

Porovnání způsobů extrakce nukleových kyselin a přípravy kvasničného extraktu z pekařského droždí *Saccharomyces cerevisiae* a krmného droždí *Candida utilis*.

633.14.035

Ing. BOŽENA BĚHALOVÁ, CSc., Ing. MARKÉTA BLÁHOVÁ, Ing. VLADIMÍR ŠILLINGER,
Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Klíčová slova: nukleové kyseliny, kvasničný extrakt, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, ergosterol

ÚVOD

Současná produkce československých droždíren a rozvinutá výroba krmného droždí v s. p. Biocel Paskov zajišťují dostatečné množství pekařského a krmného droždí jak pro přímé využití, tak i pro následné zpracování biomasy. Získávání řady ekonomicky významných produktů využitelných v potravinářském, farmaceutickém a fermentačním průmyslu se proto stává reálnou možností. Uvažuje se o izolaci polysacharidů buněčných stěn, fosfolipidů, kvasničných bílkovin, invertázy, vitamínů aj. [1], avšak hlavní pozornost poutá výroba kvasničného extraktu, nukleových kyselin a ergosterolu.

Kvasničné extrakty, získané autolytickým, plasmolytickým či fyzikálně chemickým procesem, jsou koncentráty rozpustných složek kvasničných buněk. Využití nacházejí v potravinářském a fermentačním průmyslu. Většinou jsou připravovány z kvasinek *S. cerevisiae* kultivovaných na melase,

ale jsou vyráběny i z odhořčených pivovarských kvasinek *S. cerevisiae* a *S. uvarum* a z kvasinek *C. utilis*, rostoucích na cukerných odpadech nebo na ethanolu [2].

Vysoký obsah nukleových kyselin (6–14 %) a nejvyšší mikrobiální poměr RNK/DNK činí kvasinky ideálním surovinovým zdrojem pro přípravu ribonukleové kyseliny. Polymerní nukleové kyseliny po enzymové hydrolýze RNK exonukleasami, izolovanými z rodu *Penicillium* nebo *Streptomyces*, jsou zdrojem 5'-nukleotidů, z nichž guanosin-5-monofosfát (GMP) a inosin-5-monofosfát (IMP) se využívají jako zvýrazňovače chutí v potravinářství a cytidin-5-monofosfát (CMP) a uridin-5-monofosfát (UMP) při aplikaci v medicíně.

Nukleát sodný, popř. složitější preparáty RNK jsou farmaceuticky atraktivní vzhledem k jejich imunomodulačním, detoxikačním či reparačním účinkům [3]. Z nízkomolekulárních preparátů nukleotidového charakteru je široce využíván ATP, NAD a FAD.

Výlučnou kvasničnou surovinou pro izolaci ergosterolu je pekařské droždí [4]. Frakcionaci kvasinek *S. cerevisiae* je proto nutno řešit tak, aby se ergosterol zkoncentroval během procesu ve frakci buněčných membrán a stěn, sloužících k jeho další izolaci.

Porovnání základních typů průmyslových či z literatury známých extrakčních postupů frakcionace kvasničné biomasy [5, 6] bylo provedeno u pekařského droždí *S. cerevisiae* z droždárny Kolín, Ústí nad Labem a krmného droždí *C. utilis* ze s. p. Biocel Paskov, přicházejících v úvahu pro komplexní zpracování biomasy.

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismy: lisované pekařské droždí *S. cerevisiae* z droždáren Ústí nad Labem a Kolín, asi 10% kvasničné mléko *C. utilis*, pěstované na sulfitových výluzích ve s. p. Biocel, Paskov.

Analytické metody: Nukleové kyseliny byly stanoveny spektrofotometricky metodou Ogura, Rosenové [7], bílkoviny metodou Lowry et al. [8], cukry anthronovou metodou [9], celkové lipidy Biolachema-Testem. Celkové steroly Liebermann-Burchardovou reakcí [10] a $\Delta 5,7$ steroly spektrofotometricky [11]. Po lyofilizaci vzorků byl v sušině stanoven obsah popela a na automatickém analyzátoru elementárních prvků LEGO obsah dusíku. Sušina vzorků byla určena gravimetricky po dosažení konstantní hmotnosti při 105 °C. Výtěžek extrakce v procentech byl vypočten z poměru hmotnosti sušiny supernatantu po 30minutové separaci kvasničné suspenze při 3 500 G k hmotnosti sušiny kvasničné suspenze stejného výchozího objemu. Procentní výtěžek srážení byl vypočten z pomě-

ru hmotnosti sraženiny 10 ml vysráženého kvasničného extraktu, získané jako sediment po 30minutovém odstředění při 3 500 G k celkové sušině 10 ml vysráženého kvasničného extraktu. Není-li uvedeno jinak, pak srážení probíhalo po úpravě na pH 2 a přidavku ethanolu v poměru 1:1 18 až 20 hodin. Pokusy byly prováděny v litrových míchaných šaržích o obsahu sušiny 10 % hm. Po skončení extrakce byly vyextrahované buňky separovány za chladu 30 min při 3 750 G.

VÝSLEDKY A DISKUSE

K porovnání bylo vybráno 6 základních typů extrakčních postupů. Vedle 5hodinové autolýzy za zvýšené teploty 50 až 55 °C byla sledována hodinová extrakce v NaOH 0,25 mol.l⁻¹ při laboratorní teplotě, hodinová extrakce v NH₄OH 0,4 mol.l⁻¹ při 40 °C, 30minutová extrakce, HCl 0,25 mol.l⁻¹ při 80 °C, hodinová extrakce v NaCl 1 mol.l⁻¹ při 0,2 MPa v autoklávu a hodinová extrakce při pH 7,5 za zvýšené teploty 92 °C.

Kritériem hodnocení pro porovnání postupů z hlediska produkce kvasničných extraktů jsou hodnoty výtěžků extrakce a složení získaných kvasničných extraktů dané obsahem jednotlivých buněčných složek, především štěpů nukleových kyselin a bílkovin.

Z hlediska izolace nukleových kyselin je nutno dále vzít v úvahu výtěžek srážení extraktů po úpravě pH a přidavku ethanolu, výtěžek produktu srážení, vztažený na původní sušinu buněk a poměr volných nukleotidů a polymerní frakce RNK (tabulky 1, 2, 3).

Výtěžky extrakce se pohybují kolem 20 %. Výjimkou je extrakce chloridem sodným, kde zdán-

Tabulka 1. Výtěžky (v % hm.) extrakce kvasinek (A), srážení kvasničného extraktu (B) a produktu srážení vztažené na původní suchou hmotnost buněk (Y)

Typ extrakce	Candida utilis výtěžek (%)					Saccharomyces cerevisiae výtěžek (%)				
	extrakce A	Ø	srážení extraktu B	Ø	produktu srážení Y	extrakce A	Ø	srážení extraktu B	Ø	produktu srážení Y
0,4 mol/l NH ₄ OH 40 °C/1 h	27,2		50,5			13,0		19,3		
	32,1	26,2	43,6	49,4	12,9	10,5	10,0	12,9	16,9	1,6
	23,7		50,5			5,1		21,8		
	21,8		52,9			11,4		13,6		
0,25 mol/l NaOH 20 °C/1 h	32,6		50,8			27,0		29,1		
	15,9	23,6	47,7	51,8	12,2	21,5	25,5	16,0	28,7	7,3
	22,3		57,0			25,1		34,8		
						30,1		30,6		
0,25 mol/l HCl 80 °C/0,5 h						23,9		33,2		
	20,1		4,0			22,0		7,9		
	27,4		3,2			24,5		7,2		
	21,1	21,3	24,7	11,5	2,4	23,9	24,7	11,5	8,4	2,1
pH = 7,5 92 °C/1 h	16,4		14,1			27,6		8,0		
						25,6		7,5		
	16,5		34,6			16,4		19,2		
	23,1		46,0			19,8		8,1		
1 mol/l NaCl 120 °C/1 h	16,7	19,8	45,8	43,3	8,6	19,4	18,9	9,4	16,4	3,1
	26,2		46,8			18,2		26,7		
	16,7		—			20,8		18,9		
						41,5		32,2		
autolýza 52 °C/5 h Y = A · B 100	32,0		25,0			41,6	44,1	14,0	20,3	8,9
	40,0	35,5	18,0	21,0	7,4	46,6		14,5		
	34,4		20,0			46,8		20,4		
autolýza 52 °C/5 h Y = A · B 100	30,0		—		—	7,0		—		—

Tabulka 2. Složení extraktů (v % hm.) z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

Typ extrakce	Dusík celk.	RNA			Bílkoviny	Cukry	Popel
		volná	poly- merní	celkem			
0,4 mol/l NH ₄ OH/40 °C	9,6	10,2	5,8	16,0	14,8	18,2	14,2
0,25 mol/l NaOH/20 °C	7,1	26,4	0,5	26,9	10,4	18,6	24,6
0,25 mol/l HCl/80 °C	—	27,6	0,5	28,1	9,0	23,6	—
pH = 7,5/92 °C 1 mol/l	6,8	16,1	4,2	20,3	9,3	25,9	19,2
NaCl/120 °C výchozí buňky	4,2	10,9	3,1	14,0	6,6	12,0	46,5
	8,4	0,5	6,7	7,2	22,2	23,8	7,6

Tabulka 3. Složení extraktů (v % hm.) z kvasinek *Candida utilis*

Typ extrakce	Dusík celk.	RNA			Bílkoviny	Cukry	Popel
		volná	poly- merní	celkem			
0,4 mol/l NH ₄ OH/40 °C	12,0	15,7	27,4	43,2	19,0	6,1	10,7
0,25 mol/l NaOH/20 °C	9,4	37,8	2,1	39,9	25,5	5,2	23,1
0,25 mol/l HCl/80 °C	—	40,5	0,8	41,3	15,2	14,0	18,1
pH = 7,5/92 °C 1 mol/l	8,7	13,2	38,7	51,9	12,8	12,9	21,8
NaCl/120 °C autolýza/52 °C	3,8	24,9	1,0	25,9	6,2	6,3	36,4
výchozí buňky	8,6	24,9	0,5	35,4	15,1	15,7	17,7
	10,0	1,6	10,5	12,1	32,9	17,5	7,2

livě vysoké hodnoty výtěžku jsou způsobeny značným množstvím přidaného NaCl a dále málo účinná extrakce kvasinek *S. cerevisiae* NH₄OH (0,4 mol.l⁻¹).

Kvasničné extrakty z buněk *C. utilis* mají vyšší obsah dusíku, což se odráží i ve vyšším obsahu nukleových kyselin a bílkovin, zatímco extrakty *S. cerevisiae* se vyznačují vyšším množstvím cukerných složek. Zdá se, že *C. utilis* a *S. cerevisiae*, patřící k různým kvasničným řádům, se podstatně liší v charakteru buněčných stěn. Pevně vybudovaná struktura buněčných stěn *S. cerevisiae* se uvolňuje až vlivem extrémních podmínek prostředí, přičemž vně buněk procházejí převážně štěpy makromolekul.

Pro přípravu kvasničných extraktů je z hlediska výtěžku i vysokého obsahu bílkovinné složky nejvýhodnější autolytický proces. Z buněk *C. utilis* lze bez přídavku chemických činidel získat kvasničný extrakt s 30% výtěžkem prostou 5hodinovou autolýzou při teplotě 50–52 °C. U kvasinek *S. cerevisiae* se pouhým zvýšením teploty na 50 °C lytický systém neaktivuje. K získání kvasničného extraktu z pekařského droždí je možno využít plasmolytického účinku přídavku 7 % původního objemu ethanolu [12].

V extrahovaných kvasinkách *S. cerevisiae* byl stanoven obsah sterolů a porovnán s obsahem ve výchozích buňkách. Ve všech případech extrakce se zvýšil obsah sterolů, úměrně hmotnostní ztrátě rozpustných složek buněčné sušiny extrakcí.

V případě extrakce nukleových kyselin lze pozorovat, že vysoký obsah nukleových kyselin buněk *C. utilis* je jednou z příčin zhruba dvojnásobného obsahu nukleových kyselin v kvasničných extraktech ve srovnání s kvasničnými extrakty z pekařského droždí. Další příčinou je snazší pro-

ustnost buněčné stěny, způsobující, že při extrakcích NH₄OH (0,4 mol.l⁻¹ 40 °C) a 92 °C, pH 7,5 zůstává značná část nukleových kyselin v polymerním stavu a zajišťuje vysoký výtěžek srážení.

U uvedených dvou typů extrakce byly dále studovány podmínky srážení kvasničných extraktů. Hodnoty výtěžků a složení produktů srážení jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5. Vyššího výtěžku srá-

Tabulka 4. Výtěžky srážení kvasničných extraktů.

A. extrakce 0,4 mol/l NH ₄ OH/40 °C/1 h									
pokus č. 1			pokus č. 2			pokus č. 3			
pod- mínky srážení E : E-ol	pH	výtěžek (%)	pod- mínky srážení E : E-ol	pH	výtěžek (%)	pod- mínky srážení E : E-ol	pH	výtěžek (%)	
1 : 1,5	2	54,4	1 : 3	5	64,1	1 : 1,5	10	61,8	
1 : 1,5	4	61,6	1 : 2	5	64,8	1 : 1,5	1 mol/l NaCl	67,1	
1 : 1,5	5	60,4	1 : 1,5	5	56,5	1 : 1,5	0,25 mol/ l CaCl ₂	64,4	
1 : 1,5	10	60,4	1 : 1	5	54,1	1 : 1,5	4	57,2	
1 : 1	2	50,5	1 : 0,5	5	52,6	1 : 1,5	2	52,9	
B. extrakce 92 °C, pH 7,5/1 h									
1 : 1,5	2	41,9	1 : 3	5	45,5	1 : 1,5	10	51	
1 : 1,5	4	50,3	1 : 2	5	43,1	1 : 1,5	0,25 mol/ l NaCl	51,2	
1 : 1,5	5	55,7	1 : 1,5	5	41,9	1 : 1,5	0,25 mol/ l CaCl ₂	60,3	
1 : 1,5	7,5	40,0	1 : 1	5	38,3	1 : 1,5	4	50,4	
1 : 1	2	43,3	1 : 0,5	5	28,2	1 : 1,5	2	46,8	

Poznámky:

1) E: kvasničný extrakt

2) E-ol: ethanol

Tabulka 5. Složení produktů srážení z kvasničných extraktů

A. extrakce 0,4 mol/l NH ₄ OH/40 °C/1 h				
podmínky srážení kvasničný extrakt: ethanol	pH	RNK (%)	bílkoviny (%)	cukry (%)
1 : 1	2	54,3	38,6	8,1
1 : 1,5	10	56,6	28,9	6,4
1 : 1,5	2	51,1	35,4	4,9
1 : 1,5	4	54,3	29,7	5,0
1 : 1,5	5	49,2	28,7	4,5
B. extrakce 92 °C/pH 7,5/1 h				
1 : 1	2	60,1	10,3	16,6
1 : 1,5	7,5	77,2	8,6	9,7
1 : 1,5	2	79,8	14,3	10,4
1 : 1,5	4	78,9	13,4	9,5
1 : 1,5	5	77,3	10,8	12,5

žení lze dosáhnout zvýšením pH či přídavkem Ca²⁺ iontů. Za optimální poměr objemu extraktu a ethanolu lze považovat poměr 1:1, event. 1:1,5. Další přídavek ethanolu není ekonomicky efektivní.

Vyšší obsah nukleových kyselin v produktech srážení kvasničných extraktů získaných extrakcí při 92 °C a pH 7,5 doprovází snížený obsah bílkovin.

Extrahované kvasinky *C. utilis* lze i nadále využít pro krmné účely. Z tohoto hlediska se zdá výhodnějším postupem extrakce 1 hodinu při pH 7,5 a teplotě 92 °C, neboť zde nedochází k podstatným ztrátám bílkovin. Další výhodou je neutrální pH extrakce, zabraňující tvorbě racemátů aminokyselin, ke které nutně dochází při působení vyšších

koncentrací hydroxylových aniontů na bílkoviny [13]. Produkty racemizace působí v krmivářství inhibičně na růst či vykazují vysloveně toxický efekt [14]. Při extrakcích se v žádném případě mechanicky nenarušují buněčné stěny.

V případě extrakce při 92 °C lze vypustit i fázi tepelné předúpravy kvasinek před sušením, neboť záhřev na 92 °C dokonale nahradí termolýzu, potřebnou pro zvýšení stravitelnosti kvasničných bílkovin.

Literatura

- [1] ŠTURDÍK, E., KOLLÁR, R.: Kvas. prům., **34**, 1988, s. 107.
- [2] KELLY, M.: Yeast — Extrakt in Industrial Enzymology, The Application of Enzymes in Industry eds. T. Godfrey and J. Reichelt, The Nature Press, New York, 1983, s. 457.
- [3] SLUCKIN, R. L.: Trudy instituta, Moskovskij chimi-ko technologičeskij institut imeni D. I. Mendeleeva, **149**, 1987, s. 124.
- [4] BĚHALOVÁ, B. et al.: Kvas. prům., **33**, 1987, s. 143.
- [5] ANDREU, G., BENAIGES, M. L., LOPEZ, J., SOLA, C.: Biotechnol. Bioeng., **32**, 1988, s. 927.
- [6] OTERO, M. A., GONZALES, N., GONZALES, P. C.: Revista ICIDCA, **22**, 1988, s. 10.
- [7] OGUR, M. A., ROSENOVÁ, G.: Arch. Biochem., **25**, 1950, s. 262.
- [8] LOWRY, O. H. et al.: J. Biol. Chem., **193**, 1951, s. 265.
- [9] MORRIS, D. L.: Science, **107**, 1948, s. 245.
- [10] FÜRST, W.: Arch. Pharm., **330**, 1967, s. 353.
- [11] SHAW, W. A. C., JEFFERIES, J. P.: Analyst, **78**, 1953, s. 509.
- [12] Čs. patent 267 134.
- [13] WHITAKER, J. R., FEENEY, R. E.: CRC Crit. Rev. Food Science and Nutr., **19**, 1983, s. 173.
- [14] GOULD, D. H., MCGREGOR, J. T.: Adv. Exptl. Med. Biol., **35B**, 1977, s. 29.

Lektorovala Ing. J. Pásková, CSc.

Běhalová, B. - Bláhová, M. - Šillinger, V.: Porovnání způsobu extrakce nukleových kyselin a přípravy kvasničného extraktu z pekařského droždí Saccharomyces cerevisiae a krmného droždí Candida utilis. Kvas. prům., 37, 1991, č. 1, s. 7—10.

Pro přípravu kvasničných extraktů a izolaci nukleových kyselin z kvasničných buněk *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida utilis* bylo porovnáno 6 variant extrakčních postupů. K produkci kvasničného extraktu se jeví jako nejvhodnější postup autolýza kvasinek *Candida utilis* při teplotě 50 až 52 °C bez přidavku chemických činidel. Pro izolaci nukleových kyselin se zdá nejúčinnější extrakce rovněž z kvasinek *Candida utilis*, a to buď v prostředí 0,4 mol. l⁻¹ NH₄OH při teplotě 40 °C nebo při teplotě 92 °C a pH 7,5.

U kvasinek *S. cerevisiae* byl v extrahovaných buňkách v případě všech způsobů extrakce zjištěn zvýšený obsah sterolů, včetně Δ5,7 sterolů, tvořených převážně ergosterolem.

Бегалова, Б. - Благова, М. - Шиллингер, В.: Сопоставление способов, экстрагирования нуклеиновых кислот и получения дрожжевого экстракта из хлебопекарных дрожжей Saccharomyces cerevisiae и кормовых дрожжей Candida utilis.

Квас. прум., **37**, 1991, № 1, стр. 7—10.

В целях получения дрожжевых экстрактов и изолирования нуклеиновых кислот из дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida utilis* было проведено сопоставление 6 вариантов способов экстрагирования. Для продукции дрожжевого экстракта как наиболее выгодный представляется метод автолиз дрожжей *Candida utilis* при температуре 50—52 °C без добавки химических реактивов. Для изолирования нуклеиновых кислот кажется наиболее эффективным экстрагирование также из дрожжей *Candida utilis*, и то или в среде 0,4 мол. л⁻¹ NH₄OH при температуре 40 °C, или при температуре 92 °C и pH 7,5.

В случае *S. cerevisiae* при всех способах экстрагирования в экстрагированных клетках было найдено повышенное содержание стеролов, включая Δ5,7 стеролы, составляющих преимущественно эргостеролом.

Běhalová, B. - Bláhová, M. - Šillinger, V.: Comparison of Nucleic Acid Extraction and Yeast Extract Preparation from Baker's Yeast Saccharomyces cerevisiae and Fodder Yeast Candida utilis. Kvas. prům., 37, 1991, No. 1, pp. 7—10.

Six modifications of the extraction procedure for the yeast extract preparation and nucleic acid isolations from the cells of *Saccharomyces cerevisiae* and those of *Candida utilis* have been compared. For the yeast extract production the best procedure was the autolysis of *Candida utilis* at the temperature of 50 to 52 °C without any chemical agent additions. The best extraction procedure for the isolation of nucleic acids has also been achieved with *Candida utilis* yeasts under the following conditions: in 0,4 mol. l⁻¹ NH₄OH, at the temperature of 40 °C or 92 °C and pH 7,5. With *S. cerevisiae* using each extraction procedure an increased content of sterols including those of Δ 5,7 ones, consisting almost only of ergosterol was found in extracted cells.

Běhalová, B. - Bláhová, M. - Šillinger, V.: Vergleich der Verfahren der Extraktion der Nukleinsäuren und der Zubereitung von Hefeextrakt aus der Backhefe Saccharomyces cerevisiae und Futterhefe Candida utilis. Kvas. prům., 37, 1991, Nr. 1, S. 7—10.

Für die Zubereitung von Hefeextrakten und Isolation der Nukleinsäuren aus den Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida utilis* wurden 6 Varianten der Extraktionsverfahren verglichen. Als am besten geeignet für die Produktion des Hefeextrakts zeigte sich die Autolyse der Hefen *Candida utilis* bei der Temperatur von 50 bis 52 °C ohne Chemikalien-Zugabe. Für die Isolation der Nukleinsäuren bewährte sich als das wirksamste Verfahren die Extraktion gleichfalls aus den Hefen *Candida utilis*, und zwar entweder in dem Milieu 0,4 mol. l⁻¹ NH₄OH bei 40 °C oder bei der Temperatur von 92 °C und pH 7,5.

Bei den Hefen *S. cerevisiae* wurde in den extrahierten Zellen bei allen Extraktionsverfahren ein erhöhter Gehalt an Sterolen festgestellt inkl. Δ 5,7 Sterole, die überwiegend durch Ergosterol gebildet sind.