

Биология

УДК 514.764

М.А. ДАВТЯН, Г.А. ГАБРИЕЛЯН, Р.О. ТОРЧЯН

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ АМИНОКИСЛОТНОГО
СОСТАВА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* – ОТХОДОВ
ПИВОВАРЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Выявлены оптимальные условия для максимальной экстракции белков дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (инкубирование в среде 1М NH_4OH в течение 4 часов), при которых экстрагируется около 65% от общего количества белка. Получен кислотный гидролизат осажденных белков и определен его аминокислотный состав. Полученные данные свидетельствуют, что исследуемые дрожжи имеют достаточно богатый набор аминокислот и могут быть использованы в качестве источника для получения аминокислотных смесей.

В настоящее время большое внимание уделяется аминокислотным смесям, которые являются незаменимыми в качестве дополнительного парентерального питания при ряде патологических состояний. Азотистый компонент в рационе парентерального питания может быть представлен гидролизатами белка и аминокислотными смесями [1, 2]. Использование препаратов нерасщепленного белка (плазмы, протеина, альбумина) мало эффективно в силу слишком большого периода полураспада экзогенного белка. Относительно частая непереносимость даже хорошо очищенных гидролизатов вследствие индивидуальных особенностей пациентов, субъективные факторы нередко затрудняют их применение. Предпочтение дается более концентрированным источникам аминного азота – аминокислотным смесям. Аминокислотные смеси должны содержать сбалансированное количество заменимых и незаменимых аминокислот, быть биологически адекватными, чтобы организм мог трансформировать их в собственные белки, не вызывая при этом побочных реакций после поступления в сосудистое русло [3]. Из смесей синтетических аминокислот наибольшее распространение получили такие препараты, как мориамин С-2, морипрон (Япония), альвезин (ФРГ), вамин, фреамин (Швеция), полиамин (Россия), азонутрил (Франция). Большинство аминокислотных препаратов содержит все 8 незаменимых аминокислот, а также гистидин и аргинин и 10–12 заменимых аминокислот. Соотношение различных незаменимых аминокислот в этих препаратах более или менее соответствует аминокислотному спектру яичного белка.

Нами предусматривается разработать метод выделения белков из отходов местной пищевой промышленности и получения из них гидролитическим путем аминокислот с целью их применения при парентеральном питании. Одним из отходов Ереванского пивоваренного завода являются остаточные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые могут служить источником получения различных физиологически активных питательных веществ [4]. Хорошо высушенные пивные дрожжи могут храниться длительное время, при этом не снижается их качество.

Материал и методы исследований. Объектом исследований служили высушенные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (отходы Ереванского пивоваренного завода). Количество белка определяли методом Лоури [5]. Кислотный гидролизат белков получали в пробирке с обратным холодильником в 6N HCl при 105°C. После гидролиза соляную кислоту удаляли путем многократной отгонки водой в вакууме. Остаток растворяли в определенном объеме 10%-ого изопропилового спирта, центрифугировали при 5000g (10 мин) и в надосадке определяли аминокислоты методом бумажной хроматографии – одномерным нисходящим способом. Растворителем служила смесь бутанол–уксусная кислота–вода в соотношении 4:1:1. Проявителем служил 0,2%-ый раствор нингидрина в ацетоне. Количественное определение аминокислот проводилось методом Lissitzky [6].

Результаты и обсуждение. Результаты первой серии опытов показали, что количество белка составляет в среднем 350 мг на 1 г сухих дрожжей. Далее разрабатывались оптимальные условия для максимальной экстракции белков. Экстракция проводилась в различных средах (0,2M Na₂HPO₄, 2% Na₂CO₃, 0,2% NaOH в 50% этаноле, 1M NH₄OH) [7, 8] при комнатной температуре в различные промежутки времени. Полученные данные (табл. 1) показывают, что оптимальной средой для максимальной экстракции белка является 1M NH₄OH при четырехчасовой экстракции, при этом экстрагируется до 65% белка.

Таблица 1

Количество белка при различных условиях экстракции у дрожжей
Saccharomyces cerevisiae

Время, ч	Общее кол-во белка, мг/1г сух. др.	H ₂ O		Na ₂ HPO ₄		Na ₂ CO ₃		NaOH в этил. спирте		NH ₄ OH	
		мг/1г сух. др.	%	мг/1г сух. др.	%	мг/1г сух. др.	%	мг/1г сух. др.	%	мг/1г сух. др.	%
2	350,0	58,3	16,65	105,8	30,20	110,5	31,57	130,6	37,30	150,7	43,05
3		65,8	18,80	115,3	32,90	137,5	39,20	185,3	52,90	208,7	59,62
4		60,3	17,15	120,8	34,51	185,5	53,0	205,8	58,80	225,8	64,50
6		63,5	18,14	132,8	37,94	170,3	48,65	210,3	60,08	230,5	65,85

После цитолиза экстракт дрожжей центрифугировали при 10000g (10 мин) и после нейтрализации pH надосадка белки подвергали осаждению. Для осаждения белков были испробованы ацетон (55%), сульфат аммония (40, 60, 80%-ое насыщение) и трихлоруксусная кислота (ТХУ, 10, 20%). Полученные данные, приведенные в табл. 2, показывают, что

наибольшее количество белка (до 75%) обнаруживается в осадке после осаждения белков 20%-ой ТХУ.

Таблица 2

Количество белка при различных условиях осаждения

Варианты	До осаждения, мг/1г сухих дрожжей	После осаждения			
		надосадо́к		осадо́к	
		мг/1г с.д.	%	мг/1г с.д.	%
ацетон 55%	230,5	96,3	41,8	126,7	55,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 40%		148,3	64,3	75,4	32,7
60%		118,7	51,5	105,8	45,4
80%		81,8	35,5	138,3	60,0
ТХУ 10%		98,5	42,7	123,5	53,6
20%		54,8	23,8	172,8	75,0

Для определения аминокислотного состава осажденный белок подвергли гидролизу в 6N HCl в течение 24ч при 105°С. После нейтрализации гидролизата был определен его аминокислотный состав. Полученные данные представлены в табл. 3.

Таблица 3

Аминокислотный состав белкового гидролизата дрожжей *Sacch. Cerevisiae*

Аминокислоты	Количество аминокислот	
	мг/1г сух. др.	%
цистеин	следы	
гистидин	0,78	6,85
лизин	0,50	4,40
аргинин	следы	
аспарагиновая к-та	2,50	22,0
глутаминовая к-та	0,79	6,95
серин	следы	
глицин	0,54	4,74
аланин	0,18	1,58
треонин	1,05	9,22
метионин	1,90	16,70
тирозин	1,30	11,42
валин	0,64	5,62
лейцин+изолейцин	0,90	7,90
фенилаланин	0,30	2,63

Сумма аминокислот составляет 11,38мг на 1г сухих дрожжей. Следует особо отметить наличие почти всех незаменимых аминокислот (фенилаланин, треонин, гистидин, валин, лизин, метионин, лейцин+изолейцин) за исключением триптофана, который при кислотном гидролизе разрушается. Сумма незаменимых аминокислот составляет около 53% от общего количества аминокислот. В составе аминокислот заметно содержание аланина (1,6%) и глутаминовой кислоты (6,9%), что, по данным других исследователей, обеспечивает нормальное усвоение аминокислотных смесей [4].

При сравнении указанных данных с результатами аналогичных исследований белков сыворотки молока и мелассы сахарной свеклы [9] оказалось, что белки дрожжей богаты такими незаменимыми аминокислотами, как метионин, треонин, лейцин+изолейцин и гистидин, а белки сыворотки и мелассы – лизином, валином и метионином.

Таким образом, остаточные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* имеют достаточно богатый набор аминокислот и могут быть использованы в качестве источника для получения аминокислотных смесей.

Кафедра биохимии

Поступила 04.06.2002

ЛИТЕРАТУРА

1. Вретлинд А., Шенкин А. – Вестн. АМН СССР, 1980, № 2, с. 9–13.
2. Вретлинд А., Суджян А. Внутривенное питание. Москва–Стокгольм, 1984, с. 298.
3. Костюченко А.Л., Канючевский А.В. Современные возможности парентерального питания. С-Петербург, Мед. центр ЦБ РФ. М., 2000.
4. Бусельникова Т.В., Антонова Т.В., Валихова О.И., Градова И.Б., Безруков М.Г. – Биотехнология, 1988, т. 4, № 6.
5. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. – J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 256–275.
6. Lissitzky S., Laurent J. – Bul. Soc. Chem. Biol., 1955, v. 37, p. 1177.
7. Скоунс Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985.
8. De la Morena E., Santos J., Grisolia S. – Biochim. Biophys. Acta, 1968, v. 151, p. 526–528.
9. Арутюнян Т.Г., Карапетян С.А., Хачатрян М.А. – Биолог. ж. Армении, 1995, т. XLVIII, № 21.

Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Գ.Ա. ԳԱԲՐԻԵԼՅԱՆ, Ռ.Հ. ԹՈՌՈՅԱՆ

ԳԱՐԵՋՐԻ ԱՐՏԱԴՐՈՒԹՅԱՆ ԹԱՓՈՆԻ՝ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՍՊԻՏԱԿՈՒՅՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԱՄԻՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ԿԱԶՄԸ

Ամփոփում

Որոշվել են խմորասնկերի սպիտակուցների մաքսիմալ էքստրակցիայի օպտիմալ պայմանները (1M NH₄OH-ի միջավայրում, 4 ժամ), որի ժամանակ մգվում է սպիտակուցի ընդհանուր քանակության 65%-ը: Ստացվել է մատեցված սպիտակուցների թթվային հիդրոլիզատ և որոշվել նրա ամինաթթվային կազմը: Պարզվել է, որ *Sacch. cerevisiae* խմորասնկերը (գարեջրի արտադրության թափոն) ունեն բավական հարուստ ամինաթթվային կազմ և կարող են օգտագործվել որպես աղբյուր ամինաթթվային խառնուրդներ ստանալու համար:

THE ISOLATION OF PROTEINS AND DETERMINATION OF THEIR AMINO
ACID COMPOSITION IN YEASTS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* – THE
WASTES OF BEER PRODUCTION

Summary

The optimal conditions for maximal extraction of proteins during which about 65 per cent of total amount of protein is extracted, have been estimated. The acid hydrolysate of precipitated proteins has been obtained and its amino acid composition has been determined. It appeared, that the yeasts *Sacch. cerevisiae* (the wastes of beer production) have rich amino acid composition and can be used as a source of amino acid mixtures.