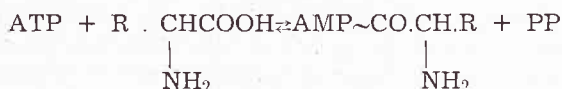


Štúdium zloženia nukleových kyselín niektorých potravinársky významných mikroorganizmov

J. ARPAI, Z. LEŠKOVÁ

Ribonukleové kyseliny. Proces biosyntézy začína všeobecne aktiváciou, ktorá sa uskutočňuje prenosom energie z makroergických fosfátových väzieb. Pri biosyntéze bielkovín sa za katalytického pôsobenia špecifických enzýmov (1, 2) aktivujú karboxylové skupiny aminokyselín tak, že karboxylová skupina vytesňuje v 5'-adenozíntrifosfáte koncový pyrofosfát za vzniku aminoacylaldenylátu (3, 4) podľa rovnice:



V poslednom čase sa zistilo, že proces aktivácie aminokyselín nemožno celkom oddeliť od procesu, pri ktorom nastáva zoradenie aminokyselín, ktoré je potrebné pre vznik novej bielkoviny. Vzniklé aminoacylaldenyláty zostávajú spojené s aktivujúcimi enzýmami (nazvanými podľa izolácie „pH 5-enzýmy“) a sú takto prenesené (5, 6) na špecifické rozpustné ribonukleové kyseliny (s — RNA).

Funkcia s-RNA je založená na jej koenzýmovej povahe zúčastnenej pri transfere aminokyselín (7). To znamená, že aktivujúci príslušný enzým sa zúčastní aktivácie karboxylovej skupiny aminokyseliny a zároveň i prenosu aminokyseliny na s-RNA. Pri prenose na s-RNA sa aktivovaná aminokyselina pripojí na koncový adenosín príslušnej s-RNA za vzniku esterovej väzby s vysokým obsahom energie. Špecifita väzby s-RNA s danou aminokyselinou, prenášanou vo väzbe s aktivujúcim enzýmom, je vyjadrená usporiadaním nukleotidov vo vnútri molekuly s-RNA a je druhovo špecifická (8). Je známe (9, 10), že na konci polynukleotidového reťazca, kde dochádza k väzbe aminokyseliny, je u všetkých s-RNA, špecifických pre jednotlivé aminokyseliny, rovnaký sled troch nukleotidov: P-adenozín-P-cytidín-P-cytidín. Na opačnom konci je viazaná pravdepodobne kyselina guanylová (8).

Aminokyselina, viazaná estericky na s-RNA, sa v ďalšej fáze reakcie oddelí od aktivujúceho enzýmu a spoločne s rozpustnou ribonukleovou kyselinou prechádza do ribozómov, kde dochádza ku kondenzácii aktivovaných aminokyselín, za vzniku polypeptidického reťazca bielkovín, podľa geneticky určeného sledu

amínokyselín. U *Escherichia coli* sa zistilo (11), že s-RNA, uvoľnená po odovzdaní amínokyselín do ribozómov, sa opäť spojuje s novými amínokyselinami, takže reakcie, v ktorých s-RNA vystupuje, majú cyklický charakter a s-RNA má úlohu koenzýmu.

Po stránke chemického zloženia sa s-RNA líši od ostatných typov bunecnej RNA po prvé približne platiacimi rovnosťami (guanín = cytozín, adenín = uracil), po druhé vysokým obsahom minoritných báz (12). McCully a Cantoni (13) ukázali, že s-RNA sa odlišuje od ostatných RNA aj sekvenčným usporiadaním nukleotidov. Zostavili model molekuly s-RNA, ktorý vystihuje dobré vlastnosti s-RNA a definuje miesta akceptorovej a transferovej špecifity. Predstavujú molekulu s-RNA ako jednoduchý polynukleotidový refazec, ktorého ramená sú priložené k sebe a spojené vodíkovými mostíkmi v dokonalú závitnicu, zloženú z 26 nukleotidových párov. Centrálna časť refazca nie je spojená s vodíkovými mostíkmi, ale tvorí jednoduchú slučku. Tu sú sústredené všetky metylované puríny a pseudouridín, ako aj kódový základ. Na akceptorovom konci molekuly nachádzame sled P-cytozín-P-cytozín-P-adenín. Koncový adenosín s priliehajúcou cytidylovou kyselinou nie sú spárené, vyčnievajú z konca dvojitej špirály; nasledujúca cytidylová kyselina je spárená s guanylovou kyselinou opačného konca molekuly s-RNA, tým sa nenásilne vysvetľuje, prečo všetky molekuly s-RNA obsahujú v koncovej polohe guanylovú kyselinu (14).

Ribozomálne nukleové kyseliny. O zložení cytoplazmy mikrobiálnej bunky je dnes známe, že obsahuje veľa nízkomolekulárnych látok a enzýmov, hlavne ribonukleovú kyselinu, ktorá je prítomná ako ribonukleoproteín. Pre častice tejto bielkoviny, ktoré sú obyčajne guľovitého tvaru a priemeru 150–350 Å, sa zaviedlo označenie ribozómy (15). Tieto možno izolovať z mikroorganizmov ako aj z cytoplazmy vyšších organizmov (16). Ribozomálne častice sa skladajú z veľkého počtu bielkovinných podjednotiek, ktoré majú bázičné vlastnosti a nízku molekulovú váhu a sú zložené z dvoch alebo troch molekúl vysokomolekulárnej RNA. Bielkovinné podjednotky sú v ribozómoch navzájom spojené s dvojmocnými kationmi a tvoria tak sférický útvar s vysokým stupňom hydratácie.

Rozdiel medzi predchádzajúce opísanou s-RNA, ktorá má svoje označenie z toho, že je rozpustná vo vode a ribozomálnou RNA je práve v tom, že ribozomálna RNA pri uvoľnení sa nerozpúšťa vo vodnom prostredí, ale sa usadzuje. Ribozomálna RNA sa takto líši od ostávajúcej cytoplazmatickej RNA tak fyzikálnymi ako aj chemickými vlastnosťami. V protiklade k veľkému počtu relatívne malých bielkovinných podjednotiek u s-RNA sa ribozomálna RNA skladá z veľmi malého počtu neobyčajne veľkých molekúl. Ribozomálna RNA nie je jednotná, možno ju ďalej diferencovať na základe sedimentačnej konštanty.

Chemická aktivita v ribozómoch má prevažne charakter ribonukleázový. Táto RN-áza je však v ribozómoch v latentnom stave, pokiaľ nie je mechanicky alebo chemicky aktivovaná. Ďalšie enzýmové aktivity sa zistili u ribozómov menovite peptidázová (17) a β -galaktozidázová aktivita (18).

Informačné ribonukleové kyseliny predstavujú ďalšiu diferencovanú zložku, ktorých funkciou je prenášať za účasti kyseliny dezoxiribonukleovej genetické informácie na miesto syntézy bielkovín. Po stránke chemickej sa i-RNA vyznačuje pomerne nízkou molekulovou váhou a svojou nestálosťou sa rozkladá

nielen priebehom syntézy bielkovín, ale už jednoduchým stykom s ribozómami (19). Práve na základe jej mimoriadne rýchleho metabolizmu je i-RNA rozlíšiteľná na základe krátkodobej inkorporácie značkových prvkov ^{32}P , ^{14}C (20). Zloženie kyseliny ribonukleovej nezodpovedá celkom zloženiu kyseliny dezoxyríbonukleovej príslušného bakteriálneho druhu, ale sa skladá práve zo zmesi 33 % i-RNA a 67 % ribozomálnej kyseliny ribonukleovej (21). Až pomocou polymerázy kyseliny ribonukleovej možno získať kyselinu ribonukleovú, ktorá je vernou kópiou kyseliny dezoxyríbonukleovej po stránke zloženia a nukleotidového sledu, nie však po stránke molekulovej váhy. i-RNA, podobne ako predchádzajúce formy kyseliny ribonukleovej, sa dajú ešte ďalej rozdeliť, najmä na základe konštanty sedimentácie. Ako prenášač genetických informácií prichádza do úvahy najmä i-RNA o sedimentačnej konštante 30 S, ktorá zodpovedá jednému celému operónu (22). Obsah báz a nukleotidový sled je v podstate daný tým, že je i-RNA kópiou kyseliny dezoxyríbonukleovej (23). Ťažisko novších výskumných prác v tejto oblasti leží v osvetlení mechanizmu syntézy i-RNA.

O vlastnostiach ďalšej formy nukleových kyselín, t. j. m-RNA možno uviesť na tomto mieste iba toľko, že bola izolovaná z ribozómov a má dve hlavné odlišné zložky nerovnakej molekulovej váhy. Má nepochybne významnú, avšak doposiaľ nie celkom objasnenú funkciu pri syntéze bielkovín. (24).

Dezoxyríbonukleová kyselina. Funkcia kyseliny dezoxyríbonukleovej je predovšetkým v jej transformačnej účinnosti, t. j. v nosičstve dedičných vlastností, ktoré je späté s jej štruktúrou. Kostra je tvorená dvomi polynukleotidovými reťazcami, ktoré sú navzájom zviazané pomocou vodíkových mostíkov medzi bázami. Platí pritom pravidlo, že sa vodíkové mostíky môžu vytvárať len medzi adenínom a tymínom, cytozínom a guanínom. Je to dané tvarom a chemickými vlastnosťami báz. Transformačná účinnosť kyseliny dezoxyríbonukleovej je teda v podstate podmienená sekundárnou štruktúrou molekuly. S tým súhlasne sa zistila strata infekтивности kyseliny dezoxyríbonukleovej pri narušení jej cyklickej štruktúry (25).

Poznatky o štruktúre kyseliny dezoxyríbonukleovej možno zhrnúť v nasledovných bodoch:

1. Existujú dva typy kyseliny dezoxyríbonukleovej: typ AT, v ktorom obsah adenínu a tymínu prevažuje nad obsahom guanínu a cytozínu a typ GC, vyskytujúci sa hlavne v mikroorganizmoch, v ktorom je situácia opačná.

2. Súčet purínových nukleotidov sa rovná súčtu pyrimidínových nukleotidov.

3. Molárny pomer adenínu k tymínu sa rovná 1, podobne ako molárny pomer guanínu k cytozínu, resp. k cytozínu + 5-metylcytozínu, ak je tento prítomný.

4. Počet 6-amínoskupín sa rovná počtu 6-ketoskupín.

Pre syntézu kyseliny dezoxyríbonukleovej je nutná prítomnosť všetkých štyroch prirodzených dezoxynukleozid — 5'-trifosfátov a zároveň malé množstvo kyseliny dezoxyríbonukleovej (očko), ktoré môže byť z ľubovoľného zdroja. Syntéza kyseliny dezoxyríbonukleovej je katalyzovaná DNA-polymerázou, ktorú prvý raz izoloval Kornberg so spolupracovníkmi (26) z extraktu *Escherichia coli*. DNA-polymeráza katalyzuje vratnú reakciu medzi vznikajúcim polynukleotidom a dezoxynukleozid-5'-trifosfátom, ktoré sa nemôžu substituovať odpovedajúcimi 5'-difosfátmi alebo ribonukleozid-5'-trifosfátmi. Za neprítomnosti jedného alebo niekoľkých dezoxynukleozid-5'-trifosfátov prebieha syntetická reakcia veľmi nepatrne. Pri enzymatickej syntéze kyseliny dezoxyríbonukleovej

ribonukleovej môže polynukleotidový reťazec kyseliny dezoxyribonukleovej narastať v dôsledku reakcie nukleozid-5'-trifosfátu aktivovaného pyrofosfátom s kyslíkom alkoholické skupiny 3'-polohy dezoxyribózy. Uvažuje sa o dvoch mechanizmoch. Podľa prvého mechanizmu sa k polynukleotidovému reťazcu, ktorý je na narastajúcom konci zakončený trifosfátom, pripojí mononukleozid-5'-trifosfát a z akceptora sa uvoľní pyrofosfát. Podľa druhého mechanizmu sa pripojuje nukleozid-5'-trifosfát k 3'-hydroxylovej skupine koncovej dezoxyribózy za uvoľnenia pyrofosfátu z donoru (27). Treba ešte poznamenať, že obsah guanín, cytozín zdá sa byť druhou konštantou, ktorá je fylogeneticky podmienená (28). Je pravdepodobné, že minimálny obsah guanín, cytozín alebo adenín, tymín súvisí s povahou genetického kódu. Ani kyselina dezoxyribonukleová nie je celkom jednotnou látkou, analytické krivky s bimodálnou distribúciou obsahu guanín, cytozín ukazujú na menšiu zložku kyseliny dezoxyribonukleovej odlišného zloženia. Nukleotidový sled v kyseline dezoxyribonukleovej sa študuje na základe tzv. štatistického polynukleotidu (29), ktorým sa vystihuje početnosť purínov, pyrimidínov a polypyrimidínov. Doposiaľ sekvenčná analýza kyseliny dezoxyribonukleovej pokročila iba po dinukleotidy a trinukleotidy (30).

Pokusná časť

Materiál a metódy

Mikroorganizmy použité pri pokusoch pochádzali jednak zo zbierky oddelenia, jednak zo Zbierky mikroorganizmov ÚJEP v Brne. Udržovali sa a rozmnožovali sa pre pokusné účely podľa konvenčných metód (31).

Pracovný postup. Používala sa v princípe metóda Schmidt-Thannhausera (32), ktorou možno kvantitatívne oddeliť RNA od DNA a jednorázovo hydrolyzovať RNA bez deštrukcie jej komponentov. Alkalická hydrolýza RNA umožňuje stanoviť ju vo forme mononukleotidov.

Do práce sa bralo 50 ml mikróbnej suspenzie o hustote 10^8 buniek/ml. Z odstredenej a premytej suspenzie nízkomolekulárne voľné mononukleotidy sa oddelili pôsobením 0,2 N HClO_4 v priebehu 30 minút pri teplote 2°C . Zopakovalo sa to dvakrát. Za účelom odstránenia lipidov a HClO_4 sa odstredená masa premývala dvakrát 70 % -ným chladeným alkoholom a jedenkrát 70 % -ným nechladeným alkoholom a dvakrát zmesou alkohol-éter (1:1) a jedenkrát éterom. Suchý zostatok sa hydrolyzoval 0,3 N KOH pri 37°C v priebehu 18 hodín. Po skončení hydrolýzy v luhovom roztoku sa nachádzali mononukleotidy hydrolyzovanej RNA, DNA a prímеси. DNA, K^+ a prímеси sa vyzrážali za chladu 50 % -nou HClO_4 tak, aby výsledná koncentrácia HClO_4 bola 2—3 %. Zmes sa odstredila pri 2°C . Sediment sa premýval dvakrát 2—3 % -nou HClO_4 za chladu. V sedimente sa nachádzali DNA, soli K^+ , bielkoviny a prímеси, v kyslom roztoku boli prítomné mononukleotidy RNA. Koncentrácia RNA sa stanovila spektrofotometricky pri 260 nm. Roztok mononukleotidov sa neutralizoval 3 N KOH pri 2°C . KClO_4 lepšie vypadol pri niekoľkohodinovom státi v chladničke. Po odstredení sa sediment premyl dvakrát studenou destilovanou vodou a roztok sa použil na elektroforetické delenie.

Na delenie mononukleotidov sa použila elektroforéza na papieri Whatman 30 napätí 1300 V, intenzite 12 mA. Pri delení sa používali dva nasledovné tlmivé roztoky:

- a) pH — 3,8 (M/20 primárny citran sodný)
 b) pH — 3,5 (30 ml 1 M kyseliny citrónovej + 10 ml 1 M terciálneho citranu sodného doplniť do 2000 ml destilovanou vodou).

V tlmivom roztoku a) bežala elektroforéza 2 hodiny a v roztoku b) 1,5 hodiny. Papier pred použitím sa premyl 0,1 N HCl a potom destilovanou vodou až do neutrálnej reakcie. Po ukončení elektroforézy sa papier vysušil a detekcia sa robila UV lampou v oblasti najväčšej absorpcie nukleových kyselín. Zistené škvrny sa zakreslili, vystrihli a eluovali v 0,1 N HCl pri izbovej teplote počas 18 hodín. Potom sa zmerala absorpcia získaného eluátu na spektrofotometri Zeiss a to pri maximálnej absorpcii jednotlivých mononukleotidov.

Po odstránení mononukleotidov RNA, sediment sa extrahoval v 1 N HClO₄ pri 80 °C počas 30 min. Po odcentrifugovaní supernatant sa zliat do kalibrovannej skúmavky — frakcia DNA a extrakcia sa zopakovala ešte raz. Supernatanty sa zliatli a doplnili na určitý objem 1 N HClO₄. Koncentrácia DNA sa stanovila spektrofotometricky pri 268 nm. Za účelom kvantitatívneho stanovenia báz, roztok DNA sa neutralizoval 6 N KOH pri 2 °C a za chladu sa vyžrážaný KClO₄ odcentrifugoval. Supernatant sa zliat do odvažovačiek a odparil sa do sucha vo vákuovom exikátore nad KOH. Odparok sa rozpustil v 20 % -nej HCl, preniesol do ampulky, ktorá sa zatavila a potom sa hydrolyzoval 2 hodiny pri 120 °C. Po ukončení hydrolyzy sa roztok báz preniesol do odvažovačky a odparil sa do sucha vo vákuovom exikátore nad KOH. Vysušená zmes báz sa rozpustila v malom množstve destilovanej vody a naniesla sa na premytý chromatografický papier Whatman 1. Ako rozpúšťadlo sa použila zmes 170 ml izopropanolu, 36 ml HCl a 44 ml destilovanej vody. Po ukončení chromatografie sa papier vysušil a potom detekoval UV lampou typu Minerallight. Zistené škvrny sa zakreslili, vystrihli a eluovali v 0,1 N HCl za občasného pretrepávania najmenej 6 hodín. Optická hustota vzoriek sa merala spektrofotometricky pri absorpčnom maxime danej látky.

Výpočet báz obsahu DNA a mononukleotidov RNA v molárnych percentách z absorpčného maxima eluátu škvŕn chromatogramu a elektroforeogramu sa robil pomocou príslušných extinkčných koeficientov (33) báz a mononukleotidov podľa vzorca:

$$\text{Molarita} = \frac{E}{(\epsilon)}$$

kde E je absorbanca pri absorpčnom maxime,

ϵ je extinkčný koeficient.

Hodnoty získané z uvedeného zlomku pre jednotlivé bázy, resp. mononukleotidy RNA sa sčítali a z celkového množstva sa vypočítali molárne percentá.

Pre výpočet sa použili nasledovné molárne extinkčné koeficienty:

| | |
|---------------------|------------------------------------|
| adenín | 13,0 . 10 ³ pri 260 nm |
| guanín | 11,0 . 10 ³ pri 250 nm |
| cytozín | 10,5 . 10 ³ pri 275 nm |
| tymín | 7,95 . 10 ³ pri 265 nm |
| cytidylová kyselina | 12,85 . 10 ³ pri 278 nm |
| adenylová kyselina | 14,4 . 10 ³ pri 257 nm |
| guanylová kyselina | 12,2 . 10 ³ pri 257 nm |
| uridylová kyselina | 9,9 . 10 ³ pri 262 nm |

T a b. 1. Zloženie báz DNA niektorých potravinársky významných mikroorganizmov.
Konfrontácia vlastných výsledkov s literárnymi údajmi

| Mikroorganizmus | G | A | C | T | G+C | G | A | C | T | G+C | Citá- cia |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|------------|----------|--------------|
| <i>Aerobacter aerogenes</i> | 27,12 26,38 25,94 | 23,09 20,95 21,54 | 27,59 30,05 29,10 | 21,20 22,62 23,42 | 54,71 56,43 55,04 | 28 29 | 22 21 | 28 29 | 22 21 | 56 58 | 34,35 34 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 16,50 17,85 17,71 | 31,64 30,74 34,52 | 17,42 16,32 15,26 | 34,44 35,09 32,51 | 33,92 34,17 32,97 | 17 | 33 | 17 | 33 | 34 | 34,36 |
| <i>Bacillus megaterium</i> | 20,17 20,56 18,90 | 29,64 32,08 31,26 | 20,29 20,63 19,44 | 29,90 26,73 30,40 | 40,46 41,19 38,34 | 19 | 31 | 19 | 31 | 38 | 34 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 21,66 18,93 20,64 | 29,80 31,62 31,47 | 18,51 19,24 19,86 | 30,03 30,21 28,03 | 40,17 38,17 40,50 | 21 | 29 | 21 | 29 | 42 | 34,35 |
| <i>Escherichia coli</i> | 22,69 25,26 26,91 | 18,96 26,47 28,74 | 27,63 25,16 25,38 | 30,72 23,11 18,97 | 50,32 50,42 52,29 | 26 22,9 | 24 26,0 | 26 27,1 | 24 24,0 | 52 50 | 35,37 42 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 19,31 18,52 | 33,08 30,62 | 17,24 20,72 | 30,37 30,14 | 36,55 36,55 | 18 20 | 32 30 | 18 20 | 32 30 | 36 40 | 34 37 |
| <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4669 | 18,88 | 30,29 | 18,14 | 32,69 | 37,02 | 19 | 31 | 19 | 31 | 38 | 35 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 34,62 | 15,98 | 34,62 | 14,78 | 69,24 | 33 | 17 | 33 | 17 | 66 | 34 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 | 31,17 30,65 | 18,09 17,24 | 32,30 31,37 | 18,44 20,74 | 63,47 62,02 | 32 | 18 | 32 | 18 | 64 | 35 |

| | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 29,32 30,17 31,90 | 18,25 18,10 18,80 | 29,27 31,60 30,51 | 23,16 20,13 18,79 | 58,59 61,77 62,41 | 32 | 18 | 32 | 18 | 64 | 34 |
| <i>Sarcina flava</i> | 33,07 34,25 33,43 | 15,19 14,78 16,07 | 32,24 33,67 34,11 | 19,50 17,30 16,39 | 65,31 67,92 67,54 | 34 | 16 | 34 | 16 | 68 | 34 |
| <i>Sarcina lutea</i> | 32,56 34,11 34,16 | 19,21 18,00 17,29 | 33,16 32,77 34,05 | 15,07 15,12 14,00 | 65,72 66,88 68,71 | 32 36 | 18 14 | 32 36 | 18 14 | 64 72 | 34 37 |
| <i>Serratia marcescens</i> | 31,14 30,83 29,12 | 22,03 21,80 21,16 | 30,44 27,95 29,00 | 16,39 19,42 20,72 | 61,58 58,78 58,12 | 29 | 21 | 29 | 21 | 58 | 34 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 15,54 15,92 | 33,01 35,46 | 18,24 17,63 | 30,21 30,99 | 33,78 33,55 | 17 | 33 | 17 | 33 | 34 | 37 |
| <i>Clostridium pasteurianum</i> | 13,36 12,93 13,48 | 34,55 33,81 34,61 | 16,03 14,72 16,92 | 35,46 38,54 30,96 | 29,99 27,65 30,40 | 14,8 | 34,7 | 16,0 | 34,5 | 30,8 | 42 |
| <i>Clostridium butyricum</i> | 16,63 17,04 15,86 | 28,89 30,22 31,67 | 19,73 17,25 18,42 | 34,75 35,49 34,05 | 36,36 34,29 34,28 | 17,8 | 30,5 | 19,6 | 32,1 | 37,4 | 42 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 16,04 17,00 17,05 | 33,71 32,09 32,90 | 17,80 18,14 17,62 | 31,55 32,77 32,43 | 34,74 35,14 34,67 | 18 | 32 | 18 | 32 | 36 | 35,38 |
| <i>Saccharomyces fragilis</i> | 22,61 20,75 19,87 | 30,15 29,89 31,00 | 20,70 19,90 21,00 | 26,54 29,46 28,13 | 43,31 40,65 40,87 | 21 | 29 | 21 | 29 | 42 | 38 |

Tab. 2. Nukleotidové zloženie RNA niektorých potravinárskych významných mikroorganizmov.
Konfrontácia vlastných výsledkov s literárnymi údajmi

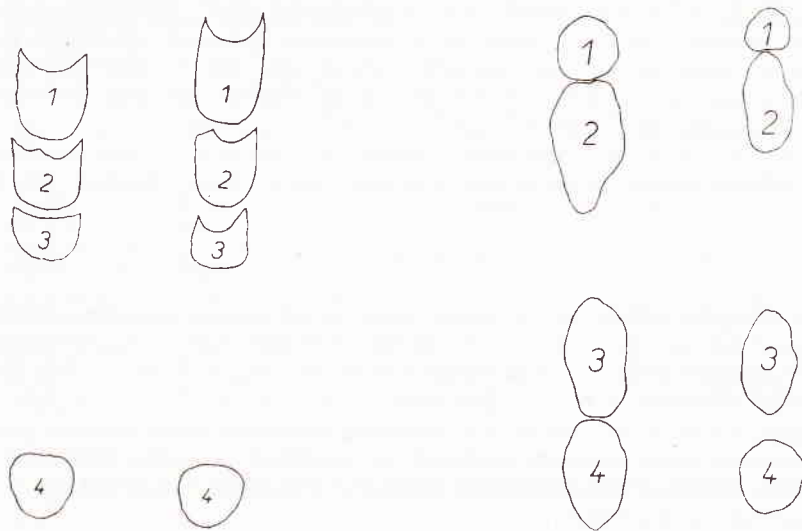
| Mikroorganizmy | CA | AA | GA | UA | pur | GA+CA | GA | AA | GA | AU | pur | GA+CA | Citá- cia |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|--------------|
| | | | | | pyr | AA+AU | | | | | pyr | AA+AU | |
| <i>Aerobacter aerogenes</i> | 21,91 | 25,50 | 32,44 | 20,15 | 1,37 | 1,19 | 22,6 | 25,0 | 31,7 | 20,7 | 1,32 | 1,19 | 35 |
| | 22,89 | 25,37 | 30,90 | 20,84 | 1,28 | 1,16 | | | | | | | |
| | 20,92 | 24,66 | 31,26 | 23,16 | 1,26 | 1,09 | | | | | | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | 19,14 | 25,62 | 30,62 | 24,62 | 1,28 | 0,99 | 20,1 | 24,8 | 31,2 | 32,8 | 1,27 | 1,05 | 36 |
| | 19,83 | 24,04 | 31,67 | 24,46 | 1,25 | 1,06 | | | | | | | |
| | 20,63 | 23,47 | 30,55 | 25,35 | 1,17 | 1,04 | | | | | | | |
| <i>Bacillus megaterium</i> | 20,18 | 25,16 | 31,29 | 23,37 | 1,29 | 1,05 | | | | | | | |
| | 20,60 | 25,62 | 31,87 | 21,91 | 1,32 | 1,10 | | | | | | | |
| | 20,00 | 25,10 | 31,03 | 23,87 | 1,24 | 1,04 | | | | | | | |
| <i>Bacillus austilis</i> | 24,06 | 26,00 | 30,62 | 19,32 | 1,30 | 1,20 | 22,1 | 25,5 | 31,4 | 21,0 | 1,32 | 1,17 | 35 |
| | 24,03 | 25,87 | 31,04 | 19,06 | 1,32 | 1,22 | | | | | | | |
| | 24,31 | 25,48 | 32,17 | 18,04 | 1,36 | 1,29 | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 23,90 | 26,34 | 31,56 | 18,20 | 1,37 | 1,24 | 22,1 | 25,2 | 32,5 | 20,2 | 1,37 | 1,20 | 35 |
| | 21,82 | 26,05 | 33,00 | 19,13 | 1,44 | 1,21 | | | | | | | |
| | 24,73 | 27,22 | 29,14 | 18,91 | 1,29 | 1,16 | | | | | | | |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 20,07 | 26,75 | 33,16 | 20,02 | 1,49 | 1,13 | 22,6 | 24,6 | 32,0 | 20,8 | 1,30 | 1,21 | 35 |
| | 20,19 | 26,50 | 32,85 | 20,46 | 1,46 | 1,12 | | | | | | | |
| | 20,63 | 26,08 | 32,45 | 20,84 | 1,41 | 1,13 | | | | | | | |
| <i>Pseudomonas euruginose</i> | 20,78 | 25,11 | 30,70 | 23,41 | 1,26 | 1,01 | 22,2 | 25,7 | 31,2 | 20,8 | 1,33 | 1,15 | 35 |
| | 21,20 | 25,85 | 31,20 | 21,75 | 1,32 | 1,10 | | | | | | | |
| | 21,03 | 26,20 | 31,32 | 21,45 | 1,35 | 1,09 | | | | | | | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 24,00 | 25,80 | 32,30 | 17,90 | 1,38 | 1,28 | | | | | | | |
| | 22,63 | 28,34 | 32,10 | 16,92 | 1,52 | 1,20 | | | | | | | |
| | 24,12 | 28,48 | 32,15 | 15,25 | 1,54 | 1,28 | | | | | | | |
| <i>Sarcina flava</i> | 24,36 | 26,38 | 31,45 | 17,81 | 1,36 | 1,26 | | | | | | | |
| | 23,87 | 25,64 | 33,15 | 17,34 | 1,42 | 1,32 | | | | | | | |
| <i>Sarcina lutea</i> | 23,15 | 25,66 | 33,10 | 18,09 | 1,24 | 1,28 | | | | | | | |
| | 21,91 | 25,83 | 33,90 | 18,36 | 1,48 | 1,26 | | | | | | | |
| <i>Serratia marcescens</i> | 24,46 | 25,18 | 26,07 | 24,29 | 1,05 | 1,02 | | | | | | | |
| | 23,55 | 26,03 | 26,44 | 23,98 | 1,10 | 0,99 | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 20,80 | 30,00 | 29,74 | 19,46 | 1,48 | 1,02 | | | | | | | |
| | 21,05 | 29,95 | 28,33 | 20,67 | 1,39 | 0,97 | | | | | | | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 18,73 | 25,92 | 29,03 | 26,32 | 1,22 | 0,91 | 19,4 | 26,8 | 28,3 | 25,5 | 1,23 | 0,91 | 35 |
| | 20,01 | 25,34 | 28,61 | 26,04 | 1,17 | 0,94 | 20,1 | 26,6 | 26,7 | 26,5 | 1,14 | 0,88 | 43 |
| | | | | | | | -0,6 | ±0,4 | ±1,0 | ±0,6 | | | |
| <i>Saccharomyces fragilis</i> | 19,58 | 25,11 | 29,93 | 25,38 | 1,22 | 0,98 | 19,5 | 25,6 | 28,2 | 26,7 | 1,16 | 0,91 | 44 |
| | 23,03 | 28,10 | 24,41 | 24,46 | 1,10 | 0,90 | 21,9 | 27,1 | 25,6 | 25,4 | 1,11 | 0,90 | 43 |
| | | | | | | | ±0,1 | ±0,8 | ±0,1 | ±0,6 | | | |

Výsledky stanovenia zloženia báz DNA a nukleotidov RNA s príslušným vyhodnotením

Zloženie báz DNA vybraných kmeňov potravinársky významných mikroorganizmov ukazujú percentuálne údaje zostavené do tabuľky 1. V piatich stĺpcoch zľava sú vyčíslené výsledky stanovenia guanínu (G), adenínu (A), cytozínu (C), tymínu (T), resp. súčtu $G + C$ a to vždy z troch súběžných pokusov. Rovnako označené stĺpce na pravej strane uvádzajú príslušné hodnoty nájdené inými autormi, ktorých práce sú citované podľa krajného stĺpca vpravo. Typické polohy báz DNA skúšobného organizmu *Escherichia coli* vedľa škvŕn štandardnej zmesi báz DNA vidieť z obrazu 1.

Z prieskumu bázoého zloženia DNA vyplýva ako všeobecný záver:

1. Medzi baktériami priemerný obsah guanín — cytozín v molekule DNA varíruje približne od 25 do 75 %. Tá okolnosť, že za prirodzených podmienok DNA je charakterizovaná týmto rozsahom obsahu guanín — cytozín môže po-



Obr. 1. Poloha báz DNA na chromatograme v zmesi izopropylalkohol — HCl — voda. Škvŕny vľavo: štandardné vzorky báz DNA. Škvŕny vpravo: vzorka DNA z *Escherichia coli*

Označenie škvŕn: 1 — guanín, 2 — adenín, 3 — cytozín, 4 — tymín

Obr. 2. Poloha mononukleotidov RNA na elektroforeograme. Škvŕny vľavo: štandardné vzorky mononukleotidov RNA. Škvŕny vpravo: vzorka RNA z *Escherichia coli*. Označenie škvŕn: 1 — kyselina cytidylová, 2 — kyselina adenyllová, 3 — kyselina guanylová, 4 — kyselina uridylová.

ukazovať na to, že buď genetická informácia nemôže byť uložená len v adeníne a tymíne, alebo v guaníne a cytozíne, alebo, že genetická informácia sa môže zakladať jedine v adeníne a tymíne alebo guaníne a cytozíne, pričom však posledná kombinácia z metabolického hľadiska nemôže existovať ako samostatná molekula DNA. Na podopretie tejto hypotézy možno poznamenať, že

dvojitá špirála DNA, zložená len z dezoxyadenylových a tymidylových kyselín, bola enzymaticky syntetizovaná (39).

2. Fylogenetické vzťahy sa môžu odrážať v priemere obsahu guanín — cytozín (40). Od tej doby čo Lee so spolupracovníkmi (34), ako prví poukázali na význam zloženia báz bakteriálnej DNA pre diferenciáciu druhov, stala sa Adansonova analýza neoddeliteľnou súčasťou taxonomickej práce, ktorá umožňuje na základe priameho porovnania homológov DNA identifikovať mikroorganizmy (41).

Pokiaľ sa zistili rozdiely v jednotnej distribúcii priemernej hodnoty G + C obsahu DNA molekuly u rovnorodých bakteriálnych druhov, nikdy nepresahovali hranicu 10 %.

Nukleotidové zloženie RNA vidieť z výsledkov našich rozborov, ktoré sú zostavené do tabuľky 2 a konfrontované s literárnymi údajmi, obdobne ako predtým u DNA. Ilustráciu elektroforeogramu RNA ukazuje obraz 2. Výsledky stanovenia RNA dávajú charakteristické vzťahy purínových a pyrimidínových zložiek, ako aj súčtu kyseliny guanylovej (GA) a kyseliny cytidylovej (CA) k súčtu kyseliny adenylovej (AA) a uridylovej (UA). O vzťahu nefrakcionovanej bunkovej RNA k DNA sa rozchádzajú pokusné výsledky, resp. názory. Kým jedni spozorovali zákonité vzťahy (45, 46), nenašli iní autori žiadne, alebo len veľmi okrajové (47, 48). Naše vlastné pokusné sledovania, zahrnuté do čiastkovej záverečnej zprávy výskumnej úlohy II-2-2, o ktorých budeme referovať v ďalšej publikácii, ukázali na významný vplyv prostredia na obsah RNA v bunke, či už to boli nutričné vplyvy alebo teplotné (49, 50).

Súhrn

Štúdium zloženia nukleových kyselín stáva sa základnou metodikou mikrobiológie, pred týmto vývojom nemôže sa uzavrieť ani mikrobiológia potravinárstva. Predložená práca prináša väčšie množstvo údajov o zložení báz DNA potravinársky významných mikroorganizmov. Slúžia ako podklady pre Adansonovu analýzu, ktorá je neoddeliteľnou súčasťou modernej taxonomickej práce. Vo vyšetřovanom mikrobiálnom materiáli sa taktiež stanovovalo nukleotidové zloženie RNA, ktorého charakteristické ukazatele umožňujú usudzovať na fyziologický stav mikroorganizmov.

Literatúra

1. Berg P., J. Biol. Chem. 22, 1025 (1956).
2. Hele P., Finch F. R., Biochem. J. 75, 352 (1960).
3. Hoagland M. B., Keller E. B., Zamecnik P. C., J. Biol. Chem. 218, 345 (1956).
4. Hoagland M. B., Zamecnik P. C., Sharon N., Lipmann F., Stulberg M. P., Boyer P. D., Biochem. Biophys. Acta 26, 215 (1957).
5. Hoagland M., B., Stephenson M. L., Scott J. F., Hecht L. I., Zamecnik P. C., J. Biol. Chem. 231, 241 (1958).
6. Berg P., Ofengand E. J., Proc. Natl. Acad. Sci. 44, 78 (1958).
7. Zamecnik P. C., Biochem. J. 85, 257 (1962).
8. Zilling W., Schachtschabel D., Krone W., Z. physiol. Chem. 318, 100 (1960).
9. Canellakis E. S., Biochim. Biophys. Acta 25, 217 (1957).
10. Herbert E., J. Biol. Chem. 231, 975 (1958).

11. Allen E. H., Schweet R. S., *Biochim. Biophys. Acta* 39, 187 (1960).
12. Dunn D. B., Smith J. D., Spahr P. F., *J. Mol. Biol.* 2, 113 (1960).
13. McCully K. S., Cantoni G. L., *J. Mol. Biol.* 5, 497 (1962).
14. Singer M. F., Cantoni G. L., *Biochim. Biophys. Acta* 39, 182 (1960).
15. McCarthy B. J., *Biochim. Biophys. Acta* 39, 564 (1960).
16. Tissieres A., Watson J. D., *Nature* 182, 778 (1958).
17. Bolton E. T., Britten R. J., Cowie D. B., McCarthy B. J., McQuillen K., Roberts R. B., *Yearb. Carneg. Inst.* 58, 259 (1959).
18. Aronson A., Bolton E. T., Cowie D. B., Duerksen J. D., McCarthy B. J., McQuillen K., Roberts R. B., *Yearb. Carneg. Inst.* 59, 229 (1960).
19. Tissieres A., Watson J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48, 1061 (1962).
20. Volkin E., Astrachan L., Countryman J. L., *Virology* 6, 545 (1958).
21. Midgley J. E. M., *Biochim. Biophys. Acta* 61, 513 (1962).
22. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* 3, 318 (1961).
23. Furth J. J., Hurwitz J., Goldmann M., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 4, 362 (1961).
24. Risebrough R. W., Tissieres A., Watson J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48, 430 (1962).
25. Fiers W., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* 5, 408 (1962).
26. Kornberg A., Lehman J. R., Somms E. S., *Federation Proc.* 15, 291 (1956).
27. Čihák A., *Chem. listy* 56, 427 (1962).
28. Sueoka N., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48, 582 (1962).
29. Doskočil J., *Chem. listy* 58, 445 (1964).
30. Staehelin M., *Biochim. Biophys. Acta* 49, 27 (1961).
31. Silvestri L. G., Hill L. R., *J. Bacteriol.* 90, 136 (1965).
32. Spirin A. S., Belozerskij A. N., *Biochimija* 21, 768 (1956).
33. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.* 49, 401, (1951).
34. Lee K. Y., Wahl R., Barbu E., *Ann. Inst. Pasteur* 91, 212 (1956).
35. Midgley J. E. M., *Biochim. Biophys. Acta* 61, 513 (1962).
36. Stuy J. H., *J. Bacteriol.* 76, 179 (1958).
37. Belozerskij A. N., Spirin A. S., *Nature* 182, 111 (1958).
38. Storck R., *J. Bacteriol.* 91, 227 (1966).
39. Lehman J. R., Zimmerman S. B., Adler J., Bessman M. J., Simms E. S., Kornberg A., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44, 1191 (1958).
40. Sueoka N., *J. Mol. Biol.* 3, 31 (1961).
41. Colwell R. R., Citarella R. V., Ryman I., *J. Bacteriol.* 90, 1148 (1965).
42. Tonomura B., Malkin R., Rabinowitz J. C., *J. Bacteriol.* 89, 1438 (1965).
43. Storck R., *J. Bacteriol.* 90, 1260 (1965).
44. Osawa S., *Biochim. Biophys. Acta* 42, 244 (1960).
45. Davidson J. N., Chargaff E., *The Nucleic Acids*, Academic Press, New York, 1960.
46. Miura J. I., *Biochim. Biophys. Acta* 55, 62 (1962).
47. Spiegelman S., *Cold Spr. Harb. Symp.* 1961.
48. Woese C. R., *Nature* 189, 920 (1961).
49. Ycas M., Vincent W., S., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 46, 804 (1960).
50. Jevreinova T. N., Caplina I. A., Agre N. S., Davydova I. M., *Mikrobiologija* 34, 411 (1965).

Изучение состава нуклеиновых кислот некоторых сточки зрения пищевой промышленности значительных микроорганизмов

Выводы

Изучение состава нуклеиновых кислот является основной методикой микробиологии, и перед этим развитием не может замкнуться ни микробиология пищевой промышленности. Эта работа приносит большое количество дат о составе оснований ДНА (DNA) значительных с точки зрения пищевой промышленности микроорганизмов. Они служат в качестве основы для Адансоного анализа, который является неотделимой частью современной таксономной работы. В исследованном микробном материале был тоже определен нуклеотидный состав РНА, которого характеристические даты позволяют рассуждать о физиологическом состоянии микроорганизмов.

Studium der Zusammensetzung der Nucleinsäuren von lebensmitteltechnisch bedeutsamen Mikroorganismen

Zusammenfassung

Die Untersuchung der Zusammensetzung von Nucleinsäuren erlangt eine grundlegende Bedeutung in der mikrobiologischen Methodik. Vor dieser Entwicklung kann sich auch die Lebensmittelmikrobiologie nicht verschliessen. Die vorliegende Arbeit erbringt eine Grosszahl von Angaben über die Zusammensetzung der DNA — Basen von Mikroorganismen die von lebensmitteltechnologischen bzw. hygienischen Standpunkt aus von Bedeutung sind. Diese Angaben dienen als Grundlage für die adensonische Analyse, die ein untrennbarer Teil moderner taxonomischer Untersuchungen geworden ist. Das bearbeitete Mikrobenmaterial wurde auch hinsichtlich seines Gehaltes an RNA — Nucleotide untersucht, das als ein Charakteristikum für den physiologischen Zustand der Mikroorganismen angesehen werden kann.