

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA MONOCELULAR E RNA A PARTIR DE *Candida utilis* CULTIVADA EM MELAÇO

Marcos José CORREIA*
Aldes SERZEDELLO**

■ **RESUMO:** Com o objetivo de se obter proteína monocelular com baixo nível de ácidos nucleicos, *Candida utilis* foi cultivada em meio de melação com 5% de açúcares redutores totais (ART), sob agitação a 30°C. O meio foi suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ numa concentração de 0,1% e 0,2%, tempos de cultivo de 48 e 72 horas, respectivamente. Com 48 horas de cultivo, obtiveram-se 37% de proteína e 4,5% de RNA e, com 72 horas de cultivo, 39% de proteína e 3,2% de RNA. Foi realizada extração de RNA da biomassa produzida durante 48 horas, a partir de 24 horas de cultivo em intervalos de 12 horas, com solução de amônia a 60°C com agitação. O teor final de RNA, após extração, foi inferior a 2% e recuperou-se, por precipitação, 58,4% do RNA extraído.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** *Candida utilis*; proteína monocelular; RNA.

Introdução

Além dos aspectos nutricionais, relacionados com a composição de aminoácidos, a toxidez ou a presença de compostos potencialmente tóxicos na proteína microbiana não devem exceder os limites aceitáveis pelo organismo humano, os quais são estabelecidos por rigorosos padrões internacionais.^{1,2} O fator limitante mais imediato do uso de proteína microbiana alimentar tem sido o seu alto nível de ácidos nucleicos (RNA em maior concentração) nos microrganismos, que varia de 5%-25% em bactérias, 2,5%-15% em leveduras e 0,7%-28% em fungos.³ Segundo Edozien et al.,³ o consumo limite diário para um indivíduo adulto é de 2,0 g. Acima desta taxa, foi constatado um aumento de ácido úrico no sangue e na urina. A ingestão de quantidades elevadas de ácidos nucleicos provoca o aumento da concentração de purinas que, no organismo, são precursores na síntese do ácido úrico, originando a

* Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE - 52171-900 - Recife - PE - Brasil.

** Departamento de Bioquímica e Microbiologia - Instituto de Biociências - UNESP - 13500 - Rio Claro - SP - Brasil.

hiperuricemia, à qual estão associadas condições clínicas, tais como gota, nefropatia hiperuricêmica e cálculos renais.^{8,12,15}

O teor de ácidos nucleicos em levedura varia com a espécie e com as condições físicas e químicas de cultivo, tais como pH, temperatura, fonte e concentração de nitrogênio, concentração de fosfato, tempo de cultivo,^{1,5,6} e presença dos íons Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} . Para se reduzir o teor de RNA na biomassa microbiana, podem-se utilizar métodos de controle metabólico, que envolvem as condições de cultivo, ou métodos de extração, por processos físicos ou químicos, ou, ainda, por digestão autolítica.⁹

Material e método

Material

Microorganismo. Para este experimento, foi utilizada a levedura *C. utilis* - IA240 (IZ1841), gentilmente cedida da coleção de microrganismos do Instituto Zimotécnico Prof. Dr. Jayme Rocha de Almeida, Departamento de Tecnologia Rural, ESALQ, USP.

Meio. Para a reativação do microorganismo, foi utilizado o meio YEPD (1,0% de extrato de levedura, 2,0% de peptona e 2,0% de dextrose) em água destilada. Utilizou-se, para a manutenção da cultura, meio YEPD-Ágar. Para a propagação e o cultivo, foi utilizado meio de melão, pH 5,0, com concentração de açúcares redutores totais (ART) de 5%, suplementado com N e P, pela adição de 0,1% ou 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, segundo o caso.

Reagentes. Coomassie Blue G250 a 0,06% em HCl 0,6M,¹⁴ orcinol 0,21% e FeCl_3 0,1% em HCl conc. P.A.;⁷ NaOH 0,5 N; solução salina 0,9% NaCl; hidróxido de amônio P.A.; HCl conc. P.A.; fosfato dibásico de amônio P.A.

Vidraia. Erlenmeyers de 500 ml, balões volumétricos, pipetas, tubos de ensaio.

Equipamentos. Espectrofotômetro Carl Zeiss, modelo M4Q II, banho termostático com agitação, mesa agitadora Equilabor modelo EMAAO, centrífuga de mesa Sorvall modelo SS-1, centrífuga refrigerada FANEM modelo FR22, medidor de pH Micronal.

Método

Cultivo. A cultura foi iniciada através da transferência das células de tubos de cultura pura em meio YEPD-Ágar, para o meio YEPD, com a finalidade de se reativarem as células. Em seguida, 10 mL de inóculo foram transferidos para o meio de propagação de melão pH 5, mantendo-se por 24 horas sob agitação a 250 rpm, a 30 °C. Após

propagação, 10 mL foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL de meio de melão suplementado com 0,1% ou 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. O cultivo foi conduzido durante 48 horas, em meio suplementado com 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e com volume de inóculo de 20% do volume total, retirando-se amostras nos intervalos de 24, 36 e 48 horas. Outro cultivo foi realizado durante 72 horas, em meio suplementado com 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e com volume de inóculo de 10% do volume total, retirando-se amostras nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. As amostras foram centrifugadas, as células lavadas e posteriormente utilizadas nas determinações de peso de matéria seca (PMS), teor de proteína e teor RNA (TAN).

Extração de RNA. As células lavadas obtidas anteriormente foram utilizadas para extração de RNA. Inicialmente, as células foram ressuspenso em uma solução de NH_3 a 1%,² a uma concentração de 10% (p/v) e, em seguida, submetidas a aquecimento a 60 °C durante 15 minutos sob agitação. Após extração, o material foi resfriado e submetido a centrifugação a 10.000 xg. Após centrifugação, o sobrenadante foi separado e o precipitado foi submetido a lavagem, para remoção do RNA residual. Os dois sobrenadantes finais foram misturados e o RNA foi precipitado através da adição de 1,5 volume de etanol/NaCl 1,0 M (1:1 v/v) a 0 °C. O RNA foi colhido através de centrifugação e o precipitado foi ressuspenso em água destilada.

Determinação de RNA. Foi utilizado o método descrito por Herbert et al.,⁴ com a reação de Bial.⁷

Determinação de proteína. Foi utilizado o método colorimétrico pela reação com Coomassie Blue G250.¹⁴

Resultado e discussão

O teor de RNA decresce com o tempo de crescimento e com a redução da concentração de amônio e fosfato.⁸ Nos experimentos realizados, foi observada uma redução de 46,5% do teor de RNA inicial. Após 72 horas de cultivo com melão (ART a 5% e 0,2% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, houve uma redução de apenas 4,6% no teor de proteína (Tabela 1). As relações proteína-RNA, nas etapas inicial e final, foram 5,6 e 10,1, respectivamente. A baixa proporção, na fase inicial, foi devida provavelmente a um elevado número de isoceptores no RNA, reduzindo, assim, a velocidade de síntese protéica.¹¹ Com a redução do nível de nitrogênio do meio e o aumento da massa celular, restabeleceu-se a velocidade de síntese de proteína, que voltou a decrescer com a exaustão total daquele nutriente.

Com o objetivo de se obter um menor teor de RNA celular em um tempo menor de cultivo (48 horas), reduziu-se o nível de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ para 0,1% e duplicou-se o volume do inóculo. Obteve-se, então, uma redução de 52,6% do teor inicial de RNA

e de 10,8% do teor de proteína (Tabela 1). A razão proteína/RNA elevou-se de 4,4, no tempo inicial, para 8,2, no final de 48 horas, o que demonstrou não ter havido aumento de síntese protéica em relação ao cultivo de 72 horas, que apresentou uma relação proteína/RNA de 5,6 e 10,1, para o início e o final de cultivo, respectivamente.

Tabela 1 - Cultivo de *C. utilis* em melão a 5% de ART, suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a 0,1%, com 48 horas de cultivo e com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a 0,2%, com 72 horas de cultivo a 30°C

Cultivo com 48 horas				
T (h)	Biomassa (mg/ml)	RNA (%)	Proteína (%)	Prot./RNA
0	N.D.	9,5	41,5	4,4
24	8,34	9,6	35,3	3,7
36	9,31	7,5	36,1	4,8
48	10,30	4,5	37,0	8,2

Cultivo com 72 horas				
T (h)	Biomassa (mg/ml)	RNA (%)	Proteína (%)	Prot./RNA
0	N.D.	7,3	41,3	5,6
24	3,3	8,2	42,4	6,3
48	7,8	6,7	41,4	6,2
72	9,1	3,9	39,4	10,1

Procedeu-se, então, à extração do RNA pelo método acima descrito (Figura 1). O produto da extração (Tabela 2) apresentou, para cada intervalo de tempo estudado durante o cultivo de 48 horas, uma biomassa com níveis de RNA bastante reduzidos, com valores iguais a 2,51% (24 horas), 2,9% (36 horas) e 1,5% (48 horas). A precipitação com etanol e NaCl proporcionou uma recuperação do RNA extraído (Tabela 2) de 37,24% (24 horas), 58,36% (36 horas) e 50,11% (48 horas). O teor de RNA no extrato apresentou concentração mais elevada em comparação com a de proteína, o que pode ser observado com grande evidência na Figura 2, onde se observa o espectro de absorvância entre 200 e 350 nm do extrato realizado com a *C. utilis* obtida com 24 horas de cultivo.

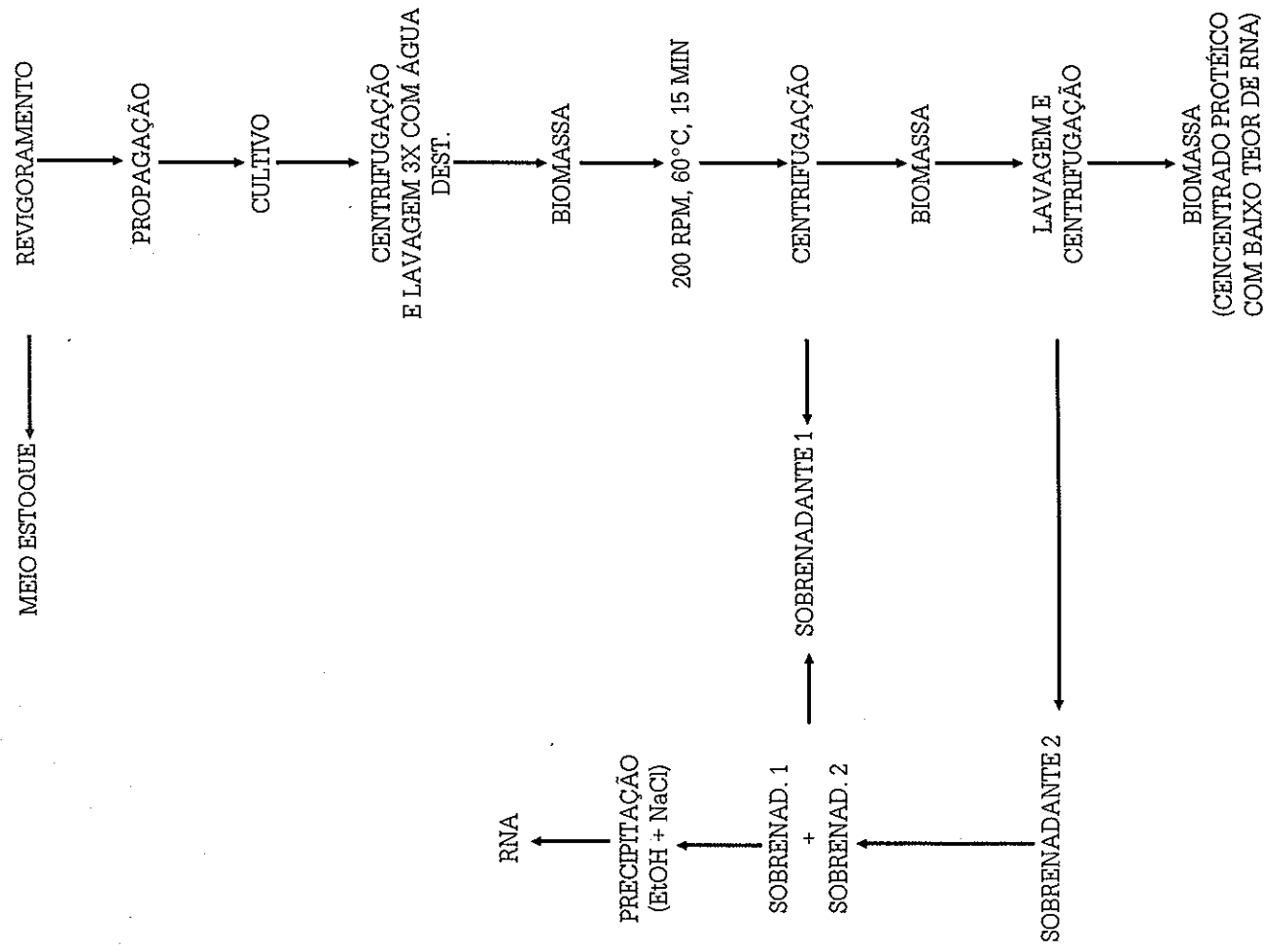


FIGURA 1 - Extração de RNA por NH₃ em *C. utilis* cultivada em melão suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, por 48 horas a 30°C, com 250 rpm.

Tabela 2 - Resultados da extração de RNA com NH_3 (0,1 g de NH_3/g de biomassa seca) de *C. utilis* cultivada em melão suplementado com 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, por 48 horas a 30°C

T (h)	RNA (%)				Proteína (%)			
	Ini.	Fin.	Extr.	Recuper.	Perda	Ini.	Fin.	Perda
24	9,60	2,51	78,31	37,24	62,75	35,00	39,01	7,50
36	7,50	2,90	68,53	58,36	41,64	32,00	37,99	3,50
48	4,50	1,50	70,95	50,11	49,99	37,01	40,00	5,79

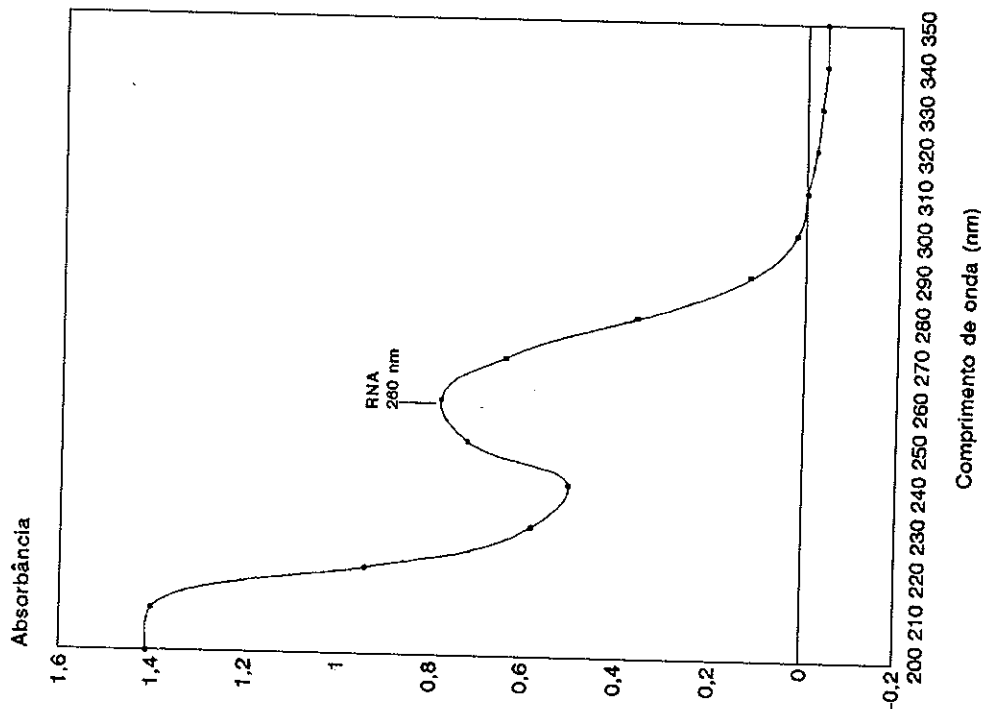


FIGURA 2 - Espectro ultravioleta do extrato (com NH_3 a 60°C) de *C. utilis*, com 24 horas de cultivo. Diluição da amostra de 1:100 e cubeta de 0,5 cm.

Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que o cultivo de *C. utilis* por longo intervalo de tempo em batelada, embora reduzindo o nível de RNA na biomassa assim obtida, não foi eficiente para a obtenção de níveis de RNA seguros ao consumo humano. A sua aplicação em nível industrial também não é recomendável devido à elevada demanda energética.

O processo de extração de RNA com NH_3 proporcionou uma significativa redução do teor de RNA inicial, obtendo-se uma biomassa com níveis de ácidos nucleicos adequados ao consumo humano. A precipitação do RNA extraído, com etanol e NaCl, sugere futuros estudos para uma possível adequação a uma escala industrial de produção de ácidos nucleicos.

Agradecimento

Os autores agradecem à CAPES e à UFRPE pela bolsa concedida e pela liberação em tempo integral, respectivamente. A M. J. Correia, à UNESP, e, em particular, ao Departamento de Microbiologia e Bioquímica do Instituto de Biociências - Rio Claro - SP, à Prof^a Dr^a Djanira de F. de Angelis, pelo apoio e colaboração na realização desta pesquisa.

CORREIA, M. J., SERZEDELLO, A. Production of single-cell protein and RNA by *Candida utilis* grown in molasses. *Ecl. Quím. (São Paulo)* v.20, p.9-16, 1995.

■ **ABSTRACT:** In order to obtain single-cell protein with low nucleic acid contents, *Candida utilis* was grown in batch culture, which was carried out in 5% (w/v) sugar molasses medium, under agitation at 30°C. The experiment was done in two cultivation periods, 48 hours and 72 hours, with supplementations of 0.1% and 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, respectively. At the end of 48 hours cultivation, the biomass showed 4.5% of RNA and 37.0% of protein contents; and at 72 hours cultivation, 3.2% of RNA and 39.4% of protein. RNA was extracted from 48 hours biomass by means of NH_3 solution at 60°C and stirring device. The final RNA content in the biomass was less than 2%. The RNA extracted was recovered by precipitation with yield of 58.4%.

■ **KEYWORDS:** *Candida utilis*; single-cell protein; RNA.

- 1 ALROY, Y., TANNENBAUM, S. R. The influence of environmental conditions on the macromolecular composition of *Candida utilis*. *Biotech. Bioeng.*, v.15, p.239-56, 1973
- 2 ANDREU, F. et al. A simple method for RNA extraction from yeasts. *Biotech. Bioeng.*, v.32, p.927-9, 1988.
- 3 EDOZIEN, J. C. et al. Effects of high levels of yeast feeding on uric acid metabolism of young men. *Nature*, v.228, p.180, 1970.
- 4 HERBERT, D., PHIPPS, P. J., STRANGE, R. E. Chemical analysis of microbial cells. In: NORRIS, J. R., RIBBONS, D. W. (Eds.) *Methods in microbiology*. London: Academic Press, 1971. v.5B, cap.3.
- 5 MINKEVICH, I. G. et al. Continuous growth of *Candida utilis* under periodic change of growth-limiting substrate. *Folia Microbiol.*, v.35, p.251-65, 1990.
- 6 NAKAO, Y. Microbial production of nucleosides and nucleotides. In: PEPLER, H. J., PERLMAN, D. (Eds.) *Microbial technology*. 2.ed. New York: Academic Press, 1979. v.1, cap.10.
- 7 PARISH, J. H. *Principles and practice of experiments with nucleic acids*. London: Longman, 1976. cap.4.
- 8 PARK, Y. K. O problema nutricional de proteínas de organismos unicelulares. *Bol. Inst. Tecnol. Alim.*, v.29, p.61-6, 1972.
- 9 PEPLER, H. J. Production of yeast and yeast products. In: PEPPER, H. J., PERLMAN, D., (Eds.) *Microbial technology*. 2.ed. New York: Academic Press, 1979. v.1, cap.5.
- 10 POZMOGOVA, I. N. et al. Effect of temperature on morphology of a chemostat culture of yeast *Candida utilis* and on the content of nucleic acids in it. *Microbiol.*, v.47, p.251-5, 1979.
- 11 RAWN, J. D. *Biochemistry*. Burlington: Neil Patterson, 1989. Cap.9
- 12 SARWARR, G. et al. Nucleic acid, fiber and nutrient composition of inactiva dried yeast products. *J. Food Sci.*, v.50, p.353-7, 1985.
- 13 SCRIMSHAW, N. S. Introduction. In: MATELES, R. I., TANNENBAUM, S. R. (Eds.) *Single-cell protein*. Cambridge: MIT 1968. p.3-7.
- 14 SEDMAK, J. J., GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant G250. *Anal. Biochem.*, v.79, p.544-52, 1977.
- 15 STRYER, L. *Biochemistry*. San Francisco: W. H. Freeman, 1975. 877p.

Recebido em 26.5.1994.
Aceito em 11.8.1994.