

Komplexná frakcionácia kvasničnej biomasy

VIII. Zhodnotenie frakcie nukleových kyselín

Ing.R.KOLLÁR, Doc.Ing.E.ŠTURDÍK, Ing.M.ROSENBERG, Ing.A.VLNOVÁ

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, 812 37 Bratislava
Ing.B.FERENČÍK, Výskumný ústav potravinársky, 825 09 Bratislava

Kľúčové slová: pekárské droždie, frakcionácia biomasy, nukleové kyseliny, 5'-nukleotidy, príprava a využitie nukleotidov

664.642

ÚVOD

Nukleové kyseliny a ich základné komponenty predovšetkým nukleotidy, ale tiež nukleozidy a dusíkaté bázy nachádzajú významné uplatnenie v potravinárskom i farmaceutickom priemysle, vo vedecko-výskumnej praxi, v humánnej i veterinárnej medicíne [1,2]. Významným surovinovým zdrojom pre izoláciu uvedených látok je biomasa kvasiniek (obsahuje cca 10 % nukleových kyselín). Vzhľadom na podstatne vyššie zastúpenie v bunkách je pozornosť zameraná predovšetkým na izoláciu RNA (pomer RNA:DNA v kvasinkách je 20:1), ktorú možno uskutočniť použitím alkálií, roztokmi solí, fenolu, dodecylsulfátu sodného, xylénsulfonátu atď. V priemyselných podmienkach sa využíva predovšetkým NaCl alebo NaOH v kombinácii so zvýšenou teplotou a následnou precipitáciou získaného extraktu okyslením na pH 1-2 [3,4]. Využitie izolovanej RNA je orientované predovšetkým na prípravu zvyrazňovačov chute na báze 5'-nukleotidov. Tieto sa získavajú enzymatickým štiepením kvasničnej RNA a to pôsobením nukleáz mikrobiálneho pôvodu (*Streptomyces aureus*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium citrinum* atď), pričom chuťovo nezaujímavý AMP je transformovaný na AMP mikrobiálnou deaminázou [5]. Na stanovenia nukleotidov sa využíva najčastejšie iónovýmenná a iónpárová kvapalinová chromatografia, resp. HPLC na reverznej fáze a stanovenie pomocou izotachofórey [6]. Separácia chuťovo aktívnych 5'-purínových nukleotidov sa uskutočňuje frakcionáciou s aktívnym uhlím (elúcia zriedeným NaOH), resp. s využitím silných anexov (adsorpcia v alkalickom prostredí) a následnou elúciou s HCl alebo kyselinou mravčou [7].

V potravinárskom priemysle sa využívajú najčastejšie komerčné preparáty zmesi nukleotidov 5' IMPNa₂ a 5' GMPNa₂. Nevyhnutnou podmienkou účinku je prítomnosť aktívnych aminokyselín (napr. L-asparagová, L-glutámová), pri spoločnom pôsobení s glutamátom sodným, kedy sa prejavuje synergistický efekt. Využitie je orientované predovšetkým na prípravu instantných potravín, kde majú príslušné preparáty za úlohu zachovanie prirodzenej chuti pôvodného pokrmu [8].

Okrem využitia v potravinárstve, nachádzajú chemické analógy nukleotidov, nukleozidov a dusíkatých báz významné uplatnenie v humánnej i veterinárnej medicíne (napr. cytidín a jeho deriváty pri liečení všetkých druhov leukémií, uridínové pre terapiu chorôb pečene, adenozinové pri príprave protívirusových preparátov, inozínové na liečbu kardiovaskulárnych chorôb, guanozinové pre protihperosové aplikácie [9]).

Cieľom tejto práce bolo, v rámci programu frakcionácie pekárskoho droždia, zamerať sa na frakciu nukleových kyselín, resp. ich degradačných produktov, a to tak v analytickom ako aj izolačnom nasmerovaní.

MATERIÁL A METÓDY

Základnou surovinou pre experimenty bolo komerčné lisované pekárské droždie (Potravinársky kombinát, Trebišov), ktoré sme riedili vodou na 10% suspenziu. Bunky sme dezintegrovali

indukovanou autolýzou, ktorá bola iniciovaná prídavkom 1 % (hm.) NaCl, 5 % (hm.) etanolu a 15 % (obj.) suspenzie čerstvého autolýzátu z predchádzajúceho experimentu. Autolýza prebiehala za stáleho miešania pri frekvencii otáčok 70 min⁻¹ 24 hodín v 1,5 m³ fermentore Electrolux (Getinge, Švédsko) pri teplote 50 °C. Autolýzát bol rozšeparovaný centrifugáciou (Alfa Laval BRPX 207 SGB, Švédsko) na supernatant a sediment. Sediment bol využitý na prípravu ergosterolu, fosfolipidov, bunkových stien, (1-3)-β-D-glukanu a manoproteínov [10]. Supernatant bol vyčistený na vysokootáčkovej centrifúge CTR 101 (ZSSR), ďalej ultrafiltrovaný (DDS 40 CM, Dánsko, membrány s deliacou schopnosťou 20 000). Koncentrát bol využitý na purifikáciu invertázy [11]. V permeáte, ktorý po vysušení v rozprašovacej sušiarňi slúži ako kvasničný extrakt [12], sme stanovovali nukleotidy, nukleozidy a dusíkaté bázy s využitím izotachofórey a vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Nukleotidy sme analyzovali na dvojkoľonovom izotachoforetickom analyzátoze ZKI 01 (ÚRVJT, Spišská Nová Ves), pričom ako vodiaci elektrolyt bol použitý roztok 1.10⁻² mol.dm⁻³ HCl, 0,1% hydroxyetylcelulózy a 1,32 mg.cm⁻³ β-alanínu o pH 3,0, zakončujúcim elektrolytom bola kyselina kaprónová (5.10⁻³ mol.dm⁻³). Podmienky stanovenia: priemer predseparačnej kapiláry 0,8 mm, analytickej kapiláry 0,3 mm, prúd tečúci predseparačnou kapilárou 250 μA, analytickou 20 μA, objem vzorky 30 μl. Vzorky boli pred analýzou predupravené adsorpciou na aktívne uhlie s následnou elúciou (etanol:H₂O 1:1, pH 13). Nukleozidy a dusíkaté bázy sme stanovovali technikou HPLC na chromatografe PU 4003 (Philips - Veľká Británia) s UV VIS detektorom s poľom diód PU 4021, s integrátorom PU 4810. Rozdelenie prebiehalo na reverznej fáze s využitím gradientu polarizácie mobilnej fázy (kolóna Separon SGX C18, 150 x 3,3 mm, Ø 5 μm, Tessek). Mobilná fáza pozostávala: A - 0,02 mol.dm⁻³ KH₂PO₄, pH 5,6; B - metanol - voda 90:10 (v/v), priebeh gradientu 15 min 0-20 %-B, 10 min 20-100 %-B, 30 min 100 %-B, pri prietoku 0,5 ml.min⁻¹. Súčasne s pripraveným extraktom bol analyzovaný tiež štandardný kvasničný extrakt Gistex-Standard (Gist-Brocades, Holandsko). Vzorky boli pred nástrekom upravené filtráciou s využitím skleneného a nylonového mikrofiltra (Tessek) o veľkosti pórov 3, resp. 0,45 μm. Štandardy nukleotidov (3' a 5' AMP, 3' a 5' CMP, 3' a 5' UMP, 3' a 5' GMP, 5' IMP) nukleozidov (adenozin, guanozin, cytidín a uridín) a báz (adenín, guanín, cytozín a uracil) boli dodané firmami Reanal (Maďarsko), Boehringer (Nemecko) a Sigma (USA).

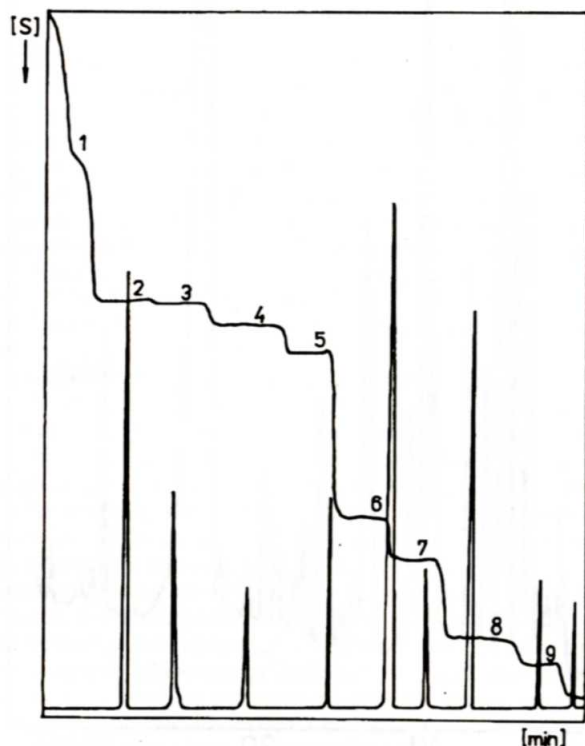
Ribonukleovú kyselinu sme z 10 %-nej suspenzie intaktných kvasiniek extrahovali 25 %-ným roztokom NH₄OH (0,1g/g sušiny droždia, 10 minút pri 60 °C) ďalej s využitím roztoku NaCl (1,6g/g sušiny droždia 4 hodiny pri teplote 100 °C) a nakoniec pôsobením roztoku NaCl s NaOH (1,01g NaCl a 0,025g NaOH na 1g sušiny droždia počas 4 hodín pri 100 °C). Na precipitáciu vyextrahovanej RNA sme využili zrážanie etanolom (v objemovom pomere 1:1 k extraktu) s prídavkom NaCl (1 mol.dm⁻³), ďalej precipitáciu úpravou pH extraktu do izoelektrického bodu RNA (pH 2, s 1 mol.dm⁻³ HCl) a frakčné zrážanie najskôr okyslením na pH 5 (s 1 mol.dm⁻³ HCl), pričom precipitát bol odšeparovaný a RNA sa zrážala opätovnou úpravou s HCl

(1 mol.dm⁻³) na pH 2. Nukleové kyseliny sme stanovovali sumárne (DNA, RNA) spektrofotometricky metódou podľa Spiri-
na [13], proteíny metódou podľa Lowryho [14].

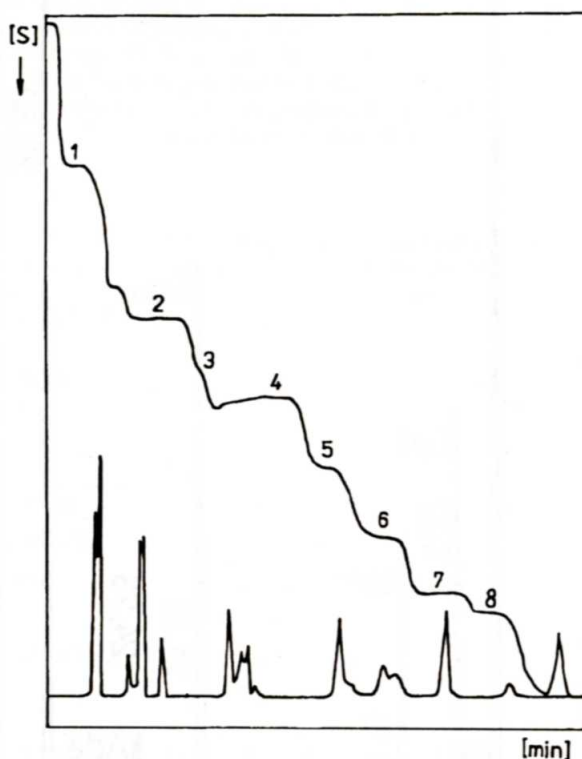
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Postup frakcionácie pekárskeho droždia, vypracovaný na Katedre biochemickej technológie CHTF STU v Bratislave, bol doteraz charakterizovaný z hľadiska jeho využitia pri príprave kvasničného extraktu, invertázy, biosorbentu na báze bunkových stien, ergosterolu, fosfolipidov, (1-3)- β -D-glukánu a manoproteínov [15]. V ďalšej práci sme sa sústredili na mapovanie a zhodnotenie frakcie nukleových kyselín. Nukleové kyseliny sú počas indukovanej autolýzy, ktorú využívame na rozrušenie bunkového obalu kvasiniek, do značnej miery degradované (70-90 %) a ako nízkomolekulové produkty hydrolýzy distribuované do mimobunkového priestoru (supernatant). Naším cieľom bolo v prvom rade spoznať charakter degradačných produktov nukleových kyselín nachádzajúcich sa v kvasničnom autolýzáte. Vzhľadom na to, že z hľadiska senzorických vlastností sú významné len 5'-nukleotidy, bolo nevyhnutné zvoliť takú metódu stanovenia, ktorá umožňuje rozlíšenie izomérov nukleotidov. Z metód používaných na stanovenie nukleotidov sme si z viacerých dôvodov vybrali izotachforetické stanovenie (prístrojové vybavenie, eliminácia balastných látok, ktoré nemajú elektrický náboj, atď). Keďže v literatúre sme nenašli vodivostný systém umožňujúci

súčasnú stanovenie 5' a 3' nukleotidov, vypracovali sme postup, ktorý umožňuje ich detekciu [16]. Pri stanovení sme využili vodivostný elektrolyt HCl+ β -alanín pH 3 a kyselinu kaprónovú ako zakončujúci elektrolyt. V uvedenom systéme dochádza k veľmi dobrému rozlíšeniu štandardov 3'-mononukleotidov, 5'-mononukleotidov, nukleozid difosfátov, nukleozid trifosfátov. Ako vyplýva z obr. 1, použitý systém poskytuje dostatočné odlišenie zmesi 5' a 3' mononukleotidov. Navrhnutý systém sme využívali pri stanovení reálnych vzoriek kvasničného extraktu získaných indukovanou autolýzou. Záznam vždy obsahoval tri zóny, z ktorých jedna bola metódou interného štandardu identifikovaná ako fosfátová (PO_4^{3-}) a dve boli tvorené nede-
tegovateľnou zmesou látok. Vzorku bolo preto potrebné pre stanovenie predupraviť. Zvolili sme adsorpciu na aktívne uhlie, pričom pri vhodnej voľbe elučného systému je možné dosiahnuť pomerne selektívnu elúciu látok nukleotidovej povahy. Optimalizovali sme jednak množstvo použitého aktívneho uhlia ako aj teplotu počas adsorpcie. Elúciu sme uskutočnili v niekoľkých



Obr.1. Záznam izotachforetickej analýzy štandardnej zmesi 3' a 5'-mononukleotidov. Podmienky stanovenia: vodiaci elektrolyt: 10^{-2} mol.l⁻¹ HCl+ β -alanín, pH 3; zakončujúci elektrolyt: $5 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹ kyselina kaprónová, pH 4-5; prúd v predseparačnej kolóne: 250 μ A; prúd v analytickej kolóne 20 μ A; posun papiera: 0,25 mm.s⁻¹.
(1)-anorganický fosfor, (2)-3' UMP, (3)-5' UMP, (4)-3' GMP, (5)-5' GMP, (6)-3' AMP, (7)-5' AMP, (8)-3' CMP, (9)-5' CMP.



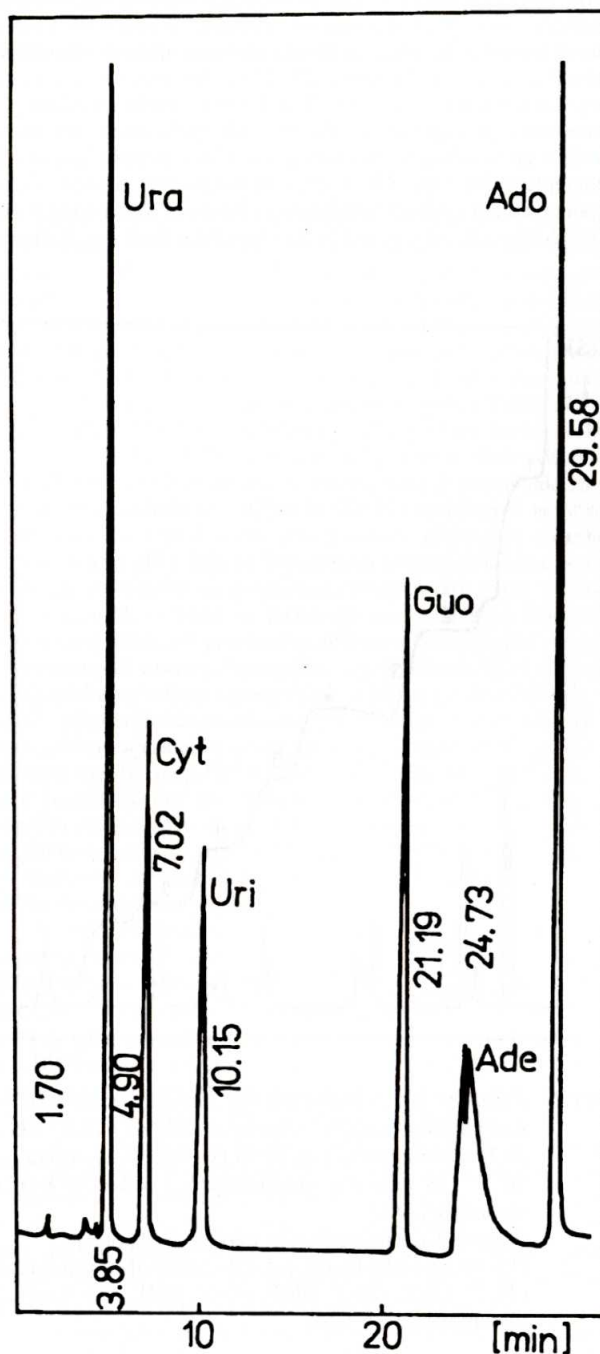
Obr.2. Záznam izotachforetickej analýzy nukleotidov kvasničného extraktu adsorbovaných na aktívne uhlie (0,5g aktívneho uhlia na 10 ml kvasničného extraktu pri 50 °C, 10 minút) a vylučovaných z neho 50 %-ným etanolom, pH 13.

Podmienky stanovenia boli totožné ako u obr.1.

(1)- anorganický fosfor, (2), (3)- neidentifikované látky, (4)- 3' UMP, (5)-3' GMP, (6)-3' AMP, (7)- kyselina glutámová, (8)-3' CMP.

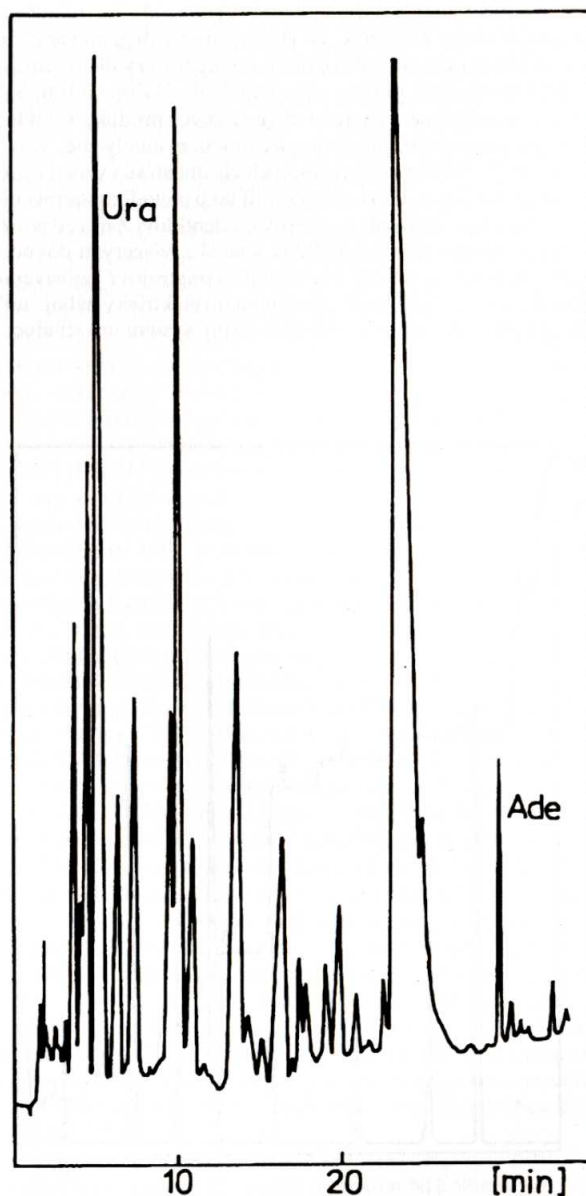
systémoch (acetón:voda v rôznych objemových pomeroch, $\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}:\text{etanol}$ 4:46:50, $\text{etanol}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 pri rôznom pH), pričom ako najvhodnejší sa ukázal systém $\text{etanol}:\text{H}_2\text{O}$ pH 13, ktorý sme preverili na štandardnej zmesi 5' a 3' mononukleotidov. V uvedenom systéme dochádza k približne 50 %-nej elúcii pôvodnej koncentrácie štandardov. Týmto postupom bola upravená aj vzorka kvasničného extraktu, pričom izotachforetickou analýzou s využitím vnútorného štandardu (obr.2) bolo zistené, že predupravená vzorka obsahuje 3'-mononukleotidy (3'-AMP

1,512; 3' -CMP 1,344; 3' -CMP 0,152; 3' -UMP 3,612 mg/g sušiny), ktoré sú zo senzorického hľadiska málo zaujímavé. Uvedený výsledok bolo možné predpokladať vzhľadom na celkovo vyššiu aktivitu 3' -nukleáz v kvasinkách, ako aj hodnoty pH počas autolýzy, ktoré je vhodnejšie pre nukleázy s touto špecifitou.



Obr.3. Chromatografický (HPLC) záznam analýzy modelovej zmesi nukleozidov a báz. Kolóna Separon SGX C18 mobilná fáza A: $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ pH 5,6; B: metanol:voda 90:10 (v/v). Pribeh gradientu 15 min 0-20 % B, 10 min 20-100 % B, 30 min 100 % B; Štandardy: uracil (Ura), cytidín (Cyt), uridín (Uri), guanozín (Guo), adenín (Ade) a adenosín (Ado) všetky o koncentrácii $12,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Naše poznatky o obsahu degradačných produktov nukleových kyselín v extrakte sme chceli doplniť aj o analýzu nukleozidov a dusíkatých báz, ktoré sú vzhľadom na neprítomnosť fosfátu vo vodivostnom systéme nepohyblivé. Túto informáciu sme získali pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie na reverznej fáze. Na dosiahnutie dobrého rozlíšenia štandardov bolo potrebné popísať elučné systémy na stanovenie nukleotidov a báz čiastočne modifikovať úpravou pH systému, ako aj podmienok gradientu. Najvhodnejší systém bol použitý pri analýze štandardnej zmesi nukleotidov a báz (obr.3). Chromatografický záznam pripraveného kvasničného extraktu (obr.4)



Obr.4. Chromatografický (HPLC) záznam analýzy kvasničného extraktu CHTF SVŠT ($7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$). Podmienky analýzy: kolóna Separon SGX C18 mobilná fáza A: $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ pH 5,6; B: metanol:voda 90:10 (v/v). Pribeh gradientu 15 min 0-20 % B, 10 min 20-100 % B, 30 min 100 % B.

bol pomerne zložitý a i keď metódou vnútorného štandardu boli identifikované viaceré píky, metódou porovnania absorpčných

maxím s využitím detektora s pol'om diód sa spoľahlivo podarilo identifikovať len uracil a adenosín. Paralelne bola uskutočnená aj analýza komerčného extraktu Gistex Standard. Z porovnania koncentrácie uracilu a adenosínu (tab.1.) v štandarde a v pripravenej vzorke je zrejme, že komerčný preparát je vyrobený šetrnejším postupom, vzhľadom na nižšiu koncentráciu koncových produktov degradácie nukleových kyselín - nukleozidov a báz. S využitím uvedených analytických metód je možné v extrakte mapovať produkty degradácie nukleových kyselín a spätne modifikovať podmienky autolýzy s cieľom akumulovať v kvasničnom extrakte hladinu 5' -nukleotidov, ktoré môžu významne ovplyvniť jeho senzorké vlastnosti.

Tab.1. Charakteristiky analýzy adenosínu a uracilu vo vzorkách kvasničných extraktov CHTF STU a Gistex Standard stanovené metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie na reverznej fáze.

Vzorka	URACIL			ADENOSÍN		
	čas [min.]	I_{\max} [nm]	c [g.kg ⁻¹]	čas [min]	I_{\max} [nm]	c [g.kg ⁻¹]
štandard	4,9	258-260 200-201	-	29,6	259-260 192	-
CHTF STU	4,9	258-260 200-201	3,7	29,4	258-261 191-192	0,3
Gistex	4,9	258-260	0,7	-	-	-

Zlepšenie kvality pripravovaných kvasničných extraktov zvýšením koncentrácie 5' -nukleotidov je možné principiálne niekoľkými spôsobmi. Prvou možnosťou je hľadanie takých podmienok autolýzy, kedy dochádza k zvýšenej aktivite 5' -nukleáz, ktoré sú však v kvasničnej bunke zastúpené minoritne, ďalej potlačením aktivity nukleáz a fosfatáz počas autolýzy, pričom vysokomolekulová RNA je, po extrakcii z buniek, modifikovaná exogénnymi 5' -nukleázami. Tretou možnosťou je izolácia RNA priamo z intaktných kvasiniek, z ktorej sa pôsobením špecifických nukleáz pripravujú 5' -nukleotidy, ktoré slúžia na fortifikáciu kvasničného extraktu. Vzhľadom na to, že prvý postup sa nám na základe literárnych poznatkov zdal málo efektívny, odskúšali sme posledné dve menované možnosti.

S cieľom ovplyvniť kvalitu vytýpaných produktov ako aj pre hlbšie pochopenie procesu sme sledovali počas autolýzy aktivitu rozhodujúcich hydroláz v závislosti od rôznych faktorov (teplota, pH, iónová sila, dielektrická konštanta, atď.). Popri proteinázach, glukonázach sme stanovovali i aktivitu nukleáz a fosfatáz v priebehu autolýzy kvasiniek pekárského droždia. Vzhľadom na rozsah a zameranie tejto práce neuvádzame podrobnejšie dosiahnuté výsledky. Obmedzíme sa na konštatovanie, že nukleázy a kyslá fosfatáza sú podľa našich výsledkov aktivované počas autolýzy pri 50 °C prídavkom anorganických solí a naopak inhibované prídavkom organických rozpúšťadiel. Indukovaná autolýza zameraná na prípravu extraktov obohatených o 5' -nukleotidy by mala byť iniciovaná skôr zvýšením iónovej sily, prídavkom anorganických solí a následne rozštiepením enzymaticky neodbúranej RNA.

Ďalej sme odskúšali niekoľko postupov izolácie RNA a to nielen s cieľom pripraviť 5' -nukleotidy na fortifikáciu kvasničných extraktov, ale tiež z hľadiska jej ďalšieho uplatnenia ako suroviny pre výrobu farmaceutických preparátov pre humánnu i veterinárnu medicínu.

Vzhľadom na to, že nukleové kyseliny predstavujú z technologického hľadiska významný komponent kvasničnej bunky, rozhodli sme sa v tomto prípade do určitej miery upraviť pôvodnú

frakcionačnú stratégiu. Cieľom alternatívneho postupu je v prvom kroku extrakcia nukleových kyselín. RNA sme z intaktných buniek pekárského droždia izolovali jednak extrakciou s využitím amoniaku, roztoku NaCl a kombinácie NaCl s NaOH. Efektivitu extrakcie sme posúdili na základe podielu uvoľnených nukleových kyselín z intaktnej biomasy pekárského droždia. Výsledky sú uvedené v tab.2. Porovnaním výťažkov extrakcie bolo zistené, že nukleové kyseliny sú najlepšie uvoľňované s využitím zmesi NaCl (1,0 g na g sušiny buniek) a NaOH (0,025 g na g sušiny buniek), kedy po 4-hodinovej hydrolýze pri 100 °C dochádza k uvoľneniu až 90 % intracelulárnej RNA. V ďalšom kroku sme sa pokúsili o precipitáciu vyextrahovanej RNA. Overili sme tri popísané spôsoby a síce zrážanie prídavkom zmesi NaCl (1 mol.dm⁻³) a 95% etanolu (1:1), precipitáciu úpravou pH (1 mol.dm⁻³HCl) na hodnotu pH-2 a dvojstupňové zrážanie RNA najskôr oxyslením alkalického extraktu na hodnotu pH-5 (1 mol.dm⁻³HCl). Vyzrážaný precipitát bol odseparovaný centrifugáciou a RNA bola získaná opätovnou úpravou pH supernatantu s HCl (1 mol.dm⁻³) na hodnotu pH-2. Výsledky precipitácie RNA sú zaznamenané v tab.3, z ktorej vyplýva, že najvýhodnejší spôsob je využitie extrakčnej zmesi NaCl s NaOH a následná precipitácia oxyslením na hodnotu pH-2. Získaný precipitát predstavuje 55 % z celkového obsahu RNA v kvasničných bunkách. Biomasa pekárského droždia, po extrakcii RNA, bola ďalej využitá na prípravu preparátov lipidickej (fosfolipidy, ergosterol) a polysacharidovej (manoproteíny, 1,3- β -D-glukán) povahy.

Tab.2. Podiel nukleových kyselín [%] uvoľnených v priebehu extrakcie 10 %-nej suspenzie intaktného droždia do mimobunkového priestoru v závislosti od použitého extrakčného činidla (NH₃, NaCl+NaOH).

Extrakčné činidlo	Podmienky extrakcie	Podiel vyextrahovaných nukleových kyselín [%]
NH ₄ OH (25% obj.)	0,1g NH ₃ /g droždia 60°C, 15 minút	30,0
NaCl	1,6 g NaCl/g droždia 100°C, 4 hodiny	34,5
NaCl + NaOH	1,01 g NaCl/g droždia 0,025 g NaOH/g droždia 100°C, 4 hodiny	90,0

Z priemyselného hľadiska najväčšia časť izolovanej RNA sa využíva v potravinárskom priemysle vo forme 5' -nukleotidov (zvýrazňovačov chuti) po hydrolýze špecifickými nukleázami, predovšetkým mikrobiálneho pôvodu. K tomuto účelu je však možné využiť tiež preparát získaný extrakciou sladových klíčkov, s ktorým sme zahájili na našom pracovisku príslušné experimenty.

Izolovaný preparát RNA sme ďalej v spolupráci so š.p. Bioventa Nitra, spolu s izolovanou frakciou nukleotidov zo supernatantnej frakcie autolýzátu (separácia na aktívne uhlie s následnou elúciou s 50 %-ným etanolom pH 13) testovali pri príprave veterinárnych preparátov (toník), ktorých účinnou zložkou je organicky viazaný fosfát. Získanú vysokomolekulárnu RNA sme upravili alkalickou (1 mol.dm⁻³ NaOH, 20 minút, teplota 90 °C), resp. kyslou (0,5 mol.dm⁻³ HClO₄, 20 minút, teplota 90 °C) hydrolýzou, vzhľadom na to, že polymérna RNA sa pomerne zle rozpúšťa a vo výrobku často vytvára opalescenciu roztoku. Zastúpenie nukleotidov vo všetkých troch preparátoch sme

charakterizovali izotachoforetickým stanovením (tab.4), pričom bolo potvrdené, že tiež chemickou hydrolyzou (kyslou i alkalickou) je polymérna RNA štiepená na 3' -nukleotidy. Prípravky testované na pokusných králikoch boli hodnotené ako účinné a aplikovateľné. Nedostatkom preparátu pripraveného s využitím izolovanej frakcie nukleotidov po autolýze, bola značná koncentrácia degradačných produktov proteínov, ktoré spôsobujú nestabilitu preparátu spojenú s vypadávaním zrazeniny.

Tab.3. Podiel nukleových kyselín [%] získaných precipitáciou RNA extrahovanej z intaktného droždia. V experimente boli použité nasledovné spôsoby precipitácie:

1. prídavok zmesi NaCl: etanol (1:1) $c_{\text{NaCl}}=1 \text{ mol.l}^{-1}$
2. úprava pH s HCl ($c_{\text{HCl}}=1 \text{ mol.l}^{-1}$) na hodnotu 2
3. úprava pH s HCl (1 mol.l^{-1}) najskôr hodnotu 5 (oddelenie precipitátu), následné okyslenie na pH 2

Extraktčné činidlo	Spôsob precipitácie	Podiel nukleových kyselín v precipitáte [%]
NH ₃ OH (25% obj.)	1	41
	2	43
	3	33
NaCl	1	12
	2	78
	3	1
NaCl + NaOH	1	14
	2	60
	3	12

Tab.4. Izotachoforetická analýza zastúpenia nukleotidov v alkalickom a kyslom hydrolyzáte RNA a zmesi nukleotidov po indukovanej autolýze

Injekčný preparát	Zloženie	c [mg.ml ⁻¹]
Alkalický hydrolyzáat RNA	3'UMP	0,1075.10 ²
	3'GMP	0,0274.10 ²
	3'AMP	0,0442.10 ²
	3'CMP	0,0336.10 ²
Kyslý hydrolyzáat RNA	3'UMP	0,1075.10 ²
	3'GMP	0,0190.10 ²
	3'AMP	0,0210.10 ²
	3'CMP	0,0364.10 ²
Frakcia nukleotidov	3'UMP	0,0903.10
	3'GMP	0,0038.10
	3'AMP	0,0378.10
	3'CMP	0,0336.10

Liečivá na báze nukleotidov a nukleozidov po derivatizácii sa uplatňujú tiež v humánnej medicíne, ako účinné preparáty pri terapii viacerých druhov ochorení. V spolupráci s Katedrou organickej chémie UPJŠ v Košiciach sme sa začali zaoberať systematicky prípravou farmaceutických preparátov na báze monomérov nukleových kyselín, získaných v rámci komplexnej frakcionácie pekárskeho droždia.

LITERATÚRA

- [1] VRANÁ, D.: Kvasinky ve výskumu a praxi. Academia Praha, 1986, s.371.
- [2] CHU, C.K.-BHADTI, V.S.-DOSHI, K.J.-ETSE, J.T.: J.Med.Chem., **33**, 1990, s.2188.
- [3] KUNINAKA, A.: In Biotechnology vol. 4, VCH, Weinheim, 1986, s.73
- [4] MITCHEL, K.E.I.: Biochim. Biophys. Acta, **309**, 1973, s.116
- [5] NAKAO, Y.: Microb.Technol. **1**, 1979, s.311
- [6] ANDERSSON, M.-CHRISTENSSON, P.I.-LEWAN, L.: Int.J.Biochem. **19**, 1987, s.641.
- [7] Jap.Patent 3816892
- [8] KELLY, M.: In Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry, Nahr Press, 1983, s.457
- [9] SMOLENSKI, R.T.-LACHNO, D.R.-LEDIGHAM, S.J.M.: J.Chromatogr. **527**, 1990, s.414
- [10] ŠTURDÍK, E. a kol.: Kvas.prům., **35**, 1989, s.74
- [11] KOLLÁR, R. a kol.: Kvas.prům., **36**, 1990, s.304
- [12] KOLLÁR, R. a kol.: Kvas.prům., **37**, 1991, s.12
- [13] SPIRIN, A.S.: Biochimija, **23**, 1958, s.658
- [14] LOWRY, H.D. a kol.: J.Biol.Chem. **193**, 1951, s.265
- [15] KOLLÁR, R. a kol.: Bull. potravín. výs., **28**, 1989, s.45
- [16] KOLLÁR, R. a kol.: Biotechnol.Technics (v tlači)

Lektoroval Ing.F.Machek, CSc.

KOLLÁR, R.-ŠTURDÍK, E.-ROSENBERG, M.-VLNOVÁ, A.-FERENCÍK, B.: Komplexná frakcionácia kvasničnej biomasy. VIII. Zhodnotenie frakcie nukleových kyselín. Kvas.prům., **38**, 1992, č.12, s. 354 - 359

V rámci programu frakcionácie pekárskeho droždia zameraného na súčasnú prípravu kvasničného extraktu, invertázy, ergosterolu, fosfolipidov, biosorbentov na báze bunkových stien, β -glukánu, manoproteínov po indukovanej autolýze buniek, boli v tejto práci mapované degradačné produkty nukleových kyselín s cieľom zlepšiť kvalitatívne parametre produktov frakcionácie hlavne kvasničného extraktu. Okrem toho boli preverené niektoré metódy izolácie RNA s cieľom využitia získaných preparátov pre veterinárne, potravinárske a medicínske aplikácie.

Коллар, Р. - Штурдик, Е. - Росенберг, М. - Влнова, А. - Ференчик, Б.: Комплексное фракционирование дрожжевой биомассы. VIII. Оценка фракции нуклеиновых кислот. Квас. прум., **38**, 1992, №12, стр.354 - 359

В рамках программы фракционирования хлебопекарных дрожжей, направленной на одновременное получение дрожжевого экстракта, инвертазы, эргостерола, фосфолипидов, биосорбентов на базе клеточных стенок, β -глюкана, манопroteинов, после индуцированного автолиза клеток, в настоящей работе проводилась съемка продуктов деградации нуклеиновых кислот с целью улучшить количественные параметры продуктов фракционирования главного дрожжевого экстракта.

Кроме того были проверены некоторые методы изолирования РНА с целью использования полученных препаратов для ветеринарных, пищевых и медицинских приложений.

KOLLÁR, R.-ŠTURDÍK, E.-ROSENBERG, M.-VLNOVÁ, A.-FERENCÍK, B.: Fractionation of yeast Biomass. VIII. Utilization of Nucleic Acids Fraction. Kvas.prům., **38**, 1992, No.12, pp 354 - 359

This part is focussed on products obtained from the degradation of nucleic acids, with the aim of improving the qualitative parameters of these products. In addition, some methods of the RNA isolation were also tested. The isolated preparates of RNA could be applied in veterinary or human medicine and in food stuffs.

**KOLÁR, R.-ŠTURDÍK, E.-ROSENBERG, M.-VLNOVÁ, A.-FER
ENČÍK, B.: Komplexe Fraktionierung der Hefebiomasse. VIII.
Auswertung der Fraktion der Nukleinsäuren. Kvas.prům., 38, 1992,
Nr.12, S. 354 - 359**

Im Rahmen des Programms der Fraktionierung der Backhefe, das auf die gleichzeitige Aufbereitung von Hefeextrakt, Invertase, Ergosterol, Phospholipiden, Biosorbenten auf Zellwände-Basis, β -Glukan, Manopro-

teinen, nach induzierter Zellaulyse, orientiert war, wurden in dieser Arbeit die Degradationsprodukte der Nukleinsäuren studiert mit dem Ziel der Verbesserung der qualitativen Parameter der Fraktionierungsprodukte, vor allem des Hefeextrakts. Außerdem wurden einige Methoden der RNA-Isolation getestet mit dem Ziel der Ausnützung der gewonnenen Präparate in veterinären und medizinischen Applikationen und in der Lebensmittelindustrie.