

Ing. MILOSLAV RUT, Výzkumný ústav krmivářského průmyslu a služeb, odd. mikrobiálních výrob, Praha

S prvními informacemi o škodlivosti nukleových kyselin kvasinek, používaných k náhradě bílkovinného deficitu v lidské výživě [1, 2], byl vzbuzen zájem o stanovení nukleových kyselin z tohoto hlediska. Za škodlivost nukleových kyselin jsou odpovědné nukleové báze, a proto mají pro stanovení význam jak kyselina ribonukleová, tak i kyselina dezoxiribonukleová a jejich štěpy. Tím je současně zúžen výběr vhodné metody z hlediska výživy, protože metoda musí indikovat nukleové báze.

Již v šedesátých letech skončil vývoj metod na stanovení nukleových kyselin v biologickém materiálu a v praxi se používají dnes již klasické metody *Schmidtova-Thanhauserova* [3], *Schneiderova* [4] a *Ogurova-Rosenové* [5]. První dvě metody byly vypracovány pro živočišný materiál, třetí pro materiál rostlinný, všechny potom pro stanovení kyseliny ribonukleové a dezoxiribonukleové, tak jak to vyžadoval tehdejší zájem vědy o vysvětlení úlohy obou kyselin v mechanismu dědičnosti. Obvykle se nejdříve odstraňují nukleotidy, potom interferující látky (cukry, fosfáty, fosfolipidy) a nakonec se specifickými činidly stanoví ribóza a dezoxiribóza [4], nebo se RNK a DNK oddělí na základě rozpustnosti v chladné kyselině chloristé [5], nebo v horkém louhu [3] a v takto oddělených extraktech se stanoví fosfor [3] nebo adsorpce v UV světle [5]. Tyto tři základní metody byly často modifikovány. Byly měněny způsoby odstranění interferujících látek, způsoby dělení DNK a

RNK, způsoby stanovení cukerné složky a vlnové délky při spektrofotometrickém měření nukleovýchází. Na druhé straně je zajímavé, že těchto tří metod vypracovaných pro živočišný a rostlinný materiál, se stále používá i pro stanovení v mikroorganismech, často bez jakékoli úpravy v kompletním, časově a pracovní náročném sledu čistících operací. Například ještě v roce 1972 potravinářská sekce IUPAC doporučuje Schmidtovu-Thanhauserovu metodu, včetně odstranění nukleotidů, dělení RNK a DNK, se spektrofotometrickým určením RNK a kolorimetrickým měřením DNK.

Pro stanovení nukleových kyselin v kvasinkách určených pro lidskou výživu je nejvhodnější spektrofotometrické stanovení v UV oblasti, bez odstranění štěpů nukleových kyselin a dělení RNK a DNK. Takto zjednodušená metoda se používá zejména v pracích zabývajících se snížením nukleových kyselin v droždí [6–9]. Je samozřejmé, že se neaplikují čistící operace doporučené pro jiný materiál a jinou metodu. Často je diskutována vhodná vlnová délka měření. Maximální absorpce RNK je 260 až 263 nm a řada autorů měří při této vlnové délce obě nukleové kyseliny [6, 7, 9–11]. Maximální absorpce DNK je při 268 nm. Další obtíže způsobuje přítomnost látek absorbujících v této oblasti (hlavně bílkoviny a jejich štěpy), zvláště když nejsou vhodně voleny podmínky extrakce nukleových kyselin. Z tohoto hlediska má nejvhodnější podmínky metoda *Ogurova-Rosenové* [5], při které se extrahuje horkou kyselinou chloristou.

Vlivu interferujících látek je možno se vyhnout měřením při dvou vlnových délkách. Tento způsob je běžný ve spektrofotometrii, důležitý však je výběr druhé vlnové délky. Za první se obvykle volí vlnová délka maxima absorpce. Tsanev a Markov [12] zvolili za druhou vlnovou délku tu, při které mají štěpy bílkovin stejnou absorpci jako při první vlnové délce. RNK měří při 260 nm a 286 nm a DNK při 268 a 284 nm (platí pro živočišný materiál). Spirin [13] vypracoval spektrofotometrickou metodu pro určení součtu obou nukleových kyselin. Zjistil, že absorpční křivky obou kyselin mají podobnou diferenci (0,19) v extinkci, vztažené na 1 μ g fosforu nukleových kyselin pro 270 a 290 nm. Lze tedy koncentraci sumy nukleových kyselin (v μ g fosforu) vypočítat dělením rozdílu extinkcí číslem 0,19. Po vynásobení číslem 10,3 (z průměrného obsahu fosforu v nukleových kyselinách) se zjistí váhové množství nukleových kyselin.

V této práci jsme se zaměřili na zjednodušení dosud používané metody ke stanovení nukleových kyselin.

Materiál a metody

Při prověřování způsobu stanovení nukleových kyselin jsme pracovali s kvasinkami získanými laboratorním nebo průmyslovým způsobem fermentací na syntetickém lihu, *n*-alkánech a plynovém oleji. Extrakční pokusy se prováděly v 10 ml centrifugačních kyvetách s rozpouštědly analytické čistoty. Odstředění probíhalo na laboratorní odstředivce „Chirana“ 10 minut při 3000 ot/min.

Měření nukleových kyselin vychází z práce Spirina [13]. Po dvojnásobné extrakci kvasničné sedimentu 0,5 N HClO₄ 20 minut při 90 °C se supernatanty slíjí, doplní na určitý objem stejnou kyselinou a měří se absorpce při 270 a 290 nm proti 0,5 N HClO₄ (spektrofotometr VSU-P, Zeiss Jena).

Výsledky a diskuse

Byla proměřena absorpční spektra základních petrochemických surovin pro výrobu krmného droždí. Výsledky potvrdily, že jakýkoli prakticky možný zbytek základních surovin ve vyrobeném droždí nemůže prokazatelně ovlivnit stanovení nukleových kyselin.

Dále byl prověřen vliv různých čistících operací doporučených u tří základních metod stanovení nukleových kyselin. Jako vzorek bylo vzato sušené krmné droždí vyrobené na plynovém oleji. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

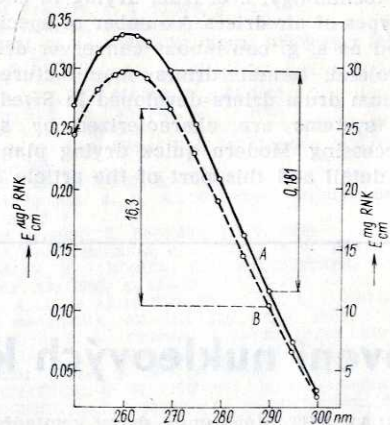
Operace	Extrakce	% nukleových kyselin
1	acetone	4,22
2	+ 96% etanolem	4,17
3	+ etanolem — éterem 3 : 1	4,16
4	+ metanolem — chloroformem 3 : 1	4,12
5	+ etanolem — éterem 3 : 1	4,08
6	+ éterem	4,09
7	+ 0,25 N HClO ₄ za chladu	3,43
8	+ 0,25 N HClO ₄ za chladu	3,34

Tabulka 2

Operace	% nukleových kyselin
jednoduchá extrakce 0,5 N HClO ₄ při 90 °C	6,20
dvojnásobná extrakce 0,5 N HClO ₄ při 90 °C	6,90
jednoduchá extrakce doplněná promytím	6,73

Z tabulky 1 vyplývá, že rozdíly v obsahu nukleových kyselin po jednotlivých čistících operacích nepřesahují přesnost metody. Bylo také zjištěno, že některá rozpouštědla (např. aceton p. a. Lachema) obsahují určité množství UV absorbujících látek, které bez dostatečného následujícího promytí zvyšovaly obsah nukleových kyselin. Uvedené poznatky byly potvrzeny na různých kmelech kvasinek, pěstovaných na různých petrochemických surovinách. Čistící operace je proto možno považovat za zbytečné, což je v souladu s poznatkem Sokurové [14] a Tsaneva [12], získanými jinou metodou na materiálu jiného původu. Snížení obsahu nukleových kyselin po sedmé a osmé operaci odpovídá obsahu nukleotidů. Jelikož jsou tyto sloučeniny jako škodlivé látky v droždí stejně významné jako nukleové kyseliny, je nutno je zahrnout do stanovení. Proto i extrakce 0,25 N HClO₄ je nutno vypustit.

Dále byla prověřena nezbytnost doporučené dvojnásobné extrakce 0,5 N HClO₄ při 90 °C. Jak vyplývá z tabulky 2, je jednorázová extrakce 0,5 N HClO₄, doplněná pouhým promytím stejnou kyselinou, rovnocenná dvojnásobné extrakci za zvýšené teploty. Jediná extrakce je tedy dostačující, druhá plní pouze úlohu promytí kvasničného sedimentu od zbytků UV absorbujících látek.



Obr. 1

Důležitým faktorem rozhodujícím o přesnosti spektrofotometrické metody je standard. V našem případě je dostupným standardem kyselina ribonukleová čistá (Lachema Brno). Obsahuje 9,01 % fosforu, 90,6 % sušiny a 15,9 % dusíkatých látek. Křivka její absorpce v UV části spektra, vyjádřená na 1 μ g fosforu v 1 ml v kyvetě 1 cm, je uvedena na obrázku 1 — křivka A. Shoduje se ve velikosti maxima s obdobnou křivkou podle Spirina [13], ze které uvedený autor vypočítal rozdíl extinkcí při 270 a 290 nm připadající na 1 μ g fosforu v kyvetě 1 cm. Tento údaj (0,19) se poněkud liší od našeho měření, avšak difference je v mezích přesnosti metody. Pro výpočet je tedy možno použít Spirinova vztahu. Obsah fosforu však autor uvádí 9,7 %, což se již značně liší od našeho rozboru standardu, a proto považujeme za správnější brát do výpočtu rozdíl extinkcí přepočtený nikoli na 1 μ g fosforu, ale na 1 mg RNK v 1 ml. Křivka takto přepočtená je uvedena na obrázku — křivka B. Potom se koncentrace nukleových kyselin vypočítá takto:

$$\% \text{ nukleových kyselin} = \frac{\Delta D \cdot \bar{f} \cdot 100}{16,3 \cdot n}$$

kde

ΔD je rozdíl extinkcí při 270 a 290 nm,

\bar{f} — ředění,

n — navážka kvasničné sušiny v mg,

16,3 — rozdíl extinkcí připadajících na 1 mg RNK („přepočítací faktor“).

Zcela správné by bylo provést stejné měření i pro kvasničnou DNK. Tento preparát není k dispozici, ale přesto je možno stanovení součtu nukleových kyselin považovat za dostatečně přesné, protože se křivky absorpce obou kyselin v oblasti 270–290 nm velmi málo liší [13]. Navíc je poměr DNK:RNK v kvasinkách obvykle okolo 1:10, takže by eventuální rozdíl absorpčních vlastností DNK přepočítací faktor neovlivnil.

Na základě provedených zkoušek bylo možno navrhnout tento postup stanovení nukleových kyselin v kvasinkách: Do centrifugační kyvety 10 ml se naváží 100 až 150 mg kvasničné sušiny (při práci se suspenzí se napipetuje odpovídající množství, odstředí se a supernatant se odleje), přidá se 5 ml 0,5 N HClO₄, důkladně se promíchá tyčinkou a vloží se na 20 minut do vodní lázně 90 °C. Vloženou tyčinkou se občas zamíchá. Potom se odstředí, supernatant se slije do odměrné baňky 250 ml. Na sediment se přidá dalších 5 ml 0,5 N HClO₄ a postup se opakuje, popř. se jen důkladně promíchá a odstředí. Spojené supernatanty v odměrné baňce se doplní po značku 0,5 N HClO₄. Měří se v kyvetě 1 cm při 270 a 290 nm proti 0,5 N HClO₄. Obsah nukleových kyselin se vypočítá podle uvedeného vzorce. Dvě souběžná stanovení se nesmí lišit více než o 5 % rel. Stanovení trvá půldruhé hodiny. Doporučuje se překontrolovat v podmínkách vlastní laboratoře přepočítací faktor takto: Naváží se okolo 10 mg čisté kyseliny ribonukleové (Lachema) do zkumavky, přidá se 5 ml 0,5 N HClO₄, promíchá se tyčinkou a vloží do vodní lázně 90 °C na 20 minut. Občas se tyčinkou zamíchá. Poté se celý obsah zkumavky spláchne do odměrné baňky 250 ml (je dokonale čirý) a doplní se 0,5 N HClO₄. Měří se stejně jako při vlastním stanovení.

$$\text{Přepočítací faktor} = \frac{AD \cdot 2,5 \cdot 10^4}{n \cdot v}$$

kde

n je navážka standardu v mg,

v — sušina standardu v %.

Literatura

- [1] WASLIEN, C. I. - CALLOWEY, D. M. - MARGEN, S., Amer. Clin. Nutr., **21**, 1968, č. 9, s. 892.
- [2] EDOZIEN, J. C., aj., Nature, **228**, 1970, s. 180.
- [3] SCHMIDT, G. - THANHAUSER, S. J., J. Biol. Chem., **161**, 1945, s. 83.
- [4] SCHNEIDER, W. C., J. Biol. Chem., **161**, 1945, s. 293.
- [5] OGUR, M. - ROSEN, G., Arch. Biochem., **25**, 1950, s. 262.
- [6] CASTRO, A. C. - SINSKEY, A. J. - TANNENBAUM, S. R., Appl. Microbiol., **22**, 1971, č. 3, s. 422.
- [7] CANEPA, A., aj., Biotechn. Bioeng., **14**, 1972, s. 2, s.173.
- [8] HOLDEN, J. T., Biophys. Acta, **29**, 1958, s. 667.
- [9] OHTA, S., aj., Appl. Microbiol., **22**, 1971, č. 3, s. 415.
- [10] WATANABE, S. - OSAWA, T. - YAMAMOTO, S., J. Ferm. Techn., **46**, 1968, s. 536.
- [11] MITTERHAUSEROVÁ, L. - GINTEROVÁ, A., Kvasný průmysl., **16**, 1970, č. 4, s. 83.
- [12] TSANEV, R. - MARKOV, G. G., Biochim. Biophys. Acta, **42**, 1960, s. 442.
- [13] SPIRIN, A. S., Biochimija, **23**, 1958, s. 656.
- [14] SOKUROVA, E. N., Biochimija, **32**, 1967, s. 1134.

Rut, M.: Stanovení nukleových kyselin v kvasinkách. Kvas. prům. **19**, 1973, č. 6, s. 131–133.

Byla zjednodušena spektrofotometrická metoda stanovení nukleových kyselin v kvasinkách, hodnotící kvasinky používané v lidské výživě. Časově a pracovně náročné čisticí operace doporučované v klasických metodách (odstranění fosfátů, lipidů, nukleotidů) jsou zbytečné. Metoda byla prověřena na kvasinkách pěstovaných na různých petrochemických surovinách, je rychlá a dává přesné a spolehlivé výsledky.

Рут, М.: Определение нуклеиновых кислот в дрожжах. Квас. прум. **19**, 1973, № 6, 131–133.

Описывается новый, существенно упрощенный, спектрофотометрический метод определения нуклеиновых кислот в дрожжах, применяемых для изготовления продуктов. Крайне сложные и трудоемкие по очистке (удаление фосфатов, липидов, нуклеотидов итд.), необходимые при применении обычных методов, отпадают. Метод проверялся посредством анализа дрожжей, культивированных на разных нефтехимических продуктах. Новый метод экономит много времени, причем дает весьма точные и достоверные результаты.

Rut, M.: Determination of Nucleic Acids in Yeast. Kvas. prům. **19**, 1973, No. 6, 131–133.

The article deals with a simplified spectrophotometric method which has been developed for the determination of nucleic acids in yeast used in food products. The method has many advantages since complex, time and labour consuming separating operations [removal of phosphates, lipides and nucleotides] required by conventional methods are eliminated. The method was verified on yeast cultivated in petrochemical substrates. It takes little time is reliable and gives accurate results.

Rut, M.: Bestimmung der Nukleinsäuren in Hefen. Kvas. prům. **19**, 1973, Nr. 6, 131–133.

Die Arbeit berichtet über die Vereinfachung der spektrophotometrischen Methode zur Bestimmung der Nukleinsäuren in Hefen, die zur Bewertung der Hefe für Menschenernährung angewendet wird. Die zeitraubende und mühsame Reinigungsoperationen, welche bei den klassischen Methoden empfohlen werden (Beseitigung der Phosphate, Lipide und Nukleotide) sind bei der vereinfachten Methode überflüssig. Die Methode wurde auf Hefen getestet, die auf verschiedenen petrochemischen Rohstoffen kultiviert wurden. Sie ist schnell und bietet genaue und verlässliche Ergebnisse.