del grupo con el OH en la posición 2', sino que rompe tanto polirribonucleótidos como desoxirribonucleótidos como lo hace una enzima aislada del bazo de bovino, a la que se le considera un exonucleasa, que libera isómeros 3' iniciándose la hidrólisis por la cabeza en la -- que esta el grupo OH 5' libre, como se ilustra en la figura 3 (a).

Una enzima útil en el análisis de ácidos nucleicos, pero de especificidad opuesta, es una fosfodiesterasa de veneno de serpiente. -- Se le considera una exonucleasa relativamente inespecífica, con respecto a las bases del nucleótido, que cataliza la hidrólisis del ARN y ADN.

La reacción se inicia por la cola liberando isómeros 5' como lo señalan Cohn y Volkin (1953). Para que esto suceda se requiere de un grupo final 3' -OH, libre como se ilustra en la figura 3 (b).

De acuerdo con Baddiley y Todd (1947) esta enzima sólo hidroliza adenosina -5' - benzil-fosfato pero no el ester 3'. Esta enzima puede hidrolizar oligonucleótidos de ADN. Los oligonucleótidos que no tienen el fosfato 5' terminal son hidrolizados también, aunque a una velocidad menor, como lo demostraron los trabajos de Heppel (1958) y Razzel y Khorana (1959).

Los polidesoxirribonucleótidos, aunque estables al alcali, son degradados por enzimas como la ADNasa I, aislada de páncreas de bovino. Los productos de la hidrólisis de esta enzima son oligonucleótidos con una estructura como se ilustra en la figura 3 (c). Otra enzima, nucleasa, es la DNasa II, aislada de bacterias y órganos de mamíferos -- como son: S. aureus y bazo y timo, respectivamente. Estas enzimas pueden atacar los sitios I ó II (Fig. 3 a y b) y no requieren que el grupo OH, en las posiciones 3' y 5' esten libres.

Las diferencias de la DNasa I de la DNasa II estriban en que la primera tiene un pH óptimo neutro y requiere de iones magnesio y la segunda tiene un pH óptimo ácida y no necesita de iones bivalentes.

Se diferencian de las demás fosfodiesterasas (RN asas), en -

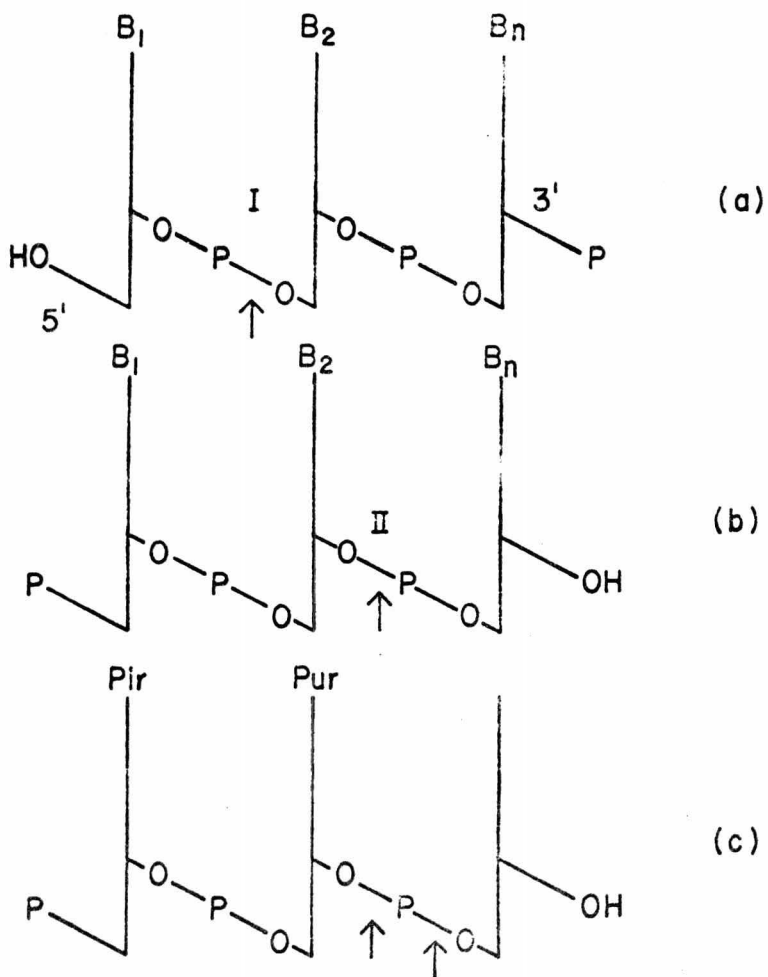


Fig. 3. Representación gráfica del sitio de ataque por diferentes ribonucleasas. La figura (a) representa, mediante la flecha, el sitio de ataque de una endonucleasa. La figura (b), con la flecha representa el sitio de hidrólisis de una exonucleasa. Finalmente la figura (c), - representa los sitios de ataque de una desoxirribonucleasa donde los productos de la hidrólisis enzimática son señalados en el texto.

que pueden distinguir a una hélice simple de una hélice doble. Una característica sobresaliente, que señaló Greer (1962), de los polidesoxirribonucléotidos, reside en el hecho de que si son puestas en medio ácido y a 60° C se producen ácidos apúricos ó, como lo señala Habermann -- (1962), ácidos apirimídicos en presencia de hidrazina.

Es importante también considerar algunas propiedades ópticas de los ácidos nucleicos y en especial de la hipocromicidad y la hipercromicidad, de los ácidos nucleicos.

Las propiedades absorbentes de la luz de los ácidos nucleicos se expresan en términos del espectro de absorción de las bases de los nucleótidos que componen dichos ácidos. Esta absorción se va a encontrar afectada por el arreglo o la estructura de las cadenas del ácido y principalmente se refleja en el ADN, ya que cuando ésta tiene una estructura ordenada, de doble hélice, se presenta el fenómeno de hipocromismo, es decir, la disminución cuantitativa de la absorción de la luz ultravioleta a una longitud de onda dada de la que cabría esperarse, ya que la suma de los grupos cromóforos, que se encuentran en el nucleótido, es menor a la esperada.

Así pues, la hipercromicidad significa un aumento en la absorción de luz ultravioleta a una longitud de onda establecida, por los grupos cromóforos de las bases de los nucleótidos y queda expresada en la siguiente ecuación:

$$h = \text{hipercromaticidad} = \frac{A_o \text{ (forma desordenada)}}{A_o' \text{ (forma ordenada)}} - 1$$

donde A_o y A_o' son la absorbancia a longitud de onda dada. La ecuación anterior expresa que el aumento va de un sistema ordenado a uno desordenado (o mezcla de nucleótidos). Por otra parte, se sabe que cuando la doble hélice se desnaturaliza totalmente por calor, la absorbancia de luz es equivalente al número de nucleótidos correspondiente. Así mismo, cuando el ADN se desnaturaliza por completo con calor, se presenta un aumento en la absorción que va desde un 20 % a un 60 %. Así, el porcentaje aumentado en la absorción de luz a 260 nm, producido por calentar una muestra de ADN, está directamente relacionado a su contenido de pares de bases de A-T, esto es, a mayor contenido de pares A-T, es mayor el aumento de absorción en el ADN desnaturalizado por calor. Esto se explica, ya que en el hipocromismo se presenta, en la doble hélice una interacción electrónica que se refleja en la disminución de absorbancia. Estas interacciones ya no se presentan en el ADN desnaturalizado por calor.

Los coeficientes de extinción molar (CEM) son:

Base	CEM a 260 nm. $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Adenina	13.4×10^3
Guanina	7.2×10^3
Citosina	5.55×10^3
Timina	7.4×10^3

De los valores CEM podemos observar que estos son mayores - en A y T, que en G y T. Esto explica más claramente porque la doble -- hélice absorbe menor luz que la desnaturalizada por calor, y libre ya - de las interacciones electrónicas que producen disminución de absorban- cia -Mahler (1966) y Lehninger (1970)- el ADN exhibirá un aumento en - la absorción de luz.

De entre las diferentes especies de ARN, el ARN ribosomal - se encuentra asociado a una gran cantidad de proteínas, que varía según la clase de la célula, a saber: células procariotes o células eucario- tes. En las primeras, del peso total del ribosoma, el 65 % es de ARN - y el 35 % es de proteína; en las segundas el 50 % es ARN y el 50 % res- tante es proteína. Por otra parte, en el análisis del ARN de las leva- duras (eucariotes) se encontró en promedio, que las bases púricas y pi- rímidicas tenían las relaciones siguientes: de adenina 28 %, de guani- na 31 %, de citosina 20 % y de uracilo 21 %. Este análisis fue hecho del ARN total en diferentes grupos de levaduras por Marshak y Vogel -- (1950), Smith y Markham (1950), y otros autores que han efectuado el -- análisis cualitativo de las bases nitrogenadas que constituyen el ARN, que por diversos métodos coinciden con los resultados mencionados líneas arriba. No obstante que las relaciones porcentuales de las bases son - parecidas en las levaduras, el contenido de ácidos nucleicos es diferen- te, tal como se señaló en párrafos anteriores.

MATERIALES Y METODOS

Para la medición del ARN extraído se siguieron dos procedimientos distintos: a) por conteo de la radiactividad en un contador -- de centelleo líquido (Mark II, NBS) de uridina tritiada, incorporada a S. cerevisiae y b) midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Karl Zeiss PMQ-II), a una longitud de onda de 260 nm.

Incorporación de uridina tritiada en levadura. El crecimiento de las levaduras se hizo en 200 ml. de un medio que contenía extracto de levadura, peptona y dextrosa en una proporción de 10, 20 y -- 20 g. por litro a pH de 5.1; éste es un medio de cultivo parecido al -- descrito por Fast (1973). A las cinco horas se adicionaron 400 micro-- curies de uridina tritiada (New England Nuclear). El crecimiento se -- hizo a 29° C y se llevó a agitación en matraz de 50 ml (agitadora Kinet) a una velocidad de 150 rpm durante 11 horas. La cosecha de células se hizo centrifugando a 2000 rpm en tubos de 50 ml en una centrifuga GL -- mistral. Las células se lavaron repetidas veces, se centrifugó cada vez para su recuperación utilizando medio de cultivo no usado y una solución de uridina no marcada 10 mM para finalizar. Los paquetes obtenidos fueron conservados a 4° C. Para los ensayos de ARN marcado se tomaron aproximadamente 0.13 gr., los que se suspendieron en 25 ml de agua destilada.

Extracción de ARN marcado. Procedimiento (a). Para cada -- uno de los diferentes estudios realizados con el objeto de conocer la --

disminución del ARN en las células se tomaron 2.5 ml de suspensión, -- adicionándose un volumen igual de soluciones con diferentes concentraciones de cloruro de sodio e hidróxido de sodio e incubándose a 37° C. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron alícuotas de 0.5 ml y se centrifugaron a 200 rpm (centrífuga clínica MSE) por cinco minutos, -- conservándose el sobrenadante. El sedimento se trató según Ogur y -- Rosen (1950) y Ohta et al (1971), con ácido perclórico 0.5 M. Al sobrenadante se le llamó fracción 1 y al ARN residual, extraído con ácido perclórico, fracción 2.

Medición del tritio. La mezcla de centelleo se preparó -- con 18.9 g PPO* y 1.13 g de POPOP* (ambos son reactivos de la Packard - Instrument Company, Inc.), y se disolvió en un galón de tolueno (J.T. Baker). En un recipiente de 22 ml se colocaron 25 microlitros de la - muestra (fracción 1 y/o 2) más 0.5 ml de NCS** (Amershan Searle Corporation) se agitó y se adicionaron 10 ml de la mezcla de centelleo arri ba descrita. Se metieron al contador y se dejaron toda la noche a 7°C para efectuar las cuentas de radioactividad al día siguiente.

Procedimiento (b). Para este método se emplearon levadu--

* PPO es el 2.5-Defeniloxazol y el POPOP es el 1.4 bis-(2-5 feniloxozolil-) benceno.

** Solubilizador para centelleo líquido compuesto por una base cuaterna ria de amonio disuelto en tolueno.

ras de pan (S. cerevisiae), ensayándose siempre con 15 g de levadura de panadería (aproximadamente con 75 % de humedad). Para obtener una suspensión homogénea se dispersó la pasta de levadura en 100 ml de la solución alcalina extractora de prueba, como se hizo en el procedimiento -- (a), poniéndose sobre un agitador magnético (Mag-Mix) a temperatura ambiente hasta obtener una suspensión perfectamente homogénea. Se metieron las muestras en un baño de agua probando dos temperaturas diferentes, 60 y 90° C y, a diferentes intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas de 3 ml. Para la determinación del ARN se leyó en el espectrofotómetro a 260 nm. Para poder efectuar las lecturas y leer dentro de la escala de la luz ultravioleta se hicieron diluciones de 1:100 con agua destilada en todos los casos.

Cálculos. Para los cálculos del rendimiento obtenido durante el proceso se hicieron extracciones por partición con fenol (J.T. Baker), previamente destilado. La fase acuosa recuperada fue lavada -- tres veces con una mezcla de alcohol isoamílico y cloroformo (ambos de J.T. Baker), en una relación de 1:25. Para la separación de las fases obtenidas durante la extracción y los lavados, la muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. en una centrífuga Sorval Superspeed, RC2-B refrigerada a 4° C. Para conocer la eficiencia del método se hizo una extracción exhaustiva con ácido perclórico de los ácidos nucleicos contenidos en la levadura y, con respecto a la absorbancia total medida, se extrapoló la absorbancia obtenida mediante el proceso aquí descrito.

Ensayo enzimático. Los ensayos se hicieron con dos controles: ARN y una fosfodiesterasa de veneno de víbora (*Bothrops atrox*) - Tipo V, compradas a Sigma Chemical Co. Las pruebas enzimáticas se hicieron con un método parecido al de Razzel (1961) a pH de 8.6 y a 37°C. Estos ensayos se hicieron también en el medio donde se extrajo el ARN y bajo condiciones iguales de pH y temperatura, pero sin fosfodiesterasa.

Medición de la proteína. La determinación de la proteína se hizo según el método descrito por Lowry (1951).

Cromatografías. Las muestras se corrieron en una columna de 32 x 0.9 cm. empacada con Sephadex G-10 (ambas compradas a Pharmacia Fine Chemical). Para los ensayos, en todos los casos, se inyectaron 0.1 ml de muestra. Como eluyente se empleó cloruro de sodio 1M. La columna estaba conectada a una celda óptica de flujo continuo adaptada a un monitor de absorbancia (ambos ISCO Tipo 5, UA-4), donde se graficaba la absorbancia contra el volumen de elución. Para llevar a cabo los ensayos se calibró la columna con ARN obtenido por el método de Smith (1955).

Micrografías. Para este ensayo se emplearon dos tipos de levaduras: levaduras con tratamiento y levadura sin tratamiento alcalino térmico, para tener el control correspondiente. Las levaduras se suspendieron en suero de rata. La suspensión en un tubo de ensayo, se agi

ta y se centrifuga por 15 min. (centrífuga clínica MSE) a 200 rpm. Se separa el paquete del suero de rata, se elimina el sobrenadante (suero) y se le agrega el fijador sin agitar. Al paquete de levaduras se adiciona una solución de glutaraldehído al 2.5 % y paraformaldehído al 1 % en buffer de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.3. Este actuará como primer fijador. Después de 15 min., sin agitar y sin congelación se procede a cortar en el microtomo (Criostato) adicionándose una gota de fijador nuevo dejándose toda la noche a 4° C. Al día siguiente se pasa a una solución amortiguadora de cacodilato de sodio (Ted Pella) 0.1 M, -- pH 7.4, por dos horas y después se pasa a tetraóxido de osmio (Merck) al 1 %, amortiguada en una solución de Zetterqvist (1956), a una temperatura de 4° C durante 1.5 horas. Se forman dos inclusiones: una se lavó con agua y enseguida se pasó a acetato de uranilo (Merck) por 15 min. La otra inclusión se paso a agua y luego a etanol (J.T. Baker) al 70 %, permaneciendo en éste hasta que la primera inclusión fue sacada de la solución de acetato de uranilo. El siguiente paso es la deshidratación con alcohol etílico a diferentes concentraciones, a saber: alcohol al 70 % (en agua destilada) por 15 min., al 80 % por 15 min., al 90 % por 20 min., al 95 % por 25 min., 100 % por 25 y 30 min. y luego se pasó a óxido de propileno (Merck) por 45 min. Para finalizar se pasó, a una mezcla de óxido de propileno y Epón 812 según Luft (1961) -- (Ted Pella) y se dejó toda la noche.

Al día siguiente se puso en Epon 812, durante 9 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron los cortes en la cápsula de inclusión a 60° C por 20 horas, para efectuarse la polimerización. Se obtuvieron cortes de 800 Angstrom en el ultramicrotomo (LKB III).

Para la observación microscópica (microscopio electrónico - Carl Zeiss EM9) se hizo la impregnación según Venable (1965), para incrementar el contraste con citrato de plomo.

RESULTADOS

Efecto de pH y fuerza iónica. La incubación a 37° C a diferentes valores de pH de las levaduras marcadas, produjo resultados que nos permitieron seleccionar el pH más ventajoso para hacer la extracción de ARN a distintas temperaturas. En la fracción 2, (fig. 4), se puede apreciar que con la temperatura de 37° C y a pH diferentes, a saber: -- 7.2 y 9.9 no fué posible la extracción de ARN y que ésta es más efectiva a pH 12. Cuando las levaduras marcadas se incubaron a 37° C y a pH de 12, pero con concentraciones variables de cloruro de sodio, se pudo apreciar que no existía diferencia en cuanto a la tendencia de la curva y la velocidad de excreción de la uridina tritiada (fig. 5), medida en la fracción 1 a los diferentes intervalos de tiempo.

Efectos de la temperatura. Como se puede apreciar, de las figuras 4 y 5, la liberación de la uridina tritiada a 37° C fué muy lenta ya que se logró, después de dos horas, la extracción total del ARN. Sin embargo, la fig. 6 muestra las fracciones 1 y 2 a 60° C donde la extracción alcalina del ARN es todavía más rápida que a temperaturas inferiores y tiene una constante de primer orden de $K = 0.077/\text{min}$. (Fig. 7). Se encontró que entre los 86 y 80° C la diferencia no es muy grande y que la extracción del ARN se hace en un lapso de tiempo más corto a estas temperaturas.

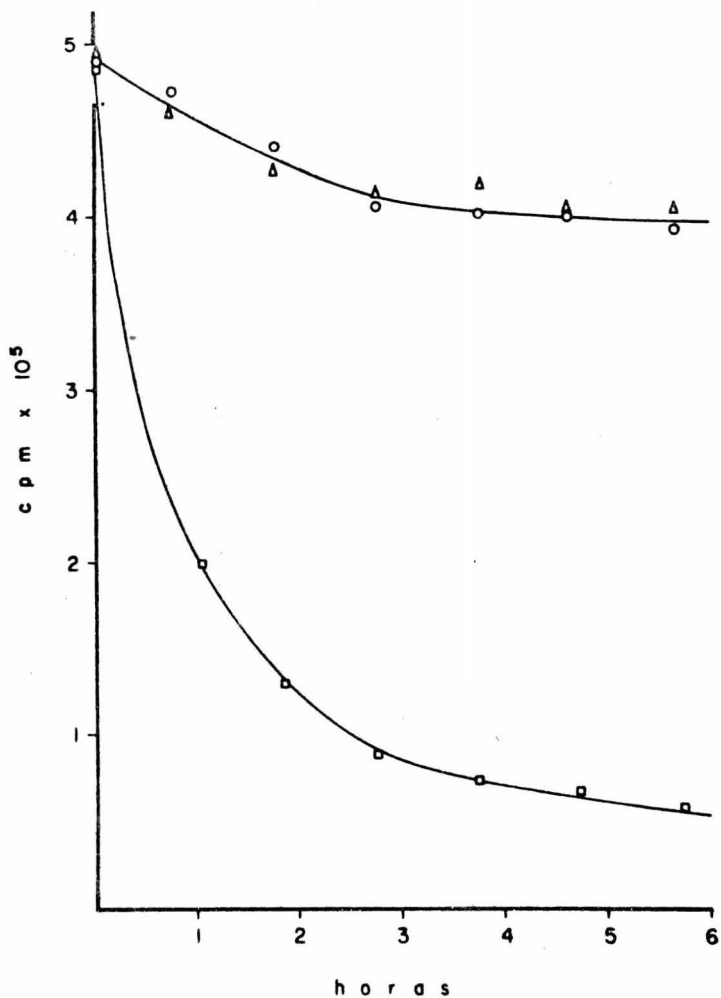


Fig. 4. Fracción 2. Uracilo ³H extraído con ácido perclórico 0.5M de los residuos de levadura, después de que fueron incubados a 37° C y diferentes valores de pH: 7.2 (Δ), 9.9 (○) y 12 (□), por los intervalos de tiempo indicados en las abscisas

EXCRECION DE ARN TRITIADO A TRES DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE NaCl A 37°C Y pH 12.

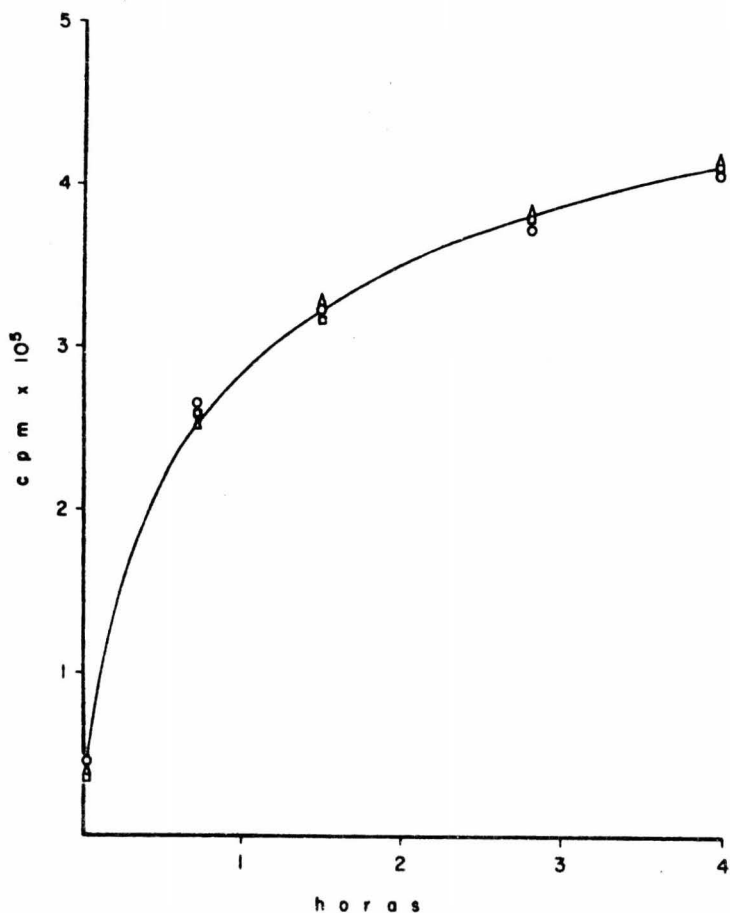


Fig. 5. Extracción de uracilo tritiado a pH de 12 y 37° C en medios con concentraciones diferentes de sales, a saber, -- 0.0M (A) 0.25M (O) y 1.0M (·). Los valores indicados representan las cuentas del tritio, extraídos por el medio alcalino de incubación.

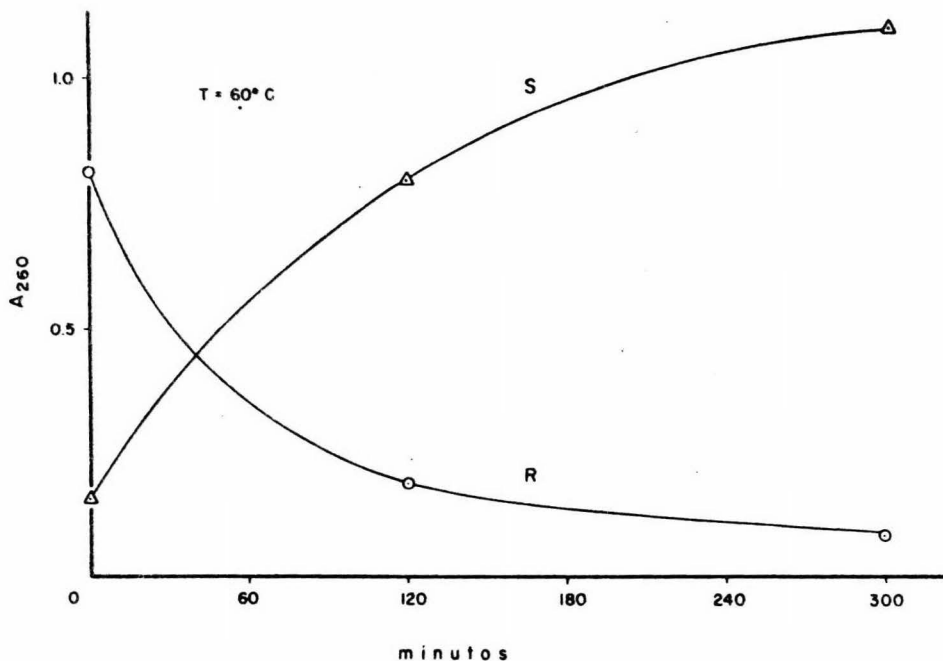


Fig. 6. Extracción de ARN (midiendo absorbancia a 260 nm) a pH de 12 y 60° C, los (Δ), indican la extracción de ARN con el método descrito en el texto. Los (O) indican que el ARN extraído con ácido perclórico 0.5 M. La S corresponde al sobrenadante y R al residuo o fracción I y II como se indica en el texto.

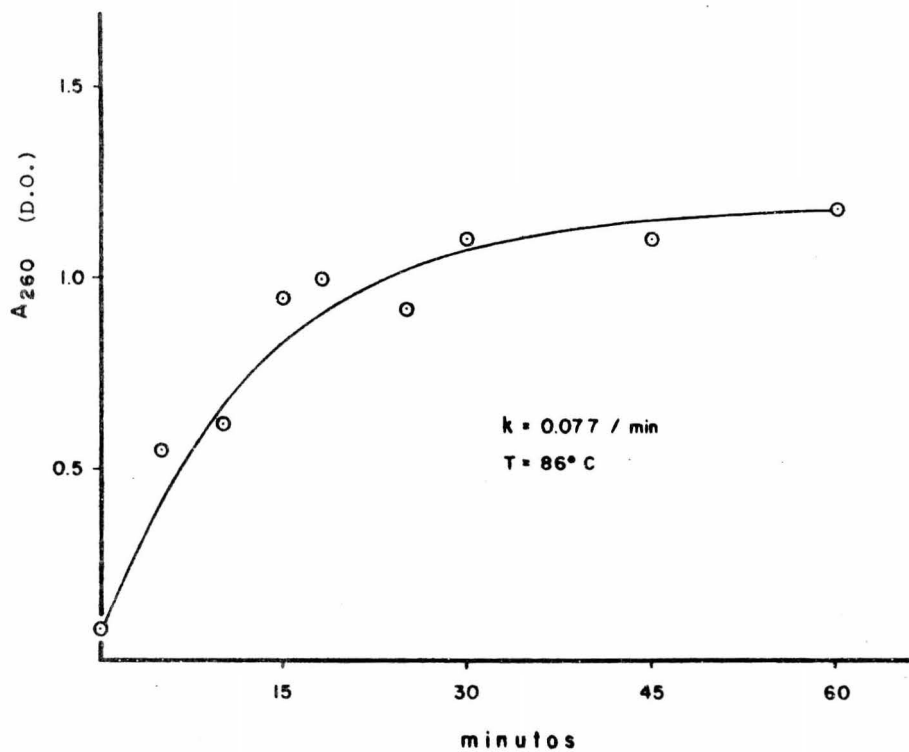


Fig. 7. Extracción de ARN a pH de 12 y 86 C. Se midió la absorbancia y la constante de velocidad de extracción siendo esta de $k = 0.077/\text{min}$.

Calidad del ARN extraído. Por los análisis cromatográficos, se encontró que el ARN tomado como referencia (Fig. 8a y b) como el ARN obtenido a 90° C, aplicando el método mencionado, son eluidos -- del Sephadex G-10 con un volumen de elución parecido. Cuando se hicieron cromatografías por filtración en gel de los productos liberados por las levaduras a distintos tiempos, se encontró que los productos no cambiaron en su patrón cromatográfico. Además se vió que la relación de -- absorbancias entre las longitudes de onda de 260 nm va mejorando durante el tiempo de extracción, ya que las muestras obtenidas a diferentes intervalos de tiempo a 60 y 90° C, tienen una relación a 260:280 nm, que va de 1.9 a 2.1, lo cual es favorable porque indica que el ARN extraído se esta obteniendo sin mucha proteína como contaminante. Es de hacerse notar que en la fracción 1, no se detectó de manera apreciable la liberación de proteínas, medida colqrimétricamente. También se encontró que el ARN extraído de las levaduras es estable durante varias horas si se almacena a temperatura ambiente con el pH alcalino obtenido al final de la extracción (mayor de 9.5). Por otra parte, sólo se obtuvo degradación espontánea del producto obtenido cuando se cambiaron las condiciones de pH y temperatura de la fracción 1 (Fig. 9 y 10). Como prueba estructural adicional se tiene que la fracción 1, al incubarse con una enzima fosfodiesterasa, mostró una despolimerización de los productos obtenidos mediante el proceso de extracción (Fig. 8c).

Micrografías. En las micrografías obtenidas (Figs. 11, 12 y

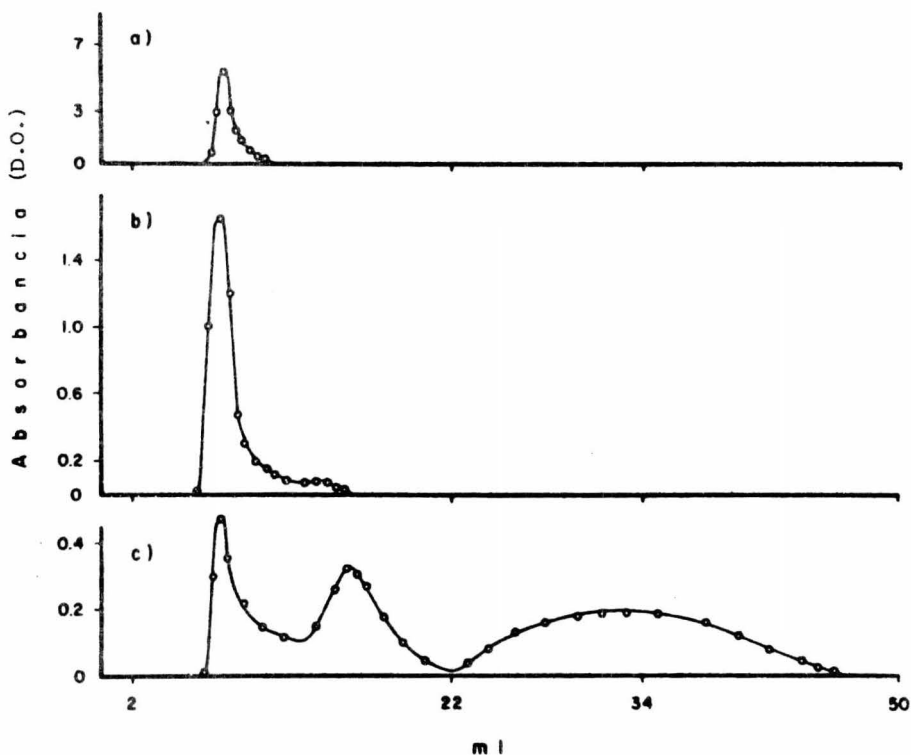


Fig. 8. Las figuras (a), (b) y (c) representan cromatografías en -- Sephadex G-10 y eluidas con NaCl 1M a pH alcalino. La figura (a) el ARN es tomado como referencia obtenido y purificado por el método Smith. La figura (b) representa el pico de ARN obtenido a pH de 12 y 90° C en 35 minutos. (c) representa la hidrólisis enzimática del ARN obtenido como en (b), en presencia de una fosfodiesterasa de veneno de víbora a pH de 8.6 y 37° C. La gráfica en este inciso esta con una escala diferente a las dos primeras.

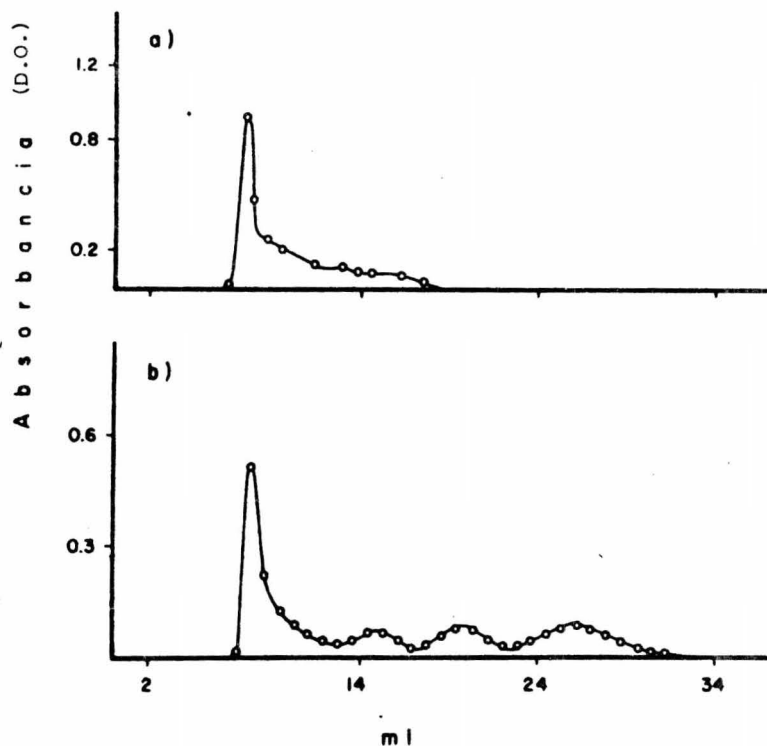


Fig. 9. Las figuras (a) y (b) son cromatografías en Sephadex G-10 donde (a) representa el ARN obtenido a 60° C y pH de 12 y (b) representa a (a) degradado cuando son cambiadas las condiciones finales en las que se obtiene éste de la levadura, a saber: pH de 8.6 y 37° C. Las cromatografías -- son eluidas en condiciones similares a los que se señala en la figura (4). La figura (b) esta en una escala diferente a la figura (a).

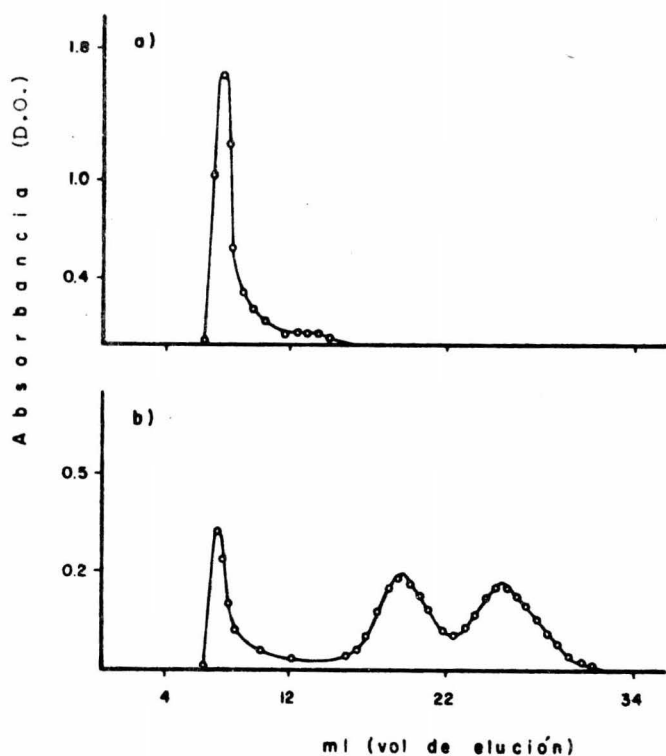
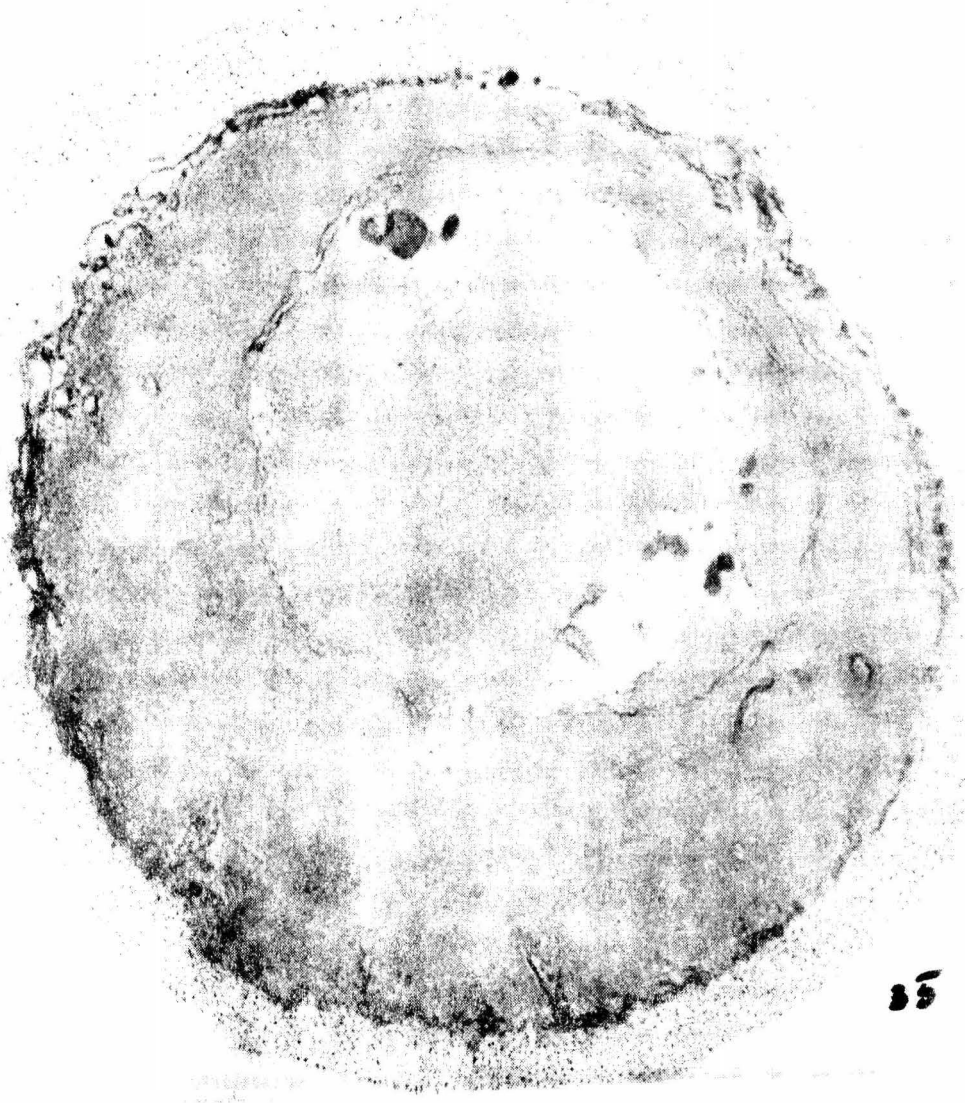


Fig. 10. Las figuras (a) y (b) representan las cromatografías en Sephadex G-10 de ARN obtenido a 90° C y pH de 12 e hidrolizados, luego, en las condiciones de temperatura y pH que señalan en la figura (6). La escala de la figura (b) esta ampliada con respecto a la figura (a).

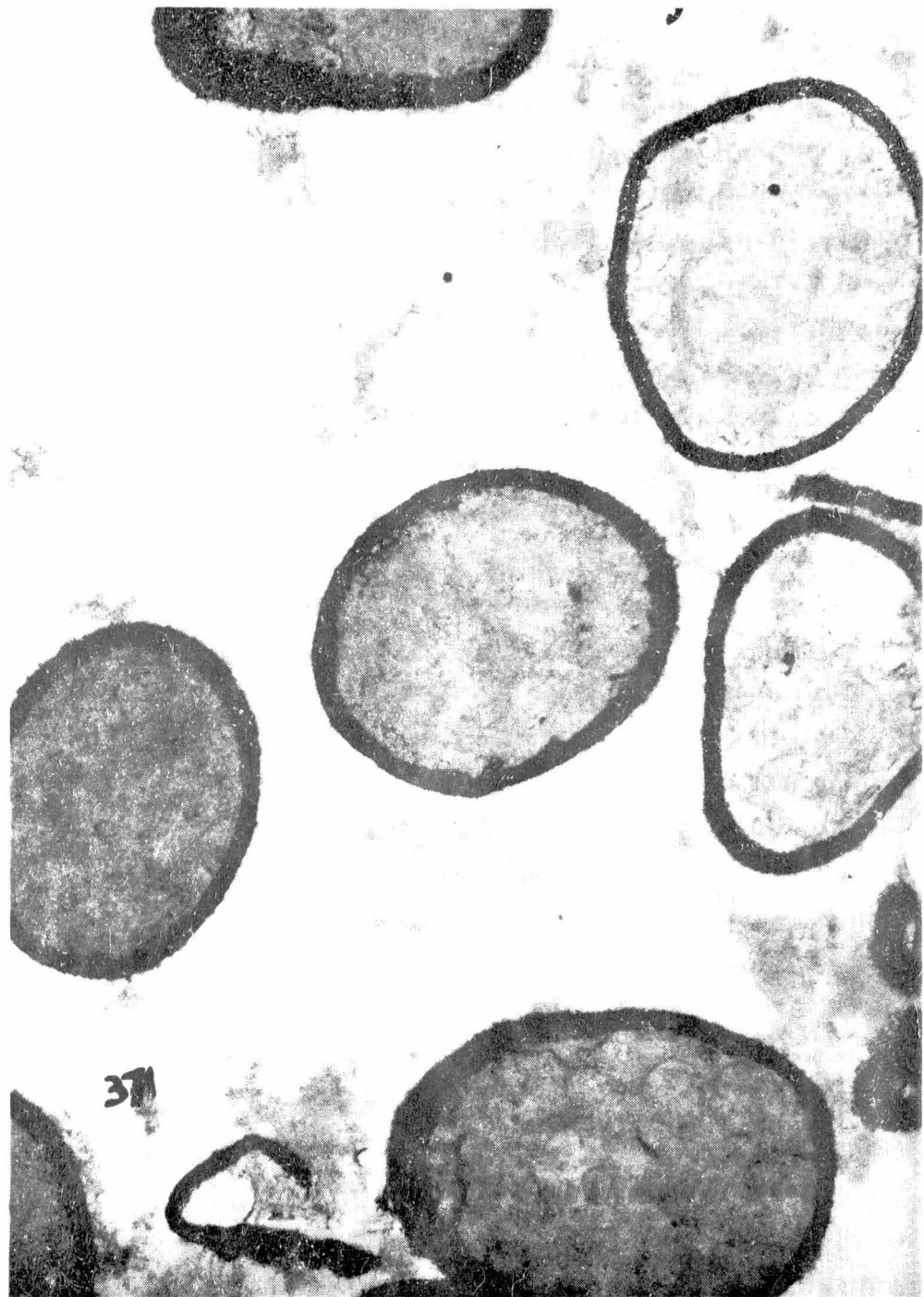




35

se puede apreciar que la levadura no se rompe, sin embargo, los cambios que se producen, respecto a las levaduras sin tratamiento, son claros ya que en las levaduras tratadas se nota un citoplasma amorfo, la membrana nuclear y citoplásmica parcialmente rota; se nota un engrosamiento de la pared celular, los ribosomas están ausentes (en las levaduras sin tratar se aprecia un número elevado de éstos). El núcleo se ve parcialmente vacío. De los organelos, apreciables en la levadura sin tratar, como las mitocondrias, no se observan en las levaduras tratadas ya que probablemente se desintegraron con el tratamiento térmico alcalino. También se pudo apreciar que las levaduras, antes de ser sometidas al tratamiento alcalino térmico, se encuentran separadas unas de otras. Sin embargo, después del tratamiento las levaduras se encuentran aglutinadas debido, posiblemente, a cambios electrostáticos como lo demuestran las micrografías obtenidas a diferentes aumentos (Figs. 13 y 14).

Rendimientos. Las medidas espectrofotométricas y radioactivas permitieron hacer un balance de masas del ARN extraído y del retenido por las levaduras, al final de los períodos de incubación de cada experimento. Los rendimientos se muestran en el cuadro 1, el cual indica la factibilidad de extraer con facilidad cerca del 95 % del ARN de las levaduras usando un pH de 12.



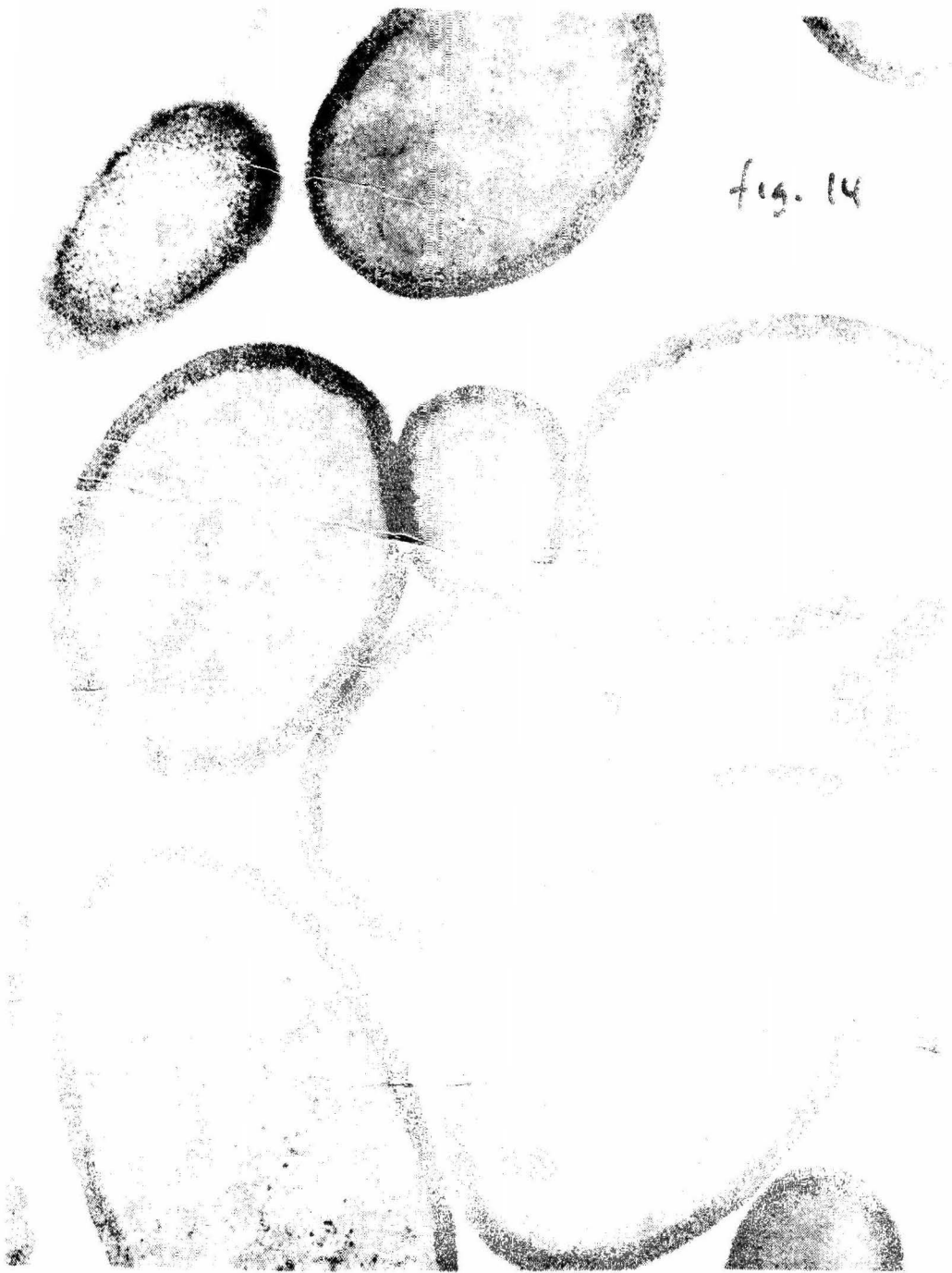


fig. 14

Micrografías de Saccharomyces cerevisiae

- Fig. 11. Micrografía de la levadura sin tratamiento y a una ampli--
cación de 1900 aumentos.
- Fig. 12. Micrografía de la levadura tratada a pH 12 y 90° C por 35 --
minutos amplificada 1900 veces.
- Fig. 13. Micrografía de levadura sin ningún tratamiento y amplificada
600 veces. La micrografía 11 y ésta no son el mismo campo -
de observación.
- Fig. 14. Micrografía de S. cerevisiae amplificada 600 veces con el --
tratamiento descrito en la figura 12. Esta figura y las 12
no son el mismo campo visual.



CUADRO 1

RENDIMIENTOS DE LA EXTRACCION ALCALINA
DEL ARN DE LEVADURAS DE PAN

Tiempo de incubación (minutos)	% de ARN extraído*	
	60° C	90° C
Inicial**	13.3	12.9
20	35.8	86.6
45	40.8	95.8

* Los cálculos se hicieron como se señala - en el texto, comparándolos con el 100 % - de ARN extraído con ácido perclórico --- 0.5 M.

** ARN extraído a temperatura ambiente, en - condiciones alcalinas, antes de la incuba - ción a las temperaturas indicadas.

DISCUSION

Los primeros ensayos radioactivos se hicieron con el objeto de saber si se podía extraer, bajo condiciones similares a las descritas por Nakao et al. (1964), el ARN de Saccharomyces cerevisiae y si esta -- extracción sería suficiente para poder aprovechar las levaduras como una fuente de proteína libre de ARN. Por los resultados obtenidos se pudo -- saber que la extracción se puede efectuar facilmente a pH 12 y no a pH 8, sobre todo con temperaturas a 90° C --Nakao, et al. (1964), emplearon el pH 8 y las temperaturas cercanas a 25° C en sus estudios en S. rouxii -- como se indicó antes. Como el principal producto de extracción es el -- ARN, parcialmente despolimerizado, se puede considerar que el método aquí desarrollado es adecuado para la obtención selectiva de nucleótidos sabo -- rizantes, si se pone el ARN extraído en presencia de las fosfodiesterasas específicas. Así mismo, se encontró que la extracción del ARN de las leva -- duras es más rápida a temperaturas altas teniendo el pH inicial de 12, -- ya que en este estudio no se emplean soluciones amortiguadoras del pH, -- como lo hizo Canepa, et al. (1972), pues estas soluciones no serían econó -- micas en un proceso industrial.

Con estos resultados, se puede pensar que la extracción alcalina de ARN en la levadura del género Saccharomyces, probablemente pueda extenderse a otros microorganismos de interés industrial (v.gr., Candida utilis), ya que los resultados aquí obtenidos indican que la extracción --

es debida, principalmente, al pH y temperatura empleados y no por la --
activación de ribonucleasas ó desnaturalización de reguladores enzimáticos
cos como lo piensan Maul, et al., (1970) y Canepa, et al. (1972).

Se coincidió con los trabajos de Zee y Simard (1975), en --
afirmar que para la extracción del ARN de levadura, no es necesario se-
guir los pasos secuenciales del choque térmico, es decir, las incubaciones
a 50 y 55° C como lo sugiere Ohta, et al. (1971). Nosotros creemos
que tampoco es indispensable la diálisis por tiempo prolongado, como la
describe Canepa, et al. (1972). Por otra parte, los resultados obteni-
dos por Razzel y Khorana (1959), señalan que el cloruro de sodio es un
activador de las ribonucleasas. Sin embargo, durante la elaboración de
este trabajo se encontró que en presencia o ausencia de tales sales, el
proceso de extracción del ARN no varió, por lo que se dedujo que proba-
blemente no hay participación de nucleasas que se activen debido a la -
fuerza iónica y que solo fue necesario elevar la temperatura para faci-
litar, aún más, la extracción alcalina de los ácidos nucleicos (Fig. 4
a 7).

Por el análisis cromatográfico en gel de Sephadex G-10, se
puede presumir que el ARN obtenido con este proceso está en forma de po-
linucleótidos de posible peso molecular elevado, como se señaló antes -
(fig. 8a y b), puesto que las muestras de ARN de referencia fueron eluí
dos con el mismo volumen en el Sephadex G-10 que el ARN extraído por el

método aquí desarrollado*. Además, nuestra muestra (fig. 8b) aparece -- casi toda en una sola fracción cromatográfica, lo cual puede ser un --- indicio de que se obtiene un ARN homogéneo y en forma de polinucleótido de peso molecular parecido, que salen con el volumen de exclusión del -- Sephadex G-10.

Estos resultados difieren con los resultados cromatográficos de Ohta, et al. (1971), pues ellos obtuvieron productos con diversos gra dos de despolimerización usando una columna con características simila-- res a la descrita en párrafos anteriores.

* En los estudios analíticos de la distribución de los pesos moleculares, de Andrews (1965), se encontró que las sustancias de peso molecular - elevado son excluidas con volúmenes cortos de elución (volúmenes de - exclusión) en geles con bajo "regane" de agua o de poro pequeño (como es el caso del Sephadex G-10), así pues, para este trabajo y partien do de los datos experimentales de separación de nucleótidos obtenidos por Brook (1970), se seleccionó el Sephadex G-10, ya que éste al ha-- cer el análisis de sustancias de peso molecular bajo, obtuvo una bue na resolución en la separación de diferentes nucleótidos, además de - que excluyó sustancias de peso molecular elevado indeseables. Por -- otra parte, se usó una solución con fuerza iónica alta, para la elu-- ción, de cloruro de sodio 1M para evitar los posibles fenómenos de -- adsorción que pudieran presentarse, como lo señaló Posner (1963), de bido a que la matriz del Sephadex contiene un pequeño número de gru pos carbonilo que, aunque en número reducido, a baja fuerza iónica -- del eluyente causa interacciones, entre los solutos cargados y la ma tríz. Así, los grupos cargados positivamente pueden ser retardados - resultando un coleo en la gráfica correspondiente. Los grupos carga dos negativamente son excluidos con mayor rapidez por fenómenos eléc tricos de repulsión presentes en el gel, lo cual redundaría en una po bre separación de una mezcla de compuestos.

Por otra parte, bajo las condiciones finales de extracción, el ARN no fue hidrolizado a temperatura ambiente. Pero cuando el pH se ajustó adecuadamente (como se señala en las figs. 9 y 10) se observó -- una hidrólisis pronunciada del ARN. También, se encontró que la degradación del ARN extraído a diferentes temperaturas fue efectuada a pH -- 8.6 por un sistema enzimático caracterizado por sus resistencias al calor pues, este proceso, no se inactivó por la incubación a temperaturas cercanas a 90° C. En particular, algunas enzimas de este sistema degradativo del ARN, resisten la temperatura de 90° C por 35 minutos -Tanaka (1961), encontró que algunas ribonucleasas resisten temperaturas de 100° C por 10 minutos- lo cual, puede ser aprovechado ya que la misma levadura puede ser fuente de fosfodiesterasa parecidas a las del veneno de víbora que se caracterizan por producir nucleótidos 5' y que sirven en la industria alimenticia para modificar el sabor de los alimentos, confiriéndoles nuevas propiedades a los alimentos que les son adicionados.

Así pues, como las levaduras tratadas por nuestros métodos - quedan prácticamente sin ácidos nucleicos, pensamos que pueden ser aprovechadas como una fuente de nitrógeno proteico para rumiantes y cerdos - y tal vez para complementar, en un futuro, la dieta del hombre. Creemos que este método, podría ser útil en la lucha contra la carencia de alimentos proteicos, por la utilización nutricional de las levaduras derivadas de la fermentación alcohólica y podría contribuir a la industrialización integral de estas levaduras. En el momento presente ya se están --

desarrollando las pruebas para determinar si este método puede también - ser útil para la industrialización integral de Candida utilis, producida por la degradación aeróbica de diversos jugos azucarados disponibles en México.

RESUMEN

Durante el desarrollo de este trabajo se logró establecer -
lo siguiente:

a) Que no es necesario seguir los pasos secuenciales del -
choque térmico para poder disminuir el contenido de ARN en la levadura,
como lo estableció Maul et al (1970), y que siguieron otros investiga--
dores como modelo de extracción de ácidos nucleicos.

b) Que bajo las condiciones establecidas en este trabajo -
es posible la extracción de ácidos nucleicos y polinucleótidos de varios
géneros de levaduras, v.gr.: Candida y Saccharomyces.

c) Durante el desarrollo experimental de este reporte se -
encontraron algunas evidencias de que posiblemente no hay participación
de enzimas para lograr la disminución de los ácidos nucleicos conteni--
dos en la levadura.

d) Se pudo establecer, mediante este método de extracción,
que el proceso de disminución de ácidos nucleicos depende básicamente -
de dos factores, a saber: pH alcalino y temperatura elevada.

e) Se encontró, a diferencia de otros métodos de extrac--
ción, que el método de extracción es muy corto y que la eficiencia es
del 95 % del total de los ácidos nucleicos contenidos en las levaduras.

f) Finalmente, se establece que la proporción de proteína extraída es mínima.

BIBLIOGRAFIA

- Andrews, P., *Biochem. J.*, 96, 595 (1965).
- Bacher, J. E. y Allen, F. W., *J. Biol. Chem.*, 183, 641 (1950)
- Baddiley, J. y Todd, A.R., *J. Chem. Soc.* 648 (1947).
- Brook, A.J.W., *J. Chromatog.* 47, 100 (1970).
- Burdon, K.L. y Williams, R.P., *Microbiology*, Sixth Edition 1968, The MacMillan Company, pág. 255-264.
- Canepa, A., Pieber, M., Romero, C. y Toha, J.C., *Biotec. Bioeng.* 14, 173 (1972).
- Cohn, W.E. y Volkim, E., *J. Biol. Chem.* 203, 319 (1953).
- Cook, A.H. *The Chemistry and Biology of Yeast*, Academic Press Inc., 1958, pag. 157-163.
- Cresfield, A.M., Smith, K.C. y Allen, F.W., *J. Biol. Chem.*, 216, 185 (1955).
- Edozien, J.C., Udo, U.U., Young, V.R. y Scrimshaw, N.S., *Nature* 228, 180 (1970).
- Fast, D., *J. Bacteriol.*, 116, 925 (1973).
- Greer, S. y Zamenhof, S., *J. Mol. Biol.*, 4, 123 (1962).
- Haberman, V., *Biochem. Biophys. Acta*, 55, 999 (1964).
- Heppel, L.A. and Rabinowitz, Jesse, C., *Ann. Rev. Biochem.* 27, 613a (1958).
- Karnovsky, J.M., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11, 129 (1965)
- Kay, E.R. y Dounce, A.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4041 (1953).
- Lehninger, A.L., *Biochemistry*, Worth Publishers, Inc. (1970).

- Loring, H.S., Fairley, J.L. y Segran, H.C., *J. Biol. Chem.*, 197, 823 (1952).
- Lowry, O.H. y Farr, P.N., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- Luft, J.H., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 409 (1961).
- Mahler, H.R. y Cordes, E.H., *Biological Chemistry*, Harper International Edition and Row, 1966, pág. 132-137 y 158-161
- Marshak, A., Vogel, H.J., *Fed. Proc.*, 9, 85 (1950).
- Maul, S.B., Sinskey, A.J., Tannenbaum, S.R., *Nature* 228, 181 (1970).
- Nakao, Y., Imada, A., Wada, T. y Ogata, K., *Agr. Biol. Chem.* 28, 151 (1964).
- Ogur, M., y Rosen, G., *Arch. Biochem.* 25, 262 (1950).
- Ohta, S., Maul, S., Sinskey, A.J. y Tannenbaum, S.R., *Appl. Microbiol.*, 22, 415 (1971).
- Peschard, M.E. y Viniegra G.G., *Congreso de Química de América del Norte*, México, D.F., Noviembre (1975).
- Posner, A.M., *Nature* 198, 1161 (1963).
- Rakoff, H. y Rose, N.C., *Química Orgánica Fundamental.*, Edit. Limusa, S.A. 1971 pág. 796-799.
- Razzel, W.E., *J. Biol. Chem.* 235, 3028 (1961).
- Razzel, W.E. y Khorana, H.G., *J. Biol. Chem.* 234, 2105 (1959).
- Rose, H.A., *Chemical Microbiology*, Sd. Edition 1968, Butterworth and Co. (Publishers) Ltd. pág. 20-25.
- Smith, C., *J. Biol. Chem.* 216, 185 (1955).
- Smith, J.D. y Markham, R., *Biochem. J.* 46, 513 (1950).
- Stokes, J.L. y Gunness, M., *J. Bacteriol.*, 52, 251 (1946).

Tanaka, K., J. Biochem. 50, 62 (1961).

Venable, J.H. y Coggeshall, R., J. Cell. Biol., 25, 407 (1965).

Volkin, E. y Carter, C.E., J. Am. Chem. Soc., 73, 1516 (1951).

Zee, J.A. y Simard, R.E., Appl. Microbiol., 29, 59 (1975).