

Sledovanie obsahu nukleových kyselín v bunkách pekárskych kvasiniek

Časť II. Experimentálne výsledky

JÁN ARPAI, DARIA LONGAUEROVÁ, ZUZANA LEŠKOVÁ, JUDITA TOMIŠOVÁ,
Mikrobiologické oddelenie, Ústredný výskumný ústav potravinárskeho priemyslu, pobočka Bratislava

547.963.32
683.12

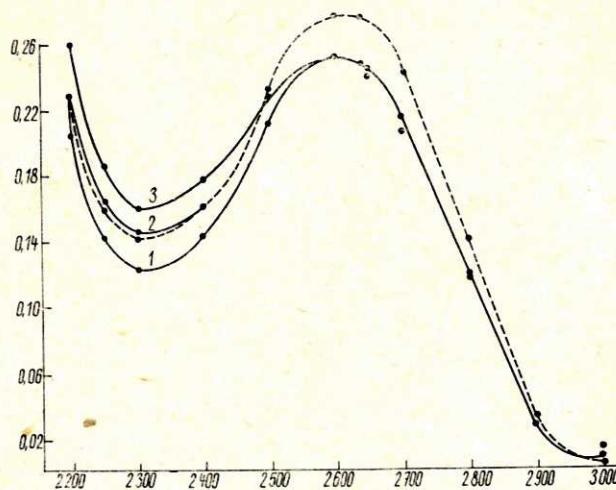
Pokusný materiál

Popri čerstvom pekárskom droždi „z obchodu“ sme použili ako pokusný materiál 7 kmeňov *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré sme obdržali z Výskumného ústavu liehovarského a konzervárenského priemyslu v Bratislave.

Výsledky

O tom do akej miery je potrebné dodržiavať pracovnú techniku podľa uvedenej metodiky nasvedčujú rozdiely medzi UV-absorpčnými spektrami nukleových kyselín kvasinek, ktoré znázorňuje obr. 1. Rozdiely vznikli tým, že sa niektoré z metodických podmienok nedodržali, napr. skrátil sa čas vytrepávania alebo odstredenia, resp. teplota pri extrakcii, čo malo za následok zníženú čistotu extraktu v porovnaní k štandardu.

Pokusný materiál sa podrobil analýze hneď po obdržaní a príslušné „východiskové“ hodnoty obsahu nukleových kyselín sú zhrnuté do tabuľky 1. Keď sa množstvá nameraných nukleových kyselín, stanovené v kvasničných suspenziach o koncentráciách len málo rozdielnych, prepočítali na jednu bunku a na sušinu v jednotke objemovej, zistil sa nápadne nízky pomer medzi DNA a RNA, ktorý ležal v hraniciach 1 : 2 až 2,5. Tiež absolútny obsah nukleových kyselín kvasiniek, a zvlášť obchodného droždia, bol vo východiskovom materiáli veľmi níz-



Obr. 1. Odraz dodržiavania metodiky na čistote nukleových kyselín izolovaných z kvasiniek, znázornený na základe UV-absorpčného spektra

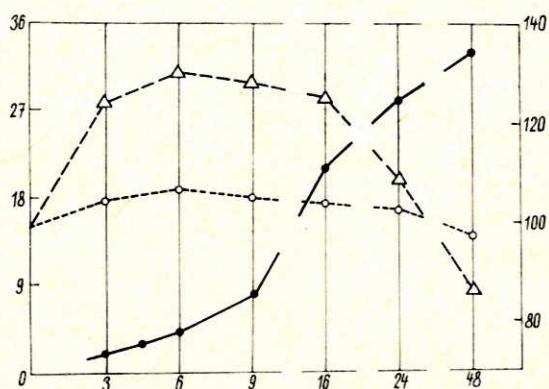
Prerušovaná čiara zodpovedá štandardným spôsobom vyčistenému extraktu; plné čiary prislúchajú extraktom získaným pri nižšej teplote (o 20 %) a za skrátený čas extrakcie o 30 % a 60 % (krivky 1 a 2) resp. pri polovičnom čase odstredenia (krivka 3)

Tabuľka 1

Obsah nukleových kyselín v sledovanom kvasničnom materiáli (východiskový stav)

| Označenie pokusného materiálu | RNA | | DNA | | Celkové NK % |
|----------------------------------|--|--|--|--|-----------------|
| | v ml vyšetrovanej suspenzie g . 10 ⁻⁵ | prepočítané na bunku g . 10 ⁻¹² | v ml vyšetrovanej suspenzie g . 10 ⁻⁵ | prepočítané na bunku g . 10 ⁻¹² | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae,</i> | | | | | |
| kmeň Ri | 1,65 | 0,72 | 0,721 | 0,38 | 3,87 |
| kmeň S7/1 | 1,77 | 0,88 | 0,781 | 0,39 | 4,15 |
| kmeň S7/2 | 1,45 | 0,81 | 0,628 | 0,34 | 5,59 |
| kmeň S7/3 | 1,67 | 0,70 | 0,814 | 0,34 | 4,25 |
| kmeň S7/4 | 1,72 | 0,83 | 0,804 | 0,32 | 4,75 |
| kmeň H ₃ | 1,33 | 0,84 | 0,611 | 0,39 | 5,14 |
| kmeň H ₈ | 1,57 | 0,69 | 0,593 | 0,31 | 3,95 |
| Droždie (z obchodu) | 1,12 | 0,56 | 0,805 | 0,30 | 3,32 |

ky, a to isté platí aj pre percentuálny podiel nukleových kyselín na sušine bunky. Takýmito pomermi sme sa pri štúdiu nukleových kyselín u baktérií stretli iba v prípadoch, keď sa ich metabolizmus, resp. rast a rozmnožovanie pod vplyvom nedostatočných zdrojov výživy zabrzdil (Arpai, Lešková a Longauerová 1965). Individuálne rozdiely medzi jednotlivými kmeňmi sme — vychádzajúc zo skúseností predchádzajúcich prác — nevyhodnotili. Spoznali sme totiž, že kultivačné podmienky a vek kultúry do takej miery podmieňujú množstvo nukleových kyselín v bunke, že vzájomné porovnávanie rôznych kmeňov je z tohto hľadiska možné iba pri prísnom dodržiavaní limitujúcich faktorov, najlepšie pri synchronnom raste. Výsledky našich pokusov potvrdzujú, že je tomu tak aj u kvasiniek. Na základe priemerných pokusných výsledkov je na obr. 2 znázorený priebeh zmien, resp. pohybu obsahu nukleových kyselín v kvasničných bunkách priebehom rastu kultúry, ktorý je typický tým, že podiel nukleových kyselín na biomase dosahuje maximum vo fáze logaritmického rastu, keď obnáša až vyše 11 % (v priemere 11,28 %). Tento poznatok uverejnil už pred nami Konovalov (1962), ale napriek tomu obstojí len potiaľ, kým sa množstvo nukleových kyselín vyjadruje vo vzťahu ku kvasničnej biomase v objemovej jednotke kultúry. Keď sa však nukleové kyseliny prepočítajú na jednu bunku, rozlišujúc bunky pučiace od buniek nedelia-



Obr. 2. Zmeny obsahu nukleových kyselín v bunkách kultúry kvasinek

—●—●—● rastová krivka; —△—△—△— relativné zmeny RNA; —○—○—○— relat. zmeny DNA. Na osi úsečiek — čas v hodinách; na osi poradníc vľavo — sušina biomasy v mg/ml; vpravo — zmeny v podiele NK v % (počiatocná hodnota — 100 %)

cich sa, a to menovite v synchronne rastúcej kultúre, tak sa zistuje, že k najväčšiemu prírastku množstva nukleových kyselín dochádza v bunkách, nachádzajúcich sa v štadiu tesne pred započatím rozmnožovania, t. j. pučania, kym najvyššiu hladinu dosahuje obsah nukleových kyselín v bunkách už pučiacich. Tento pohyb v obsahu nukleových kyse-

Tabuľka 2

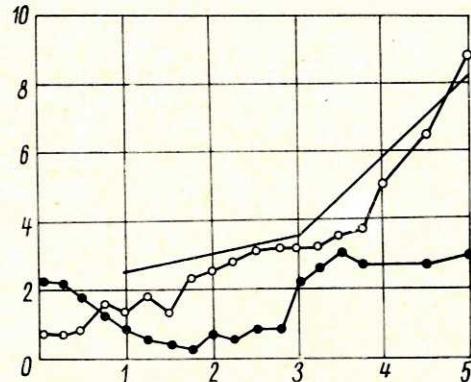
| Čas v h | Celkové množstvo nukleových kyselín v kvasičnej bunke (g · 10 ⁻¹²)* | | | |
|---------|---|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | za anaerobných podmienok | | za aerobných podmienok | |
| | — 10 ⁹ /ml | — 10 ⁷ /ml | — 10 ⁹ /ml | — 10 ⁷ /ml |
| 0 | | 0,81 | | |
| 8 | 1,12 | 1,25 | 1,63 | 1,75 |
| 16 | 1,63 | 1,65 | 1,80 | 2,33 |
| 24 | 1,95 | 2,11 | 2,94 | 3,21 |
| 48 | 1,90 | 2,20 | 3,05 | 2,85 |

* Priemerné hodnoty v g (pokusný organizmus: kmeň S7/2)

Tabuľka 3

Vplyv zvýšenej (+), resp. zníženej (-) koncentrácie obsahu amónnych a fosfátových iónov v médiu na celkový obsah nukleových kyselín v kvasinkách

| NH_4^+ | PO_4^{3-} | Celkový obsah nukleových kyselín (v % sušiny) | Celkový obsah nukleových kyselín (v % sušiny) | |
|-----------------|--------------------|---|---|--------|
| | | | normál | normál |
| + | + | 11,87 | | |
| + | - | 11,05 | | |
| - | + | 5,38 | | |
| - | - | 3,15 | | |
| normál | + | 6,27 | | |
| normál | - | 4,58 | | |
| + | normál | 5,65 | | |
| - | normál | 4,93 | | |
| normál | normál | 5,60 | | |



Obr. 3.
Množstvo pučiacich (—○—○—○— krivka) a nepučiacich (—●—●—●— krivka) kvasničnych buniek v prvých 5 hodinach po obnovení rastu (synchronizácia hladovaním) a zmeny v pomere obsahu RNA : DNA v príslušnom čase. Na osi úsečiek — čas v hodinách; na osi poradníc — počet buniek $\times 10^6/\text{ml}$, resp. čiselná stupnica vyjadrujúca pomer RNA : DNA

lin je vyvolaný z prevažnej časti následkom zmien v biosyntéze RNA, kym zložka DNA v priebehu rastu a rozmnožovania kvasničnej bunky javí len relativne malé kvantitatívne výkyvy. Týmto dochádza k výrazným presunom vo vzájomnom pomere DNA : RNA, ktorý v závislosti na fyziologickom stave kultúry sa pohyboval za našich pokusov v hraniciach od 1 : 2 až po 1 : 9, ako to vidieť z grafu na obr. 3.

Tu treba poznamenať, že sme za žiadnych okolností nezistili taký obsah nukleových kyselín v kvasinkách, pri ktorom pomer DNA : RNA dosahoval hodnoty 1 : 100, ako to uvádzá Konovalov (1962).

Výsledky niektorých pokusov, ktorých cieľom bolo sledovať možnosti ovplyvnenia obsahu nukleových kyselín podmienkami kultivácie sú zostavené do tabuľiek 2 a 3. Z nich vidieť aké sú rozdiely medzi obsahom nukleových kyselín pri aerobnej a anaerobnej kultivácii kvasinek, ako aj vplyv koncentrácie amónnych a fosfátových iónov.

Predložená časť prác venovaných štúdiu nukleových kyselín kvasinek ukazuje na niektoré faktory, od ktorých závisí obsah nukleových kyselín v bunke a možnosti ovplyvnenia ich hladiny. Vzhľadom na to, že pre teoretické štúdium, ako aj pre priemyselné využitie je nielen množstvo, ale aj zloženie nukleových kyselín významné, a to vyplýva už z úvodnej časti, pokračujeme v sledovaní mononukleotidovej zostavy kvasničnej RNA.

Súhrn

Prináša sa podrobny opis metodiky na stanovenie nukleových kyselín kvasinek (DNA a RNA), pomocou ktorej sa stanovoval obsah nukleových kyselín v rôznom kvasničnom materiáli. Sledovali sa zmeny hladiny nukleových kyselín a vzájomného pomeru DNA ku RNA v rastúcej kultúre, resp. pri pučaní bunky. Zistovali sa niektoré vplyvy kultivačných podmienok a výživy na množstvo nukleových kyselín obsažených v kvasinkách, našli sa

podmienky, za ktorých sa zvýši obsah RNA prie-
merne o 20 %.

Literatúra

- [1] Arpai, J.-Janotková, D.: Štúdium prania kvassiniek. = „Kvasný průmysl“, 4, 1958: 223, 249.
- [2] Arpai, J.-Lešková, Z.-Longauerová, D.: Effect of lowered incubation temperatures on nucleic acid and protein synthesis by a mesophilic and a psychrophilic bacterium. = „Fol. microbiol.“, 10, 1965: 188.
- [3] Campbell, A.: Division synchronization in a respiratory deficient yeast. = „J. Bacteriol.“, 74, 1957: 559.
- [4] Hara, T.-Koaze, Y.-Yamada, Y.-Kojima, M.-Sato, K.-Aoyama, Y.: Studies on production of nucleic acid and its related compounds by microorganisms., 4. Inosinic acid production by organic and biochemical method. = „Agr. Biol. Chem.“, 28, 1962: 747.
- [5] Chargaff, E.-Davidson, J. N.: The Nucleic Acids, Academic Press, New York 1955.
- [6] Keil, B.-Šormová, Z. a kolektív: Laboratorní technika biochemie, Nakl. ČSAV, Praha, 1959.
- [7] Kodama, S.: On a procedure for separating inosinic acid. = „J. Tokyo Chem. Soc.“, 34, 1913: 751.
- [8] Konovalov, S. A.: Biohimija drožej, Piščepromizdat, Moskva 1962.
- [9] Kuninaka, A.: Studies on the decomposition of nucleic acid by microorganism. I. On the nucleases of Aspergillus oryzae. = „J. Agr. Chem. Soc. Japan“, 28, 1954: 262.
- [10] Kuninaka, A.: Studies on the decomposition of nucleic acid by microorganisms. 6. On the ribosidase of Aspergillus oryzae acting on 6 - hydroxypurine ribonucleosides and their 5' - monophosphates. = „Bull. Agr. Chem. Soc. Japan“, 23, 1959: 281.
- [11] Kuninaka, A.: Studies on taste of ribonucleic acid derivatives. = „J. Agr. Chem. Soc. Japan“, 1960: 489.
- [12] Kuninaka, A.-Kibi, M.-Sakaguchi, K.: History and development of flavor nucleotides. = „Food technology“ 18, 1964: 287.
- [13] Lowry, O. H.-Rosenbrough, N. J.-Farr, A. L.-Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin - phenol reagent. = „J. Biol. Chem.“, 193, 1951: 265.
- [14] Ogur, M.-Minckler, S.-McClary, D. O.: Desoxyribonucleic acid and the budding cycle in the yeasts. = „J. Bacteriol.“, 68, 1963: 642.
- [15] Ogur, M.-Rosen, G.: The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. = „Arch. Biochem. Biophys.“, 25, 1950: 262.
- [16] Prescott, S. C.-Dunn, C. G.: Industria microbiology, McGraw-Hill Book Company, New York 1949.
- [17] Shimazono, H.: Distribution of 5' - ribonucleotides in foods and their application to foods. = „Food technology“, 18, 1964: 294.
- [18] Wagner, J. R.-Titus, D. S.-Schade, J. E.: New opportunities for flavor modification. = „Food Technology“, 17, 1962: 730.

Došlo do redakce 2. 8. 1965.

ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКАХ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ

В статье описывается подробно метод определения нуклеиновых кислот как группы рибо- так и дезокси- в дрожжах. Изучалось общее содержание нуклеиновых кислот и определялось взаимное отношение кислот приведенных групп в разных фазах вегетации культуры. Далее изучалось влияние условий культивации и питания на содержание кислот. Были установлены условия, обеспечивающие повышение содержания рибонуклеиновых кислот примерно на 20 %.

VERFOLGUNG DES NUKLEINSÄURENGEHALTS IN DEN BACKHEFEZELLEN

Die Methodik zur Bestimmung der Nukleinsäuren (DNK und RNK) der Hefen wird ausführlich beschrieben. Mittels der angeführten Methode wurde der Nukleinsäuregehalt in verschiedenen Hefematerialien bestimmt. Es wurden die Veränderungen des Nukleinsäuregehalts und des gegenseitigen Verhältnisses der D NK zur RNK in der wachsenden Kultur, bzw. bei der Zellensprossung bestimmt. Es wurden die Einflüsse der Kultivations- und Nahrungsbedingungen auf die Menge der in der Hefe enthaltenen Nukleinsäuren ermittelt; auch wurden die Bedingungen festgestellt, unter denen der RNK-Gehalt im Durchschnitt um 20 % ansteigt.

NUCLEIC ACIDS IN THE CELLS OF BAKERY YEAST

The article deals in details with the determination of nucleic acids of the ribo - and desoxy - groups in yeast. The changes in the level of acids and proportions of the two mentioned groups in various stages of vegetation have been studied, as also the effect of cultivating conditions and nutrition upon the content of acids. Conditions have been determined under which the concentration of the ribonucleic acids can be increased by roughly 20 %.

