

Determinación del grado de hidrólisis de la levadura *Candida utilis* en presencia de ácido sulfúrico

Claudia A. Fandiño-Rodríguez, Manuel Díaz-de los Ríos*
Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)
Vía Blanca, No. 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón. La Habana, Cuba.
* manuel.diaz@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

La determinación del grado de hidrólisis (GH) de fuentes proteicas, durante las hidrólisis ácida o enzimática, es muy importante para el desarrollo de suplementos alimenticios y concentrados de péptidos y aminoácidos, para fines nutricionales, agrícolas u otros, así como para el control de calidad de estos procesos. Los métodos de valoración con formaldehído y el método de Biuret fueron los seleccionados para determinar el GH durante la hidrólisis de la levadura *Candida utilis* en presencia de ácido.

Ambos métodos han sido evaluados en muestras de hidrolizados de levadura. El grado de hidrólisis se ha determinado sobre la base de que la levadura empleada posee como promedio un 45 % de proteína. Los resultados obtenidos indican que se logra una concentración promedio de proteína soluble de 58.22 mg/ml o g/L para un grado de hidrólisis promedio estimado del 49.44 %.

Excepto las muestras 19012 y 19016, el grado de hidrólisis promedio es de 49.44 %, lo cual debe ser verificado mediante la técnica de valoración con formaldehído. Se aprecia que existen ciertas diferencias que se refieren al grado de hidrólisis que reporta cada método:

- diferencias inherentes a lo que cada método reporta
- la valoración con formaldehído se ha considerado un valor de $h_{tot}=7.8$, cuando puede ser diferente.

Palabras clave: grado de hidrólisis, hidrólisis ácida, *Candida utilis*, péptidos, aminoácidos.

ABSTRACT

Determining of hydrolysis degree of protein sources during acid or enzymatic hydrolysis process, is very important for development of food supplements and peptic concentrates and amino acid for nutritional, agricultural and other purposes, as well as for quality control of such processes. Formaldehyde and Biuret valuation methods were selected to determine hydrolysis grade during hydrolysis of *Candida utilis* tests under acid presence.

Both methods have been evaluated in samples of yeast hydrolysates. The degree of hydrolysis has been determined considering that the yeast used has an average of 45 % protein. The results obtained indicate that an average soluble protein concentration of 58.22 mg / ml or g / L is achieved for an estimated average degree of hydrolysis of 49.44 %.

Accept for samples 19012 and 19016 means hydrolysis degree was 49.44% something must be verified by formaldehyde valuation. Appreciated was certain differences exist referred to hydrolysis degree reported by each method, differences inherent to each method report and formaldehyde valuation had being considered a value of $h_{tot} = 7.8$ when it could be different.

Keywords: degree of hydrolysis, acid hydrolysis, *Candida utilis*, peptides, amino acids.

INTRODUCCIÓN

La determinación del grado de hidrólisis (GH) de fuentes proteicas durante las hidrólisis, ácida o enzimática, es de vital importancia para el desarrollo de suplementos alimenticios y concentrados de péptidos y aminoácidos con fines nutricionales, agrícolas y otros, así como para el control de calidad de estos procesos.

En la literatura se reportan diversos métodos para la determinación del grado de hidrólisis; Navarrete (1) y Silvestre (2) han presentado excelentes resúmenes sobre estos métodos.

Esencialmente, estos métodos se basan en la determinación de nitrógeno soluble como resultado de la ruptura de los enlaces peptídicos de la fuente proteica hidrolizada, con la consecuente formación de aminoácidos y péptidos solubles. Varios métodos han sido desarrollados para cuantificar la presencia de grupos amino, entre los que se destacan la valoración con formaldehído. Los aminoácidos reaccionan con formaldehído al liberar un protón ^+H , el cual puede ser valorado con una solución de hidróxido de sodio; una de las principales limitantes del método radica en su incapacidad para detectar histidina y la identificación parcial de la hidroxiprolina, por lo que hidrolizados ricos en estos aminoácidos no deben ser evaluados por esta técnica. Para la cuantificación final del GH se sigue el procedimiento de Addler (3), que refiere el resultado sobre la base de los enlaces péptidos rotos (h) respecto a los disponibles en la proteína original (h_{tot}) o, a partir de la metodología de Sørensen (4) en la que, basado en la estequiometría de dicha reacción, se asume que el consumo de 1 ml de $NaOH$ 0.1 N equivale a 1.4 mg de aminoácido. El método potenciométrico de valoración con formaldehído ha sido evaluado como método para el control de calidad durante la obtención de microalgas con fines médico-farmacéuticos (5), entre otras muchas aplicaciones.

Otros métodos, tales como la reacción de los grupos amino con ninhidrina, con ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y orto-ftalaldehído se basan en técnicas espectrofotométricas en las que la concentración de aminoácidos se relaciona con la intensidad del color resultante. La reacción de los grupos alfa-amino libres con la ninhidrina a pH 5, y bajo la acción del calor, genera un producto que produce una coloración azul-violeta y que absorbe a los 570 nm (6); mientras que la reacción de los aminoácidos con TNBS, en condiciones ligeramente alcalina, genera un producto amarillo que absorbe a los 340 nm (7). Estas técnicas, aunque brindan una buena precisión, son trabajosas. Sin embargo, otro método también espectrofotométrico y basado en la reacción de los grupos amino primarios con orto-ftalaldehído (OPA), forma un producto que absorbe a los 340 nm; este método es más exacto y rápido que el TNBS (8), por lo que pudiera ser considerado como una alternativa para el control de calidad de los hidrolizados de proteínas.

Otros métodos que se emplean en la determinación del GH se basan en la determinación de la proteína soluble, mediante la detección de la presencia de enlaces péptidos, dada la facilidad de estos para reaccionar con los iones de cobre II y formar un complejo coloreado (azul púrpura) en medio alcalino, que absorbe a los 540 nm (9). Este método, conocido como ensayo de Biuret, por su reacción positiva frente a esta molécula, es de escasa complejidad, por lo que pudiera ser empleado para la determinación rápida del GH durante la hidrólisis ácida de la levadura. La sensibilidad de este método ha sido verificada por Janairo *et al.* (10), para concentraciones de proteína inferiores a los 5 mg/ml.

Debido a que los métodos descritos previamente emplean conceptos diversos para determinar el GH, los resultados que se obtienen por una u otra metodología no siempre resultan coincidentes, lo que ha sido reportado por diversos autores; Silvestre *et al.* (11) evalúan varios métodos para determinar el GH, durante la hidrólisis enzimática de la proteína del suero de leche con el empleo de pancreatina. Emplearon el método modificado de Lowry (modificación del método de Biuret) para determinar la proteína soluble, el método de valoración con formol y el método de OPA y concluyeron que los mejores resultados se alcanzaron con el método de proteína soluble, aunque el método

de valoración con formaldehído resultó más confiable para describir las variaciones del GH con el tiempo de reacción. Un resultado similar había obtenido previamente este mismo colectivo (12), pero con un mayor GH, mediante el empleo de la proteasa de *Bacillus Licheniformi*. Por supuesto, estas diferencias bien pueden deberse a que la presencia de polipéptidos y péptidos es detectable desde estadios iniciales de la reacción, mientras la presencia de aminoácidos se incrementa en el transcurso del tiempo. De hecho, en el estudio de Silvestre *et al.* (11) el incremento en la concentración de nitrógeno amínico se corresponde con una ligera disminución de la proteína soluble desde 36.41 hasta 34.28, entre las 3 y 5 h de reacción.

Un estudio cinético de la hidrólisis ácida de proteína de plumas de aves, mediante el empleo del método de Biuret, evidencia la ocurrencia de dicho fenómeno en las determinaciones analíticas del contenido de péptidos solubles, pues se observa un incremento en sus concentraciones, para determinadas condiciones de reacción y después disminuye, atribuible al incremento en la concentración de aminoácidos (13).

A partir de estas experiencias, los métodos de valoración con formaldehído y el método de Biuret han sido seleccionados para determinar el GH, durante la hidrólisis de la levadura *Candida utilis* en presencia de ácido sulfúrico y, posteriormente, dar seguimiento al curso de la reacción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hidrolizado de Levadura: Se realiza al someter la levadura *Candida utilis* a condiciones severas, dígase altas temperaturas en medio ácido.

Métodos analíticos

Método de Biuret para determinar el grado de hidrólisis

El ensayo de Biuret (Piotrowski's test) es un ensayo químico para determinar la presencia de enlaces pépticos; valora proteína soluble. En presencia de péptidos el ion de cobre II forma un complejo violeta en solución alcalina. Este método se basa en que la concentración de proteína puede ser determinada porque los enlaces péptidos y aminoácidos ocurren en la misma frecuencia. La intensidad del color a 540 nm es proporcional a la concentración de proteína.

En este ensayo el cobre II se enlaza con el hidrógeno presente en el péptido de la proteína para después reducirse a cobre.

Para el desarrollo del método se empleó el siguiente procedimiento:

Preparación del reactivo Biuret: Se disuelve 1.5 g de sulfato de cobre II y 6 g de tartrato de sodio y potasio en 500 ml de agua. Se adicionan 300 ml de NaOH al 10 % y se enrasa en un volumétrico de 1L. Después se adiciona 1 g de Ioduro de potasio para inhibir la reducción del cobre y se guarda en frasco plástico protegido de la luz. Se prepara una concentración madre de 1 g de albúmina en 100 ml de solución (10 mg/ml). De la solución madre se toman alícuotas para formular diversas concentraciones de albúmina, según la tabla 1.

Tabla 1. Preparación de concentraciones de albumina para elaboración de curva patrón

No.	Conc. deseada (mg/ml)	Alícuota (ml)	Peso M (mg)	Dilución (ml)
madre	10.00		1000	100
2	8.00	20.00	200.00	25
3	6.00	15.00	150.00	25
4	5.00	12.00	125.00	25
5	4.00	10.00	100.00	25
6	3.00	7.50	75.00	25
7	2.50	6.25	62.00	25
8	2.00	5.00	50.00	25
9	1.50	3.75	37.50	25
10	1.00	2.50	25.00	25
11	0.50	1.25	12.50	25

Se preparan muestras por triplicado de cada concentración y se centrifugan a 4500 rpm durante 15 min. Se toman 0.5 ml de sobrenadante de cada muestra y se le añaden 2.5 ml de solución de Biuret. Se deja reposar por 30 min y se lee a 540 nm. Los resultados son tabulados en la tabla 2.

Tabla 2. Datos para ajuste técnica de Biuret

Curva de estándares			
Conc. final (mg/ml)	D.O (540 nm)		
0.0	0.095	0.095	0.095
0.5	0.024	0.022	
1.0	0.05	0.049	
1.5	0.066	0.067	0.067
2.0	0.095	0.095	
2.5	0.109	0.11	0.109
3.0	0.119	0.119	0.119
4.0	0.164	0.166	
5.0	0.212	0.215	
6.0	0.273	0.274	0.272
8.0	0.364	0.364	0.362
10.0	0.451	0.451	

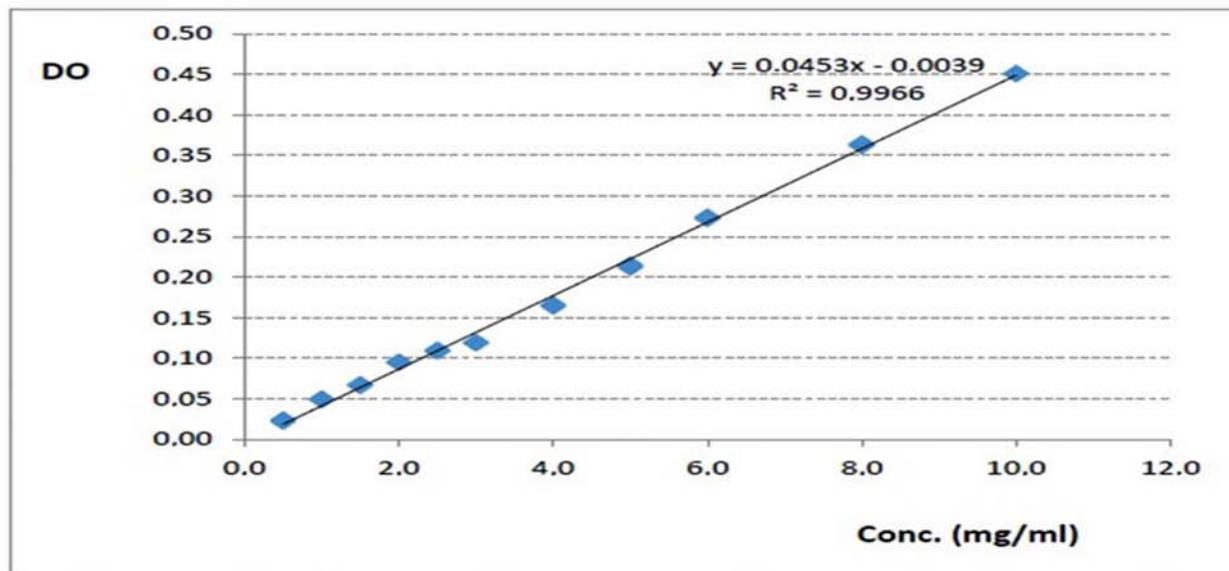


Figura 1. Curva patrón para la determinación del grado de hidrólisis mediante la técnica del Biuret.

Valoración con formaldehído para determinar el grado de hidrólisis

Los aminoácidos reaccionan con formaldehído, al liberar un hidrógeno del grupo amino, que se valora con hidróxido de sodio. Ello permite detectar aminoácidos libres; sin embargo, como se ha señalado, los grupos de la histidina no reaccionan y los de la prolina e hidroxiprolina reaccionan solo el 75 %; por lo tanto, hidrolizados con estos aminoácidos deben ser evaluados por otras técnicas.

Este método es muy útil por su simplicidad, por lo que su evaluación para este caso es particularmente interesante. En el caso de la hidrólisis de levadura, la histidina y prolina representan, según determinaciones analíticas, menos del 1.2 % del total de aminoácidos, tal como se ilustra en la figura 2.

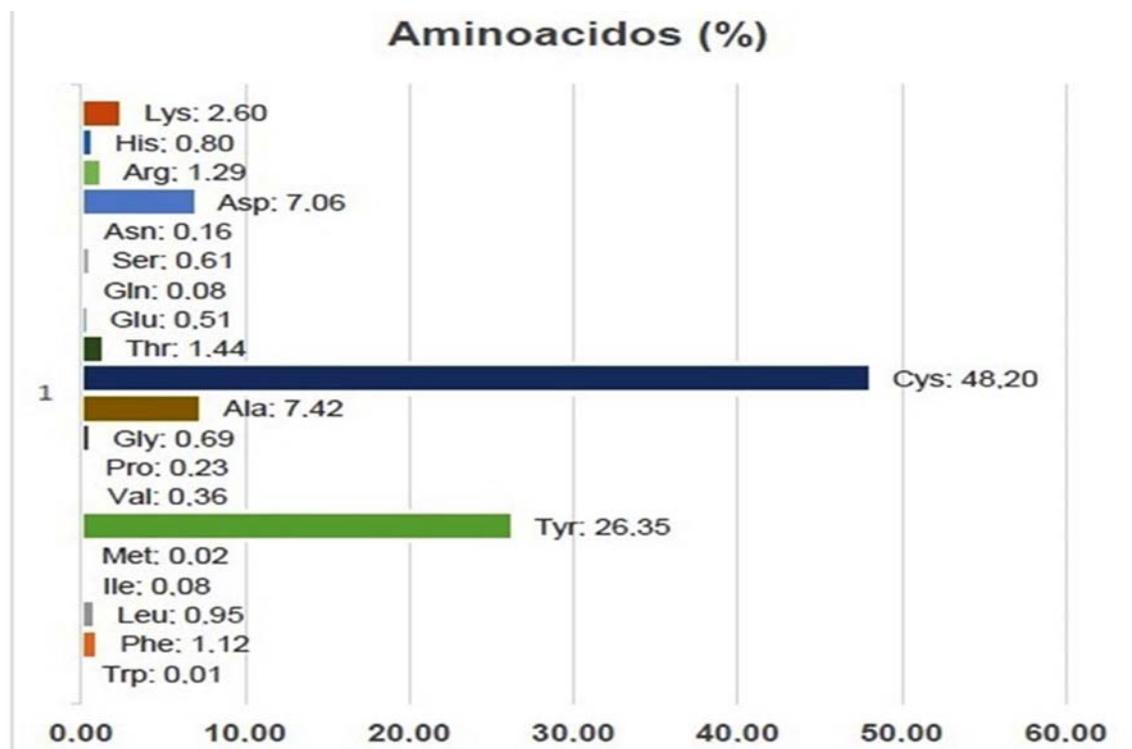


Figura 2. Perfil de aminoácidos durante la hidrólisis ácida de la levadura *Candida utilis*.

Villar (14) desarrolló una modificación del método de Sørensen de valoración con formaldehído para la determinación del grado de hidrólisis, en este caso particular. Esta modificación se sustenta en el hecho de que, al desarrollarse la hidrólisis de la levadura en un medio con 20-22 % de materia seca, la relación entre fase soluble: fase insoluble alcanza valores cercanos a la unidad, por lo que sugiere determinar la masa exacta de dichas fracciones, pues los resultados directos se refieren a la fase soluble y el resultado final debe ser referido a toda la muestra. Por tal motivo, para expresar los resultados, requiere precisar las masas de ambas fases, sus contenidos de humedad y la densidad del hidrolizado, lo que torna el procedimiento muy complejo. Esta consideración resulta más importante en la formulación actual de FITOMAS-EC, en la que el contenido de materia seca alcanza el 50 % (15).

El procedimiento aplicado aquí sigue la metodología descrita por Navarrete *et al.* (1) con ciertas particularidades en la preparación de la muestra, con vistas a simplificar el proceso analítico.

Ante todo, se debe tomar una muestra de levadura empleada en la hidrólisis y determinar su contenido de proteína (Mp) por el método de Kjeldahl.

El procedimiento propuesto es el siguiente:

1. Ajustar el pH de la solución de formaldehído a 8.1 con NaOH 10 M.
2. Agitar bien la muestra de hidrolizado y tomar una alícuota de aproximadamente 1 ml, (A) al igual que se procede para la utilización del método de Biuret y diluir en un volumétrico de 25 ml (D).
3. Centrifugar la muestra a 5000 rpm durante 10 min.
4. Tomar una muestra del sobrenadante y ajustar el pH a 8.1 con NaOH 0.25 N.
5. De ella tomar un volumen de 2.5 ml (V).
6. Adicionar a la muestra 1 ml de formaldehído neutralizado a pH 8.1.
7. Dejar la muestra en reposo por, al menos, 1 min. y valorar con NaOH 0.25 N hasta pH de 8.1.
8. Si la valoración consume más de 2.5 de NaOH 0.25N repita los pasos 6-7 con 1.5 ml de formaldehído.

Nota: Si se requiere n veces el volumen V para la determinación, entonces en los pasos 5-7 se emplearán n veces las cantidades indicadas en estos. Calcule el grado de hidrólisis como:

$$DH = B \cdot NB \cdot (1/\alpha) \cdot (1/Mp) \cdot (1/h_{tot}) \cdot 100$$

$$Mp = Cpm \cdot (A/D) \cdot V \text{ g de proteína en la muestra a valorar}$$

Donde *B* es el volumen de NaOH 0.25N consumido. *NB* es la normalidad de la base, $1/\alpha$ es el factor de corrección por temperatura (1.5 para 25 C° y pH 8), según tabla 3, h_{tot} en meq/g es la suma de milimoles de aminoácidos individuales por gramo de proteína; en este caso proteína de levadura *Candida utilis*, *Cpm* es la concentración de proteína en el hidrolizado (g/ml), *V* es el volumen de hidrolizado diluido a valorar en ml, *D* es el volumen de dilución en ml y *A* es la alícuota tomada en ml.

El valor de h_{tot} no aparece reportado en las tablas de la literatura, pero en diversas patentes consultadas, sobre la obtención de extractos de levaduras de varios tipos, se adopta el valor de $h_{tot}=7.8$, por lo que este valor ha sido el considerado en nuestras determinaciones.

Tabla 3. Factor de calibración $1/\alpha$ a varias temperaturas

Factor de calibración					
pH	Temperatura (pK para grupos de aminoácidos)				
	25°C	30°C	40°C	50°C	60°C
	(7.7)	(7.6)	(7.3)	(7.1)	(6.9)
6.5	-	-	-	5.00	3.50
7.0	-	5.00	3.00	2.27	1.79
7.5	2.59	2.27	1.63	1.40	1.25
8.0	1.50	1.40	1.20	1.13	1.08
8.5	1.16	1.13	1.06	1.04	1.03
9.0	1.05	1.04	1.02	1.01	1.01
9.5	1.02	1.01	1.01	1.00	1.00
10	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00
10.5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
11.0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

RESULTADOS

Ambos métodos han sido evaluados en muestras de hidrolizados de levadura. Sobre la base de una asunción de obtención de un grado de hidrólisis de un 70 %, a partir de la concentración de sólidos solubles alcanzada en estudios previos (16), se tomaron alícuotas de 0.9 ml de hidrolizados, los que son diluidos en 25 ml de solución, para lograr una concentración estimada de proteína hidrolizada en el entorno de 3 mg/ml.

En la tabla 4 se brindan los resultados obtenidos para diversas hidrólisis efectuadas en la planta de FITOMAS. Determinaciones previas indican que la levadura empleada posee como promedio un 45 % de proteína. Los resultados obtenidos por la aplicación del método de Biuret indican que se logra una concentración promedio de proteína soluble de 58.22 mg/ml o g/L para un grado de hidrólisis promedio estimado del 49.44 %

Tabla 4. Contenido de proteína soluble y grado de hidrólisis en la planta Fitomas (Método del Biuret)

Muestra	Mat. Seca Hidrolizado (%)	Prot inic. (Mp) (mg/ml)	Alícuota (A: ml)	Dilución (D: ml)	Lectura 550 nm	Conc. Curva (mg/ml)	Conc. Muestra (mg/ml)	GH (%)
19012	25.62	118.74	0.9	25	0.084	1.93	53.61	45.1
19013	25.42	117.81	0.9	25	0.111	2.53	70.28	59.7
19014	25.25	117.02	0.9	25	0.101	2.31	64.17	54.8
19015	25.39	117.67	0.9	25	0.097	2.22	61.67	52.4
19016	25.40	117.72	0.9	25	0.064	1.49	41.39	35.2
Promedio							58.22	49.4
Desv. St							11.15	9.55

En la tabla 5 se brindan los resultados de la determinación del grado de hidrólisis mediante valoración con formaldehído.

Tabla 5. Contenido de proteína soluble y grado de hidrólisis en la planta de Fitomas (Método de valoración con formaldehído)

Muestra	B (ml)	NB (meq/ml)	1/α	Conc. Prot. inic. (g/ml)	Alícuota (ml)	Dilución prot.(ml)	Vol muestra ensayo	Mp (g)	1/Mp	1/h _{tot}	GH (%)
19012	0.55	0.25	1.5	0.1187	1.5	25	10	0.07124	14.037	0.1282	37.117
19014	0.65	0.25	1.5	0.1178	1.5	25	10	0.07069	14.147	0.1282	44.210
19015	0.6	0.25	1.5	0.1170	1.5	25	10	0.07021	14.242	0.1282	41.084
19016	0.55	0.25	1.5	0.1177	1.5	25	10	0.07060	14.164	0.1282	37.453
Promedio											39.97
Desv. St											3.35

Se aprecia que existen ciertas diferencias referentes al grado de hidrólisis que reporta cada método, lo que se corresponde con resultados obtenidos por otros investigadores durante la comparación de métodos para la determinación del grado de hidrólisis, en la hidrólisis enzimática del suero de leche (11).

Estas diferencias son inherentes al tipo de determinación que reporta cada método (existencia de péptidos vs existencia de aminoácidos).

En la figura 3 se muestran los valores de grado de hidrólisis determinados por Villar (14), mediante la técnica de nitrógeno amínico por valoración con formaldehído. El valor medio de GH determinado por el autor de este artículo fue de 40.23±2.83; sin diferencias significativas, respecto al obtenido en el presente trabajo, para un 95 % de confianza, lo que induce a pensar que el proceder fue correcto, pero no explica las diferencias entre los dos métodos evaluados.

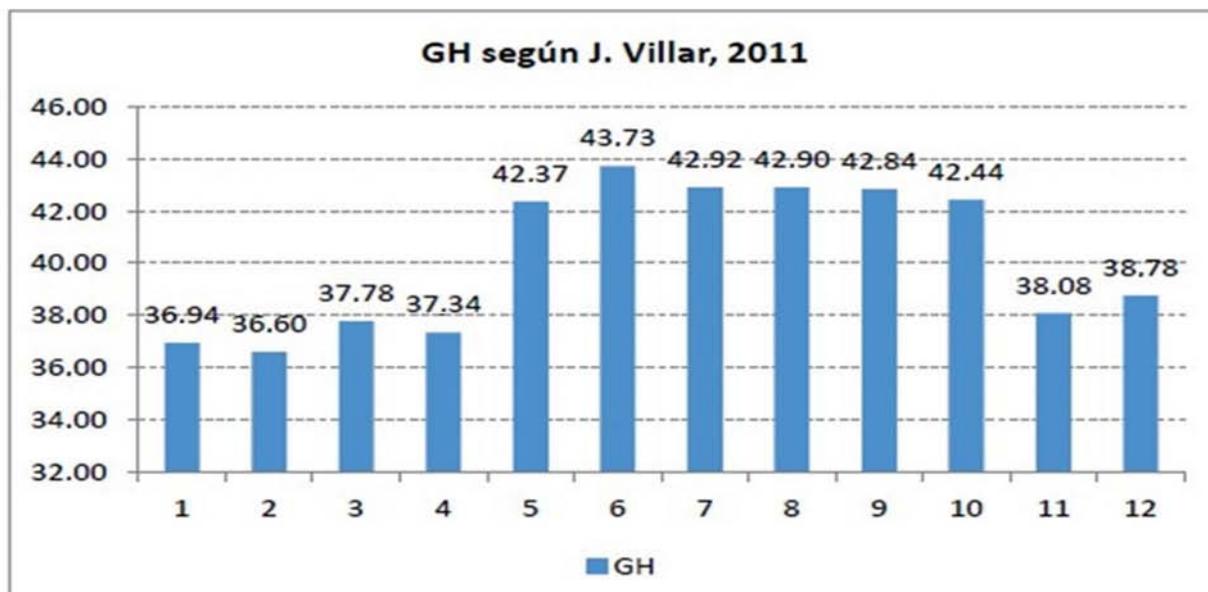


Figura 3. Determinaciones del grado de hidrólisis obtenidas por Villar (14).

CONCLUSIONES

Se demuestra que la técnica de Biuret evidencia un mayor grado de avance del proceso de hidrólisis ácida de la levadura, aunque la técnica de valoración con formaldehído brinda una información más precisa sobre la concentración de aminoácidos alcanzada y no existen diferencias significativas entre el método formulado y el desarrollado por Villar, por lo que se recomienda el método aquí desarrollado para el control de la calidad del proceso de hidrólisis, al ser más sencillo y rápido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Navarrete del Toro, Maria de los Angeles and García-Carreño, F.L., Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, México, "Evaluation of the Progress of ProteinHydrolysis" Unit B2.2. 2003, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142913.fac0202s10>.
2. Silvestre, M.P.C., Review of methods for the analysis. of protein hydrolysates, Food Chemisrry, Vol. 60, No. 2, pp. 263-271, 1997.
3. Adler-Niseen, Enzymic hydrolysis of Food protein, Elsevier Applied Science Publisher LTD, England, 1986.
4. Sørensen, P.L., Biochem Z., 7, 45, 407, 1907.
5. Morris-Quevedo, H.J., Almarales-Arceo, A., Romero-Viamonte, K. y Vidal-Colás, M., Validación de un método potenciométrico para la determinación de nitrógeno amínico en hidrolizados proteicos de microalgas, Revista Cubana de Farmacia, 8, 5, 1-5, 2002.
6. Friedman, M., Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences, J. Agric. Food Chem., 52, 385-406, 2004.
7. Adler-Niseen, J., Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates byTrinitrobenzenesulfonic Acid, J. Agrie. Food Chem., Vol. 27, No. 6, 1256-1262, 1979.
8. Nielsen, P.M., Petersen, D., and Dambmann, C., Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis, JOURNAL OF FOOD SCIENCE—Vol. 66, No. 5, 642-646, 2001.
9. Gornall AG, Bardawill CJ., David MM *et al*, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. BiolChem 177(2):751–766, 1949.
10. Janairo, G., Linley Sy, M, Leonisa Yap, Llanos-Lazaro, N. and Robles, J., Determination of the Sensitivity Range of Biuret Test for Undergraduate Biochemistry Experiments, e-Journal of Science & Technology (e-JST), (5), 6, 77-83, 2011.
11. Silvestre, M. P. C.; Morais, H. A.; Silva, V. D. M.; Silva, M. R., Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin, Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 38, n. 3, p. 278-290, 2013.
12. Morais, H. A., Silvestre, M. P. C., Silva, V. D. M.; Silva, M. R., Simoes e Silva, A.C. and Silveira, J.N., Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: Effect of enzyme type and reaction time, American Journal of Food Technology, [DOI:10.3923/ajft.2013](https://doi.org/10.3923/ajft.2013), 2013.
13. Bouhamed, S.B.H. and Kechaou, N., Kinetic study of sulphuric acid hydrolysis of protein feathers, Bioprocess Biosyst Eng., [DOI 10.1007/s00449-017-1737-7](https://doi.org/10.1007/s00449-017-1737-7), 2017.
14. Villar, J., Determinación de nitrógeno amínico en formulados de Fitomas E, Informe Interno, ICIDCA, 2011.
15. Manuel Díaz-de los Ríos, Tania García-Martínez, Marlen Lorenzo-Maiquez, Ivis Morales-Pérez, Mercedes Reynosa-Blanco y Sheila Quesada-Pestano, Estabilidad de fitoestimulantes foliares suplementados con urea como fuente de nitrógeno. Influencia de su concentración y del contenido de sólidos totales, ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar 52 (2) mayo-agosto, 2018.