

# Stanovení nukleových kyselin v krmném droždí vyrobeném z uhlovodíkových substrátů

MILADA ŠESTÁKOVÁ, Mikrobiologické odd. VÚKPS, Praha

663.14 : 543  
547.963.3

Přes nemalou úlohu, již mají nukleové kyseliny (NK) v metabolismu bílkovin a lipidů, se jen ojedíněle sleduje jejich produkce v kvasinkách kultivovaných na uhlovodíkových médiích [6, 11, 14]. Je to způsobeno — kromě zdoluhavých metod stanovení — i specifickými obtížemi stanovení, které způsobuje asimilovaný substrát a jeho metabolity, vyskytující se uvnitř a na povrchu buněk. Proti vhodnosti použití každé ze tří klasických metod [9, 10, 11] pro stanovení NK v kvasinkách lze vznést podobné námitky, jaké jsou pro jejich použití na biologický materiál přehledně shrnuty a zhodnoceny v referátech *Hutchisona* a *Munroa* [7] a *Markhama* [8]. Metodě *Schmidt-Thannhauserově* [10] a *Oguro-Rosenové* [9] lze vytknout neúplné, obtížné a nespolehlivé rozdělení frakcí RNK a DNK a zdoluhavost provedení. Metoda podle *Schneidera* [11] je pro mnoho autorů přitažlivá tím, že extrahuje obě NK současně a pak stanoví jednotlivé kyseliny barevnými reakcemi s více či méně specifickými činidly, nebo se stanoví celkové množství NK spektrofotometricky. Původní postup této metody byl mnohokrát modifikován a použit i pro stanovení NK v kvasinkách [12].

Cílem této práce bylo vypracovat spolehlivý pracovní postup pro stanovení NK v tak obtížně analyzovatelném materiálu, jakým jsou kvasinky kultivované na uhlovodíkových médiích. Vyzkoušela jsem několik modifikací *Schneiderovy* metody [5, 13], poskytující rychle poměrně reálné výsledky. Na základě těchto pokusů jsem vypracovala konečný postup.

## Navržený způsob stanovení nukleových kyselin

Pracovní postup spočívá v přípravě extraktu NK z kvasinek, v následném spektrofotometrickém stanovení celkového množství NK a v kolorimetrickém stanovení kyseliny ribonukleové (RNK) a kyseliny deoxyribonukleové (DNK).

### Příprava extraktu NK

#### Princip metody

Z kvasničné hmoty se nejdříve odstraní interferující látky: lipidy extrakcí organickými rozpouštědly a látky rozpustné v kyselém prostředí (např. nuk-

leosidy, fosforečnany) extrakcí zředěnou kyselinou chloristou za studena. Obě NK se pak extrahují současně horkou kyselinou chloristou.

#### Chemická činidla

1. aceton, p. a.,
2. 96% etanol, čistý,
3. éter, farmaceutický,
4. směs etanol : éter (3 : 1),
5. směs metanol, p. a. : chloroform, p. a. (3 : 1),
6. 0,25 N kyselina chloristá, p. a.,
7. 0,50 N kyselina chloristá, p. a.

#### Pomůcky

1. centrifugační skleněné zkumavky na 10 ml,
2. vodní lázeň teploty 0, 70 a 90 °C,
3. stojánek na zkumavky do vodní lázně,
4. skleněné tyčinky,  $\varnothing = 3$  mm,  $d = 150$  mm,
5. stolní laboratorní odstředivka [s výhodou zn. Chirana na 8 zkumavek],
6. odměrné baňky obsahu 25 ml a 50 ml.

#### Postup práce

Do centrifugační zkumavky se naváží přesně 100 až 150 g sušiny kvasinek a po přidání 5 ml acetonu a promíchání tyčinkou se kvasinky odstřeďují 10 minut při 3000 ot/min. Supernatant se vyřadí. Ke zbytku ve zkumavce se přidá 5 ml 96% alkoholu, suspenze kvasinek se rozmíchá a odstřeďuje se 5 minut při 3000 ot/min. Všechna další odstředění se provedou stejným způsobem. Po odlití roztoku se do zkumavky přidají 3 ml směsi etanol : éter (3 : 1) a po zamíchání roztoku tyčinkou se směs vaří 3 minuty při 70 °C ve vodní lázni. Po odstředění a vyřazení supernatantu se zbytek ve zkumavce stejným způsobem extrahuje směsí metanol : chloroform (3 : 1) a potom etanol : éter (3 : 1). Nakonec se zbytek ve zkumavce extrahuje 5 ml éteru za chladu a zkumavka se potom odstředí a extrakt se opět vyřadí. Po vychlazení zkumavky (v ledové lázni) se sediment dvakrát extrahuje 5 ml 0,25 N  $\text{HClO}_4$  po dobu 20 minut při teplotě 0 až 4 °C, za občasného míchání tyčinkou. Po vychlazení pláště odstřeďovacích kyvet na 0 °C se obsah zkumavky odstředí a extrakty se vyřadí. K sedimentu ve zkumavce se přidá 5 ml 0,5 N  $\text{HClO}_4$  a kvasinky se extrahují za



občasného míchání na vodní lázni teploty 90 °C po dobu 20 minut. Po odstředění se supernatant převede do 50 ml odměrné baňky a kvasinky se znovu extrahují 5 ml 0,5 N HClO<sub>4</sub> po dobu 20 minut. Po odstředění se extrakt opět kvantitativně převede do odměrné baňky a spojené extrakty se po vytemperování při 20 °C doplní 0,5 N HClO<sub>4</sub> po značku (roztok I). Z tohoto roztoku se odpipetuje 5 ml do 25 ml odměrné baňky a doplní se po značku 0,5 N NClO<sub>4</sub> (roztok II). Roztok I se použije pro stanovení DNK, roztok II pro stanovení celkového množství NK spektrofotometricky a pro stanovení RNK.

#### Spektrofotometrické stanovení NK

Metoda je založena na postupu podle *Spirina* [13] a pro výpočet NK je použito jím navrženého vzorce.

#### Princip metody

V čistém extraktu NK (viz roztok II) se zjistí absorbance při dvou vlnových délkách a podle uvedeného vzorce se vypočte obsah NK v analyzovaném vzorku.

#### Chemická činidla

1. extrakt NK (roztok II),
2. 0,5 N kyselina chloristá.

#### Pomůcky

1. univerzální spektrofotometr VSU—1 (firma Karl Zeiss, Jena, NDR),
2. kyvety z křemenného skla tloušťky vrstvy  $d = 10$  mm.

#### Postup práce

Při vlnových délkách 270 a 290 nm změří velikost absorbancí roztoku II v křemenných kyvetách proti roztoku 0,5 N HClO<sub>4</sub>.

#### Výpočet celkového obsahu NK

Procentický obsah NK v sušině kvasinek se vypočítá podle vzorce

$$\text{NK} [\% \text{ suš. kvas.}] = \frac{1355 \cdot A}{n}$$

kde  $n$  je navážka sušených kvasinek vyjádřená v mg,  $A = A_{270} - A_{290}$  — rozdíl absorbancí roztoku II, zjištěných při vlnových délkách 270 a 290 nm.

#### Kolorimetrické metody RNK a DNK

#### Princip metod

V extraktech NK (viz roztok I a II) se stanoví obsah DNK na základě reakce s difenylaminem podle *Burtona* [2] a obsah RNK na základě reakce s orcinem podle *Ceriotiho* [3]. Absorbance barevných roztoků se měří při vlnových délkách 595 nm pro DNK (filtr S<sub>59</sub>) a 675 nm pro RNK (filtr S<sub>66</sub>). Z kalibračních křivek, sestavených za použití stan-

dardních preparátů RNK a DNK, se zjistí obsah příslušné kyseliny v  $\mu\text{g/ml}$  měřeného roztoku.

#### A. Stanovení RNK

##### Chemická činidla

1. chlorid měďnatý (CuCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, p. a.),
2. kyselina chlorovodíková konc., p. a. ( $h = 1,19$ ),
3. orcin (fa Merck, Darmstadt NSR),
4. standardní preparát kvasničné RNK,
5. roztoky hydrolyzované kvasničné RNK v 0,5 N HClO<sub>4</sub> (90 °C, 20 minut), v rozmezí koncentrací 5 až 50  $\mu\text{g}$  RNK/ml,
6. roztok 0,004 M CuCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O v konc. HCl,
7. orcinové činidlo: 200 mg orcinu se rozpustí v konc. HCl; k tomu se přidá 10 ml roztoku 0,004 M CuCl<sub>2</sub> a roztok se doplní konc. HCl na 100 ml. Činidlo se uchovává ve tmě a za chladu. Lze skladovat asi 2 týdny.
8. extrakt NK (roztok II),
9. 0,50 N kyselina chloristá.

#### Pomůcky

1. vodní lázeň teploty 100 °C,
2. skleněné zkumavky  $\varnothing = 15$  mm,  $d = 170$  mm, se skleněnou zátkou s vodním chladičem,
3. Pulfrichův kolorimetr, filtr S<sub>66</sub>,
4. skleněné kyvety tloušťky vrstvy  $d = 10$  mm.

#### Postup práce

5 ml roztoku II se ve zkumavce silně protřepe s 5 ml orcinového činidla. Zkumavka zakrytá skleněnou chladičí zátkou se ponoří do vroucí lázně na dobu 40 minut a potom do chladičí lázně teploty 0 až 4 °C na 30 minut. Vychlazený roztok se nechá stát ve tmě při laboratorní teplotě asi 20 až 24 hodiny. Roztok se potom přelije do centrifugační zkumavky a odstředí se 10 minut při 3000 ot/min. Čirý roztok se odlije do jiné zkumavky, po vytemperování se změří jeho absorbance za použití filtru S<sub>66</sub> na Pulfrichově kolorimetru v kyvetách tloušťky 10 mm. Měří se proti blanku připravenému s 0,5 N HClO<sub>4</sub> stejným způsobem.

*Poznámka:* Zelená barva roztoku, charakteristická pro reakci RNK s orcinem, je stálá i po 48 hodinách stání roztoku od doby reakce.

#### Výpočet obsahu RNK ve vzorku

Z kalibrační křivky pro RNK se odečte obsah RNK v  $\mu\text{g/ml}$  roztoku II. Procentický obsah RNK v kvasničné sušině se vypočítá podle vzorce

$$\text{RNK} [\% \text{ v suš. kvas.}] = \frac{a \cdot 25\,000}{n}$$

kde  $a$  je obsah RNK vyjádřený v  $\mu\text{g/ml}$  měřeného roztoku II. odečtený z kalibrační křivky,  
 $n$  — navážka vzorku [ $\mu\text{g}$ ].



## B. Stanovení DNK

## Chemická činidla

1. ledová kyselina octová, p. a.,
2. kyselina sírová, konc., p. a.,
3. acetaldehyd, čistý, čerstvě předestilovaný při 21 °C,
4. difenylamin, rekrystalovaný,
5. standardní preparát DNK (z telecího brzlíku),
6. roztoky hydrolyzované DNK v 0,5 N HClO<sub>4</sub> (90 °C, 2 X 20 minut) v rozmezí koncentrací 5 až 50 µg DNK/ml,
7. vodný roztok acetaldehydu: do 50 ml odměrné baňky s trochou destilované vody se odpipetuje 0,1 ml čerstvě předestilovaného acetaldehydu a doplní se destilovanou vodou po značku. Baňka se uzavře zátkou. Roztok se připravuje vždy těsně před použitím,
8. difenylaminové činidlo: 1,5 g difenylaminu se rozpustí ve 100 ml ledové kyseliny octové s 1,5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Činidlo se uchovává ve tmě a za chladu. Je stabilní asi 2 týdny. V den, kdy má být činidlo použito, přidá se k 20 ml činidla 0,1 ml vodného roztoku acetaldehydu (16 mg/ml),
9. extrakt NK (roztok I),
10. roztok 0,5 N HClO<sub>4</sub>.

## Pomůcky

1. zkušavky, Ø = 15 mm, d = 170 mm, se skleněnou chladicí zátkou,
2. termostat s teplotou 30 °C,
3. Pulfrichův kolorimetr, filtr S<sub>59</sub>,
4. skleněné kyvety tloušťky vrstvy d = 10 mm.

## Postup práce

Ke 2 ml roztoku I se do zkušavky přidají 4 ml difenylaminového činidla. Po důkladném protřepání se zkušavka, uzavřená zátkou, umístí na 20 hodin do termostatu s teplotou 30 °C. Vzniklé modré zbarvení se po vytemperování vzorku při 20 °C měří v kyvetách tloušťky 10 mm na Pulfrichově kolorimetru s filtrem S<sub>59</sub>. Měří se proti blanku, připravenému stejným způsobem s 0,5 N HClO<sub>4</sub>. Vzniklé zbarvení je stále nejméně po dobu 24 hodin.

## Výpočet obsahu DNK ve vzorku

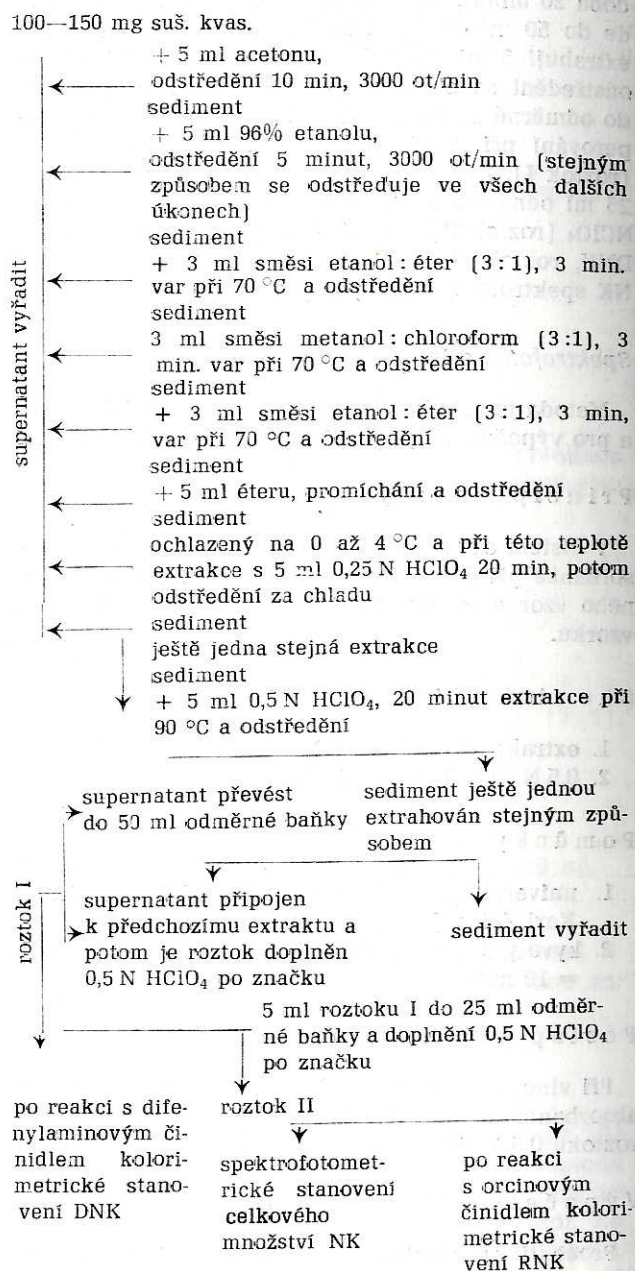
Z kalibrační křivky pro DNK se odečte obsah DNK v µg/ml roztoku I. Procentický obsah DNK kvasničné sušiny se vypočítá podle vzorce

$$\text{DNK [\% v suš. kvas.]} = \frac{b \cdot 5000}{n}$$

kde *b* je odečtený obsah DNK roztoku I, vyjádřený v µg/ml,

*n* — navážka vzorku v µg.

## Schéma stanovení nukleových kyselin



## Experimentální část

## Vypracování způsobu čištění kvasinek z uhlovodíkových substrátů pro extrakci NK

Vycházela jsem z metody podle Ogura a Rosenové [9], kteří před vlastní extrakcí NK extrahují postupně anorganické a organické fosforečnany, lipidy, nukleosidy a nukleotidy. Jejich postup jsem hned na začátku rozšířila o předřazené odstřeďování směsi suchých kvasinek nebo jejich vodné suspenze s pětinasobným množstvím acetonu (*v/v*) a extrakci lipidů jsem upravila na trojnásobnou extrakci kvasinek vařícími směsmi rozpouštědel (etanol-éter), metanol-chloroform, etanol-éter) a závěrečnou extrakci éterem za chladu. Dokonalost očištění kvasinek od lipidů jsem sledovala chromato-



grafií extraktů na tenké vrstvě se silikagelem G, při 30minutovém vzestupném vyvíjení v soustavě petroléter: éter: kyselina octová = 90:10:1 a de-tekci postříkem 50%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a zahřátím na 180 °C.

Původní postup, který poskytl maximálně dosažitelné očištění kvasinek, byl tento:

**Úprava vzorku:** 100 mg suchých kvasinek nebo jejich vodná suspenze se promíchá s 3násobným až 5násobným množstvím acetonu (v/v) a odstřeďuje se 10 minut při 3000 ot/min. Supernatant se vyřadí; sediment se při 0 až 4 °C promíchá s 5 ml 96% etanolu a odstřeďuje se 5 minut při 3000 ot/min. Supernatant se vyřadí.

**Extrakce anorganických a organických fosforečnanů:** Sediment se při teplotě 0 až 4 °C dvakrát extrahuje 5 ml 70% etanolu s 0,1%  $\text{HClO}_4$  a potom jednou s 5 ml 70% etanolu. Tyto a všechny další extrakce jsou následovány centrifugací 5 minut při 3000 ot/min s vyřazením supernatantů.

**Extrakce lipidů:** Sediment se postupně extrahuje: 3 ml směsi etanol: éter (3:1), 3 minuty při 70 °C, 3 ml směsi metanol: chloroform (3:1), 3 minuty při 70 °C, 3 ml směsi etanol: éter (3:1), 3 minuty při 70 °C, 5 ml éteru při laboratorní teplotě.

**Extrakce nukleotidů a nukleosidů (při 0 až 5 °C):** sediment se extrahuje 20 minut 5 ml 0,2 N kyseliny chloristé; postup s centrifugací se ještě jednou opakuje. Pro kontrolní stanovení obsahu nukleosidů a nukleotidů se extrakty spojí a po doplnění 0,2 N  $\text{HClO}_4$  25 ml se v křemenných kyvetách, tloušťky 10 mm, měří absorbance při vlnové délce 270 a 290 nm na univerzálním spektrofotometru VSU—1 [K. Zeiss, Jena].

Příklad pokusných výsledků je tabulce 1.

Tabulka 1

Celkový obsah NK, nukleosidů a nukleotidů v sušině sušeného krmného droždí získaného kultivací kvasinky *Candida lipolytica*, kmen 4—1, na různých naftových substrátech. Extrakce NK 0,5 N  $\text{HClO}_4$  dvakrát 20 minut při 90 °C. Spektrofotometrické stanovení metodou rozdílů 2 absorbancí. Průměry se 2 až 3 stanovení

Číslo vzorku	Nukleové kyseliny	Nukleotidy a nukleosidy
	% v kvasničné sušině	
1	1,82	0,16
2	1,76	0,12
3	3,28	0,09
4	2,71	0,08
5	1,86	0,08

Nukleosidy a nukleotidy v sušených vzorcích krmného droždí tvořily nikdy více než 10 % celkového obsahu NK. Absorpční spektra všech extrak-

tů v rozmezí 220 až 340 nm byla rovněž změřena na registračním spektrofotometru Beckman DB. Vzhledem k tomu, že tvar absorpčních spekter v rozmezí vlnových délek 220 až 340 nm nebyl zcela charakteristický pro přítomnost nukleosidů a nukleotidů (zřejmě znečištění interferujícími látkami), jsou tyto údaje jen přibližné.

Další úpravou jsem popsaný zdlouhavý čistící postup zkrátila: Látky rozpustné v kyselém vodném prostředí se extrahují současně dvojnásobnou 20minutovou extrakcí při 0 až 5 °C, při zvýšení koncentrace kyseliny chloristé na 0,25 N. Extrakce 70% etanolem s 0,1 % kyseliny chloristé a čistým 70% etanolem byly vypuštěny. Oba čistící postupy (původní a zkrácený) jsem srovnala na 10 vzorcích krmného droždí. Obsah NK byl stanoven vypracovanou spektrofotometrickou metodou, popsanou v části B. Výsledky jsou v tabulce 2.

Rozdíl mezi čistícími postupy nepřesahoval 10 %, tedy velikost chyby paralelního stanovení. Při všech dalších stanoveních NK jsem používala zkrácený čistící postup.

Tabulka 2

Obsah NK v krmném droždí z uhlovodíkových substrátů stanovený za použití původního a zkráceného čistícího postupu. Extrakce NK 0,5 N  $\text{HClO}_4$  dvakrát 20 minut při 90 °C. Spektrofotometrické stanovení metodou rozdílů dvou absorbancí. Průměry ze dvou stanovení

Číslo	% NK v kvasničné sušině		Rozdíl výsledků [% na hod. pův. post.]
	původní čistící postup	zkrácený čistící postup	
1	1,47	1,61	— 9,6
2	3,41	3,45	— 1,2
3	3,33	3,36	— 0,9
4	3,03	3,04	— 0,3
5	1,80	1,77	1,7
6	1,88	1,83	2,7
7	3,20	3,07	4,1
8	3,87	3,70	4,4
9	4,25	4,00	5,9
10	3,73	3,36	9,9

#### Extrakce nukleových kyselin

Při hledání optimální extrakce NK jsem vyšla z metody Spirina [13], který používá 20minutovou hydrolýzu 0,5 N kyselinou chloristou na vroucí vodní lázni. Metoda byla navržena jako vhodná pro rychlé sériové stanovení NK a vyzkoušena i pro droždí. Nízká koncentrace kyseliny chloristé snižuje možnost štěpení např. bílkovin a extrakce jejich degradačních produktů. Hydrolýza při 100 °C je však příliš drastická a kromě nízké koncentrace kyseliny chloristé je tedy prospěšné zvolit nižší extrakční teplotu; obvykle se doporučuje 70 a 90 °C [7]. Při hledání nejvhodnějšího postupu pro sušené droždí z uhlovodíkových substrátů jsem vyzkoušela extrakce NK 0,5 N  $\text{HClO}_4$  při teplotách 100, 90, 80 a 70 °C.



a počet potřebných opakování extrakcí vzorků pro optimální extrakci NK. Extrakce byla sledována jednak stanovením absorpčních spekter extraktů v rozmezí vlnových délek 220 až 340 nm a jednak výpočtem obsahu NK [viz dále]. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Vliv extrakční teploty a počtu opakování extrakcí na výsledky stanovení NK v krmném droždí vyrobeném z uhlovodíků naftových frakcí. Spektrofotometrická metoda stanovení NK. Průměrné hodnoty ze 2 až 4 stanovení [% NK v sušině kvas.]

Teplota extrakce [°C]	Počet opakování extrakcí vzorku 0,5 N HClO <sub>4</sub> po dobu 20 minut				
	1	2	3	4	5
100	—	3,04	—	—	—
90	3,20	3,30	3,30	—	—
80	—	2,84	—	—	—
70	—	2,71	3,10	3,30	3,32

Z tabulky vyplývá, že při 100 °C nastává buď hlubší štěpení NK, nebo mají větší vliv interferující látky, neboť i absorpční křivky extraktů vykázaly přítomnost většího množství nečistot. Optimální je dvojnásobná extrakce při 90 °C, jež nejrychleji poskytuje prakticky maximálně extrahovatelné množství NK. Spektrální absorpční křivky získané při 90, 80 a 70 °C neprokázaly význačných rozdílů mezi extrakty.

#### Spektrofotometrická metoda stanovení celkového obsahu NK v extraktech

Pro ověření přesnosti metody byly vzaty přesné navážky standardních preparátů RNK (Yeasts RNK, fa Sigma, St. Louis, USA) a DNK (Calf thymus DNK, fa Calbiochem, Los Angeles, Cal. USA) a po 20minutové hydrolýze při 90 °C v 0,5 N HClO<sub>4</sub> byly změřeny jejich absorpční křivky v rozmezí 220 až 340 nm a absorbance při vlnových délkách 270 a 290 nm. Stanovený obsah NK je porovnán s navázkou vzorku v tabulce 4.

Přesnost stanovení RNK se pohybovala v rozmezí 95,5 až 100 % a stanovení DNK od 87,4 do 93,8 %. Na základě uvedených výsledků by bylo možno tuto metodu doporučit pro stanovení celkového množství NK v kvasinkách, kde je obvyklý poměr RNK : DNK (10 : 1) příznivý pro přesný výpočet NK. Pro ověření metody na řadě vzorků krmného droždí z naftových substrátů v laboratorním i poloprodučním měřítku byly získány reprodukovatelné výsledky; rozdíl dvou paralelních stanovení nepřesahoval 5 %. Potvrdila se nespolehlivost spektrofotometrických metod, které používají k výpočtu NK hodnoty absorbancí extraktů získané měřením pouze při jedné vlnové délce v ultrafialové oblasti spektra [1]. I když byly jednotlivé absorbance paralelních vzorků často odlišné, byly rozdíly absorbancí při 270 a 290 nm shodné.

#### Kolorimetrické metody pro stanovení RNK a DNK

V těchto extraktech NK, které byly proměřeny spektrofotometricky, byly kolorimetricky stanoveny jednotlivě obě kyseliny. Kalibrační křivky pro RNK i DNK v rozmezích koncentrací 5 až 50 µg/ml měly tvar přímky procházející počátkem. Vzhledem k nízkému obsahu DNK v kvasinkách jsem chtěla použít citlivější modifikaci podle Gilese a Myerse [4]. Při použití této modifikace jsem však pozorovala tvorbu bílé sraženiny po přidavku difenylaminového činidla k extraktům s 0,5 N HClO<sub>4</sub> (podle autorů je dostatečná koncentrace HClO<sub>4</sub> 10 %). Na rozdíl od spolehlivého stanovení DNK standardní difenylaminovou metodou se při stanovení RNK s orcinovým činidlem vyskytly obtíže: Roztok se zbarvuje zeleno-hnědě místo zeleně a po jeho ochlazení vypadává hnědočerná sraženina, dobře rozpustná v izoamylalkoholu za vzniku intenzivně fialového zbarvení. Sraženina zvyšuje absorbanci vzorku a způsobuje tak chybné vypočtení obsahu RNK, vyššího než ve skutečnosti. Proto bylo do metodiky zařazeno důkladné ochlazení vzorku v ledové lázni (30 minut) s následujícím 20hodinovým stáním při laboratorní teplotě a odstředění sraženiny 10 minut při 3000 ot v min. Zkoušela jsem stanovit obsah RNK i v extraktech získaných čtyřnásobnou extrakcí při 70 °C, přičemž se sice tvořilo méně sraženiny, avšak ani v tomto případě nebylo snížení podstatné. V kvasinkách kultivovaných na glukóze nebyla sraženina pozorována a rovněž v roztocích standardních preparátů RNK k této interferenci nedocházelo. Průběh vypadávání sraženiny jsem sledovala v několika extraktech různých vzorků kolorimetrickým měřením obsahu RNK při odstředění sraženiny ihned po reakci s orcinem a po 20hodinovém a 40hodinovém stání vzorků ve tmě.

Tabulka 4

Přesnost spektrofotometrického stanovení NK na standardních preparátech kvasničné RNK a DNK z telecího brzlíku

Standard	Navážky [µg/ml]	Nalezeno NK		Chyba stanovení [%]
		[µg/ml]	%	
RNK	10	10,0	100,0	0,0
	20	19,1	95,9	4,1
	25	23,8	95,7	4,3
	30	28,7	96,0	4,0
	40	38,1	95,5	4,5
DNK	5	4,67	93,8	6,2
	10	9,10	91,0	9,0
	15	13,30	88,9	11,1
	20	17,60	88,2	11,8
	30	26,20	87,4	12,6



Na základě výsledků uvedených v tabulce 5 doporučuji pro získání správných hodnot 20hodinové stání roztoku po proběhnutí orcinové reakce a odstředění sraženiny před kolorimetrickým měřením.

Tabulka 5

Vliv stání barevných roztoků RNK na vylučování interferujících látek v extraktech z krmného droždí z naftových médií

Vzorky droždí z různých naftových médií	% RNK v kvasn. sušině		
	ihned po reakci	po 20hodinovém stání	po 40hodinovém stání
1	2,67	2,58	2,53
2	2,36	2,09	2,09
3	2,41	2,10	2,11
4	1,78	1,63	1,65
5	4,12	4,06	4,07

### Srovnání spektrofotometrického a kolorimetrického stanovení NK

Spektrofotometrické stanovení NK a kolorimetrické stanovení RNK a DNK byly proměřeny na řadě vzorků sušeného krmného droždí i čerstvě odseparovaných kvasinek *Candida lipolytica* z kultivačních médií s různými naftovými frakcemi. Ve všech případech byly spektrofotometrickou metodou získány vyšší hodnoty, než byl součet RNK a DNK, určených metodami kolorimetrickými. Důvodem tohoto rozdílu je zřejmě přítomnost látek absorbujících v ultrafialové oblasti záření, jejichž interferenci při spektrofotometrickém stanovení nelze zcela vyloučit ani metodou rozdílu absorbancí. Hodnoty celkového obsahu NK stanovené spektrofotometrickou metodou a metodami kolorimetrickými však byly

Tabulka 6

Obsah celkových množství NK, RNK a DNK určených spektrofotometrickou a kolorimetrickou metodou v krmném droždí z uhlovodíkových substrátů. Hodnoty jsou průměry dvou až čtyř paralelních stanovení

Stručná charakteristika asimilovaného substrátu		NK % v kvas. suš.		RNK [% v kv. suš.]	DNK [% v kv. suš.]
		spektrofotom.	kolorimetr.		
Čistá směs parafinů	1	2,84	2,49	1,97	0,52
	2	4,34	3,74	3,25	0,49
Parafinický gáč	1	6,10	5,29	4,68	0,61
	2	6,83	4,78	4,12	0,66
	3	5,91	3,80	3,32	0,48
	4	5,59	4,56	4,11	0,45
Různé destilační frakce nafty [tzv. plynové oleje]	1	4,73	4,36	3,90	0,46
	2	5,13	4,87	4,30	0,57
	3	3,97	3,16	2,67	0,49
	4	3,14	2,98	2,36	0,62
	5	3,66	3,00	2,41	0,59
	6	2,34	2,33	1,78	0,55

při průběžném sledování u dané kultivace navzájem úměrné, což dokazuje vhodnost spektrofotometrické metody pro sledování relativních hodnot NK v kvasinkách. Za správné absolutní hodnoty je možné považovat množství NK, RNK, DNK stanovená kolorimetrickými metodami. Výsledky některých vzorků droždí z kvasinky *C. lipolytica*, kmen 4—1, ukazuje tabulka 6.

Obsah DNK je u všech vzorků prakticky stejný, v rozmezí 0,45 až 0,66 % DNK v kvasničné sušině. Obsah RNK se pohybuje od 1,78 do 4,68 % v kvas. sušině. Absolutní hodnoty celkového obsahu NK (stanovené jako součet RNK a DNK) se pohybovaly u uvedených vzorků od 2,33 do 5,29 % na kvasničnou sušinu.

### Souhrn

Jsou popsány dva způsoby stanovení NK v krmném droždí získaném kultivací kvasinek *C. lipolytica* na různých uhlovodíkových substrátech v minerálním médiu.

Byl vypracován optimální postup čištění analyzovaných vzorků kvasinek (založený na modifikaci postupu podle Ogura a Rosenové) a rychlé extrakce NK, založený na modifikaci Schneiderovy metody. V roztocích získaných extrakcí 0,5N HClO<sub>4</sub> při 90 °C se stanovuje celkový obsah NK a odděleně množství RNK a DNK. Výpočet celkového množství NK je založen na spektrofotometrickém stanovení rozdílu absorbancí [při 270 a 290 nm], při použití vzorce podle Spirina. Kolorimetrické stanovení RNK je založeno na barevné reakci s orcinem v modifikaci podle Ceriottiho a DNK na barevné reakci s difenylaminem podle Burtona.

Metody byly zhodnoceny na standardech a desítkách vzorků krmného droždí z naftových substrátů. Všechny metody poskytují u paralelních vzorků reprodukovatelné výsledky při přesnosti 5 %. Stanovení RNK ruší tvorba hnědočerné sraženiny při reakci s orsinem, jež je nutno nechat kvantitativně vyloučit stáním a před kolorimetrickým měřením roztoku sraženinu odstranit odstředěním. Obsahy NK určené spektrofotometrickou metodou nelze považovat ve všech případech za absolutní hodnoty, neboť byly často vyšší než součet NK určený metodami kolorimetrickými, což je možné vysvětlit přítomností interferujících látek specificky absorbujících v ultrafialové oblasti.

Spektrofotometrické metody je výhodné použít ke kontrolnímu měření a ke sledování relativních změn obsahu NK v kvasinkách; kolorimetrických metod k přesnému stanovení NK a zastoupení jednotlivých kyselin.

Lektoroval Jan Káš

### Literatura

- [1] ARPAL, J., LONGAUEROVÁ, D., LEŠKOVÁ, Z., TOMIŠOVÁ, J.: Kvas. prům., 12, 1966 : 10.
- [2] BURTON, K.: Biochem. J., 62, 1956 : 315.
- [3] CERIOTTI, G.: J. Biol. Chem., 214, 1955 : 59.
- [4] GILES, K. W., MYERS, A.: Nature, 206, 1965 : 93.
- [5] HAROLD, E. M., ZIPORIN, Z. Z.: Biochim. Biophys. Acta, 28, 1958 : 482.
- [6] HUMPHREY, A.: Chem. Canada, 20, 1968 : 28.
- [7] HUTCHISON, W. C., MUNRO, H. N.: Analyst, 86, 1961 : 768.

- [8] MARKHAM, R.: in PAECH, K., TRACEY, M. V. (ed.): *Modern Methods of Plant Analysis*. Vol. IV 1955: 246.
- [9] OGUR, M., ROSEN, G.: *Arch. Biochem.*, **25**, 1950: 262.
- [10] SCHMIDT, G., THANNHAUSER, S. J.: *J. Biol. Chem.*, **161**, 1945: 83.
- [11] SCHNEIDER, W. C.: *J. Biol. Chem.*, **161**, 1945: 293.
- [12] SOKUROVA, E. N.: *Biochimija* **32**, 1967: 1134.
- [13] SPIRIN, A. S.: *Biochimija*, **23**, 1958: 658.
- [14] TAKEDA, I.: *Chem. Ind. Ltd.: Growth Yeast Cells with High Ribonucleic Acid Content*, *Neth. Appl.* 6 612 422 (Cl. C. 12 d), 3. III. 1967, *Japan Appl.* 2. XI. 1935 — cit. podle CA: 67, 13465.

#### DETERMINATION OF NUCLEIC ACIDS IN FODDER YEAST GROWN ON HYDROCARBON SUBSTRATES

The article deals with two methods which can be applied for the determination of nucleic acids in fodder yeast grown on hydrocarbon substrates. The strain used for experiments was *C. lipolytica* grown in a mineral medium. The spectrographic method can be recommended for routine inspection, as well as for following relative changes in the percentage of nucleic acids in yeast, whereas colorimetric methods should be used for accurate analyses and identification of various acids present in the yeast.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КОРМОВЫХ ДРОЖЖАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ УГЛЕВОДОРОДНЫХ СУБСТРАТОВ

В статье сравниваются два метода определения нуклеиновых кислот в кормовых дрожжах, полученных размножением дрожжей *C. lipolytica* в разных углеводородных субстратах и минеральной среде. Спектрографический метод можно рекомендовать для контрольных измерений и для наблюдения за изменениями содержания нуклеиновых кислот в дрожжах вообще, в то время как колориметрический метод может служить для более точного определения содержания нуклеиновых кислот и для их идентификации.

#### BESTIMMUNG DER NUKLEINSÄUREN IN DER FUTTERHEFE, DIE AUS KOHLENHYDRATE-HALTIGEN SUBSTRATEN ERZEUGT WURDEN

Es werden zwei Methoden der Nukleinsäurenbestimmung in den Futterhefen beschrieben, die mittels Kultivierung der Hefen *C. lipolytica* auf verschiedenen Kohlenhydrate-Substraten in einem Mineralmedium produziert wurden; es handelt sich um die spektrographische und die kolorimetrische Methode. Die spektrophotometrische Methoden eignen sich vorteilhaft zu Kontrollbestimmungen und zur Verfolgung der relativen Änderungen des Nukleinsäuregehaltes in Hefen; die kolorimetrischen Methoden werden für die genaue Bestimmung der Nukleinsäuren und Vertretung der einzelnen Säuren empfohlen.