

## Význam a použitie kyseliny ribonukleovej z droždia

EMIL PÍŠ

Súhrn. Autor sústreďuje pozornosť na kyselinu ribonukleovú v pekárskom droždí. Opisuje spôsob izolácie a poukazuje na možnosti jej použitia.

Z mikroorganizmov obsahujúcich nukleové kyseliny majú práve kvasinky predpoklad na osvetlenie problematiky ich využitia z hľadiska metabolizmu biologickej funkcie, biosyntézy a genetiky a napokon aj fermentačnej výroby. Ak sa sústredíme z polynukleotidov na kyselinu ribonukleovú, zúčastňujúcu sa na syntéze bielkovín v cytoplazme a na jej zužitkovanie mimo pôvodnej kvasničnej bunky, narazíme na oblasť, ktorá nás do istej miery prekvapí, a preto pripájame k známym skutočnostiam niekoľko skúseností s pokusnou izoláciou kyseliny ribonukleovej z pekárskeho droždia.

Prírodným zdrojom na prípravu nukleových kyselín, teda aj kyseliny ribonukleovej sú kvasinkovité mikroorganizmy, ako napr. druh *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, ktorých kvasničná hmota obsahuje nukleové kyseliny DNA a RNA. Sú to makromolekulové polynukleotidy vytvorené z mnohých nukleozidov, ktoré sú navzájom spojené fosfodiesterickými väzbami prostredníctvom zvyškov kyseliny fosforečnej. Molekuly RNA sa líšia od DNA vo viacerých smeroch: ich polyméry sú jednozávitnicové reťazce na rozdiel od dvojitej závitnice DNA; namiesto zvyškov deoxyribózy obsahujú RNA zvyšky ribózy; namiesto tymínu obsahujú RNA pyrimidínovú bázu uracil.

RNA sa v bunke syntetizuje enzýmom polymeráza RNA, ktorý závisí od prítomnosti DNA. Polymeráza RNA sa skladá z troch typov podjednotiek, ktoré tvoria jadro enzýmu a katalyzujú tvorbu fosfodiesterických väzieb vo vznikajúcej molekule RNA. K tomuto jadru enzýmu sa dočasne pripájajú tzv. faktory iniciácie, ktoré určujú miesto pripojenia enzýmu k matrici DNA. V celom procese syntézy RNA rozoznávame tri štádiá — začiatok, štart syntézy (iniciácia), predlžovanie polyméru (elongácia), a skončenia syntézy (terminácia).

Ing. Emil Píš, SLOVLIK, n. p., závod 01, 911 74 Trenčín.

Podľa funkcií v metabolizme bunky rozoznávame tri skupiny RNA — mediátorová RNA (mRNA), ribozómová RNA (rRNA) a transferová RNA (tRNA). Proces biosyntézy bielkovín vyžaduje prísnu súhru týchto troch typov nukleových kyselín. 70S ribozómy majú dve podjednotky: 30S a 50S. Mediátorová RNA sa viaže na 30S podjednotku, kým tRNA sa viaže na 50S podjednotku. Tri bázy v tRNA majú funkciu antikódonu a špecificky sa párujú so zodpovedajúcim kódomom v mRNA. Samozrejme, samé tieto tri báзовé páry nepostačujú na stabilizáciu tRNA s mRNA. Je tu aj ďalšie väzbové miesto na 50S podjednotke. Iniciácia sa vždy začína s *N*-formyl-metionyl-tRNA, pre ktorú existuje špecifická tRNA, a tá sa viaže na 30S podjednotku ribozómu. Iniciačný komplex sa spája s 50S podjednotkou. Translácia prebieha postupným posunom mRNA v smere 5'—3', v dôsledku čoho sa umiestňuje tRNA na A-väzbové miesto ribozómu, kým ďalšia tRNA je v P-väzbovom mieste. Tvorba peptidovej väzby prebieha v tejto konfigurácii. Môže sa vytvoriť len niekoľko bielkovinových reťazcov, koľko je ribozómov na mediátorovom vlákne. Tieto polyribozómy alebo polyzómy umožňujú rýchle znásobenie genetickej informácie do bielkovín. Na polyzóme každá tRNA spojená s aminokyselinou pridáva svoju aminokyselinu k novovznikajúcemu polypeptidovému reťazcu. Po tejto reakcii sa voľne tRNA vracajú do pohotovostnej zásoby a môžu sa použiť na ďalšie syntézy. Na druhej strane zakončenia reťazca signalizujú kódony UAG, UAA alebo UGA, ktorým nezodpovedajú žiadne tRNA, ktoré čítajú terminačné signály. tRNA má okrem toho kľúčovú úlohu v translačnom procese pri aktivácii aminokyselín. Pretože sa tRNA zúčastňuje na všetkých procesoch biosyntézy bielkovín, má niekoľko špecifických rozoznávacích miest pre rozličné enzýmy a polyméry.

Ribozómové RNA (rRNA) sú zložkami ribozómov, na ktorých sa odohráva syntéza bielkovín. 70S ribozómy sa skladajú z dvoch podjednotiek — 30S a 50S. 30S podjednotka obsahuje 16S RNA a 21 špecifických bielkovín, kým 50S podjednotka obsahuje 23S RNA, 5S RNA a 34 špecifických bielkovín. 16S a 23S RNA sú jednovláknité s rozličnými sekundárnymi štruktúrami vytvorenými v dôsledku samovvinutia sa reťazcov. V ribozomálnych podjednotkách chránia ribozomálne bielkoviny RNA proti účinku nukleáz. Stabilita ribozomálneho komplexu závisí výrazne od koncentrácie iónov  $Mg^{2+}$ , ktoré zase, naopak, závisí od fyziologického stavu ribozómov. Vo funkčnom stave, počas translácie sa ribozomálne podjednotky pevne viažu, kým voľné ribozómy sa nachádzajú v dynamickej rovnováhe medzi 50S, 30S a 70S časticami.

Kvasinky ako zdroj nukleových kyselín majú aj z hľadiska výroby dostupnosti formovateľnejší obsah nukleových kyselín. Experimentálne výsledky ukázali, že ten závisí od kultivačných podmienok a veku kultúry do takej mie-

ry, že podmieňuje množstvo nukleových kyselín v bunkách i pri vzájomnom porovnávaní kmeňov. Pohyb obsahu nukleových kyselín v kvasničných bunkách závisí od rastu biomasy; maximum dosahuje vo fáze logaritmického rastu, až 11 %. K najväčšiemu prírastku množstva nukleových kyselín dochádza v bunkách tesne pred začatím množenia a najvyššia hladina je v pučiacich bunkách. Podiel DNA javí v priebehu rastu a rozmnožovania bunky iba malé kvantitatívne výkyvy, preto pohyb v obsahu nukleových kyselín vyvolávajú zmeny v biosyntéze RNK.

Pri sledovaní možnosti ovplyvnenia nukleových kyselín kultivačnými podmienkami, ako je napr. aeróbne a anaeróbne prostredie a vplyv koncentrácie amónnych a fosfátových iónov, sa ukázalo, že celkové množstvo nukleových kyselín v bunke, napr. pri začiatkovej koncentrácii biomasy  $0,81 \cdot 10^9 \text{ ml}^{-1}$ , je v aeróbnych podmienkach 1,63—3,05 %, v anaeróbných podmienkach 1,12—1,9 %. Pri zvýšenej koncentrácii  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{PO}_4^{3-}$  bol celkový obsah NK 11,87 %, pri zníženej iba 3,15 %. Pri zníženej koncentrácii  $\text{NH}_4^+$  a zvýšenej koncentrácii  $\text{PO}_4^{3-}$  bol 5,38 %. Pri zníženej koncentrácii  $\text{PO}_4^{3-}$  a zvýšenej koncentrácii  $\text{NH}_4^+$  bol obsah NK 11,05 %. Ako vidieť z príkladu, kultivačné podmienky so zmenou živienia prinesú zmenu obsahu nukleových kyselín až o 20 %.

Hoci sú kvasinky bohaté na nukleové kyseliny, nie sú najpriaznivejšie podmienky na ich izoláciu z natívnych preparátov, a to pre ich pevnú bunkovú blanu, ktorá si vyžaduje tvrdšie izolačné metódy a okrem toho kvasinky obsahujú dosť fermentov schopných štiepiť nukleové kyseliny už počas izolácie.

Nukleové kyseliny sa z kvasničných buniek izolujú priamou extrakciou suroviny zriedenými alkáliami alebo roztokmi solí a tlmivých roztokov. Z extraktu sa nukleové kyseliny zrážajú kyselinami alebo organickými rozpúšťadlami. Nukleoproteidy možno izolovať aj vopred a potom ich opatrne rozkladať. Tak dostávame nukleové kyseliny vo forme čo najbližšej natívnemu stavu.

Pre rozštiepenie komplexu RNK—proteín je viac postupov, z ktorých sú najvhodnejšie tie, pri ktorých sa denaturuje proteínový podiel. Na izoláciu vlastnej RNK je menej vhodná extrakcia alkáliami s následným zrážaním 1—2 N kyselinou soľnou. Výhodnejšia je extrakcia 10 % roztokom NaCl pri 90—95 °C, pri ktorej sa však úplne neinhibuje ribonukleáza, lebo je odolná až po teplotu varu.

Extrakt sa potom opatrne zráža pri 0 °C kyselinou na surovú RNK. Spôsob zrážania podmieňuje rozpustnosť RNK. Tak napr. RNK zrážaná pri pH 1,0 etanolom je vo vode takmer nerozpustná, kým pri pH 7,0 a za prítomnosti octanu sodného vzniká rozpustná sodná soľ RNK. Rozpustnosť v tomto zmysle nie je v priamom vzťahu s veľkosťou molekuly. Stupeň štiepenia sa dá určiť napr. ultracentrifugáciou, meraním viskozity a rozptylu svetla. Čistá RNK

má obsahovať 15—16 % N a asi 9 % P. Väčšinou však obsahuje skôr 8 % P, čo spôsobuje prítomnosť komplexu nukleotidu a aminokyseliny. Tieto frakcie možno dokázať po hydrolýze ninhydrínovou reakciou. Týchto frakcií je v kvasničnej RNK 3—5 %.

Pri izolácii RNK z droždia, ktorého bunky sú cenným materiálom pre viaceré biochemicky účinné komponenty, zvyčajne sa vychádza z alkalického extraktu, ktorý sa po odfiltrovaní zvyšujúcich buniek zrazí HCl a ďalej sa čistí. Výťažok závisí od podmienok fermentácie a jej reguláciou pomocou živín možno zvýšiť obsah RNK až o 20 %. Priemerný technický výťažok RNK z droždia kolíše od 3 do 5 % podľa výsledkov fermentácie a podľa použitého izolačného procesu.

RNK ako produkt je biely až žltkastý prášok bez zápachu, slabo kyslej chuti. Vo vode a v organických rozpúšťadlách je prakticky nerozpustná. Dobré sa rozpúšťa vo vodných roztokoch alkálií, v alkalicky reagujúcich soliach, ako napr. v octane sodnom, v glycerofosforečnane sodnom a v neutrálnych soliach, ako je napr. chlorid sodný. Obsah dusíka je asi 15 % a obsah fosforu takmer 9 %. Teoretický pomer dusíka k fosforu je asi 1,69. Dobré vyčistený preparát nedáva biuretovú reakciu. Exportné podmienky vymedzuje francúzsky liekopis (*Codex medicamentarius gallicus* 1949): strata sušením nesmie byť väčšia ako 7 %, minimálne množstvo dusíka v sušine je 14,5 %, minimálne množstvo fosforu v sušine je 9 %, s roztokom octanu sodného musí dávať číry roztok.

V sérii prác širšieho využívania kvasiniek a ich fragmentov na biochemické preparáty sa odskúšala v trenčianskej droždiarni aj laboratórna izolácia RNK vo viacerých izolačných variantoch. Pritom sa osvedčila modifikácia metódy z józsefvárosskej droždiarne v Budapešti.

Pri izolácii sa RNK zráža v podobe jej vápenatej soli, ktorá sa prečisťuje rozpúšťaním a ďalším vyzrážaním kyselinou soľnou. Niekoľkokrát prezrážaná RNK sa vysuší acetómom vo vákuu. Vyrobená RNK sa odskúšala aj biologicky na morčatách (dávky 1, 4 a 6 g na 1 kg hmotnosti), ktoré ju znášali dobre a histologické orgánové nálezy boli po 1, 2 a 3 mesiacoch bez patologických zmien. RNK slúžila aj na terapeutickú perorálnu aplikáciu, napr. u retardovaných detí alebo u pacientov s nervovými degeneratívnymi ochoreniami. Publikované pozorovania (doc. MUDr. A. Getlík, CSc.) sú také zaujímavé, že sa predpokladá ďalší dôkladný biochemický a klinický výskum, ktorý by mohol porovnať terapeutický efekt RNA s efektom celej kvasničnej biomasy alebo ich cytoplazmy ako nositeľa nielen RNA, ale aj cenných bielkovín a vitamínov. Pritom treba zdôrazniť, že laboratórny produkt z pekárskoho droždia bol vhodnejší ako priemyselný produkt.

Túto oblasť zamerania však prekrýva chemické a potravinárske využívanie RNK ako produktu s dobrou perspektívou pri výrobe napr. ochucovadiel, ktorá priamo nadväzuje na frakcionáciu kvasiniek vypracovanými technoló-

giami v sérii smerovania výroby na ochucovadlá, ergosterol, zymozán, biopreparáty, diagnostické preparáty, chemikálie. Podstatou technológie ochucovadiel je enzýmová hydrolýza kvasinkovej RNA na štyri stavebné nukleotidy, z ktorých sa môže získať kyselina guanylová (GMP) a kyselina inozínová (IMP), ktoré zlepšujú chuť potravín. Dodávajú im priaznivejší stupeň viskozity, sýtosti s priaznivejšou senzorikou. Tento technologický smer je ekonomicky priaznivejší, pokiaľ sa zahrnuje do kompletu celého procesu frakcionácie ako priamy proces, pri ktorom vysokoproduktívne kmene, napr. pre kyselinu glutamovú, môžu vylučovať intaktné nukleotidy.

Širšia línia frakcionácie kvasiniek, z ktorej rezultuje produkcia RNK so smerovaním až na ochucovadlá, nadväzuje tak na uplatňovanie biotechnológií. A tie sú dnes v popredí záujmu i cieľom čo najúčinnejšie využiť všetky priemyselne dostupné činnosti mikroorganizmov.

### Literatúra

1. ARPAI, J. — LONGAUEROVÁ, D. — LEŠKOVÁ, Z. — TOMIŠOVÁ, J.: Kvasný Prům., 11, 1965, č. 12, s. 273.
2. ARPAI, J. — LONGAUEROVÁ, D. — LEŠKOVÁ, Z. — TOMIŠOVÁ, J.: Kvasný Prům., 12, 1966, č. 1, s. 10.
3. BETINA, V. — NEMEC, P.: Všeobecná mikrobiológia. Bratislava, Alfa 1977.
4. GETLÍK, A.: nepublikované.
5. GUSCHLBAUER, W.: Štruktúra nukleových kyselín. Bratislava, Alfa 1980.
6. ŘACH, P.: Izolace nukleové kyseliny z kvasnic. Studijní správa, Praha, STIPP 1964.
7. Codex medicamentarius gallicus 1949.

### Значение и использование рибонуклеиновой кислоты из дрожжей

#### Резюме

Автор сосредоточил свое внимание на рибонуклеиновую кислоту в пекарских дрожжах. Он описывает способ ее выделения и возможности использования.

### Importance and utilization of ribonucleic acid from yeast

#### Summary

The author deals in his work with the importance and utilization of ribonucleic acid in baker's yeast. He describes the isolation method of ribonucleic acid and its utilization possibilities.