

Биология

УДК 582.282.23:547.466

Э. А. МАНТАШЯН

**К ВОПРОСУ ИЗВЛЕЧЕНИЯ СВОБОДНЫХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ
АМИНОКИСЛОТ ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ ПРИ МНОГОКРАТНОМ
ЭКСТРАГИРОВАНИИ ЭТАНОЛОМ**

На примере пяти штаммов винных дрожжей показана возможность максимального извлечения большинства алифатических, дикарбоновых, двухосновных и ароматических аминокислот путем многоступенчатого экстрагирования горячим этанолом.

Изучение свободных внутриклеточных аминокислот дрожжевых микроорганизмов, культивируемых как на естественных, так и на синтетических питательных средах, постоянно привлекает к себе внимание, так как они играют основную роль на I этапе биосинтеза белковых молекул и являются главными источниками азота при синтезе ферментов [1].

У ряда микроорганизмов, в том числе и дрожжей, присутствуют азотистые фракции, легко экстрагируемые горячей водой, холодной ТХУ, 80⁰-м этанолом. Они известны как «свободные метаболиты», «metabolic pool», «pool», «запасной фонд клеток». В состав пула входят неорганические соединения, моносахариды, олигосахариды, но основными компонентами являются, безусловно, аминокислоты [2]. Высокомолекулярные структурные компоненты (как белки) с помощью таких экстракций не извлекаются, что позволяет четко дифференцировать и изучать состав свободных аминокислот, присутствующих данному микроорганизму [3].

Качественный и количественный состав запасного фонда дрожжей зависит от возраста культуры, состава питательной среды, источников азота, углерода, наличия или отсутствия витаминов и составляет 7–15% от сухого веса клеток [4]. Вместе с тем, биохимические процессы, протекающие в дрожжевых клетках, тесно взаимосвязаны с физиологическим состоянием клетки, ее фазами роста, условиями культивирования и т.д.

В данной работе исследована возможность максимального извлечения свободных аминокислот с помощью многократного экстрагирования этанолом на примере посевного материала (инокулума) пяти штаммов винных дрожжей.

Материал и метод исследования. Использовали винные штаммы дрожжей из коллекции лаборатории: *Saccharomyces vini*, штамм 246; *Sacch. oviformis* (армянские хересные дрожжи); *Sacch. vini*, штамм VI-8; *Sacch. vini*, штамм 107; *Sacch. vini*, штамм 253. Культуры выращивали на сусло-агаре (2⁰Блг) в сосудах Ру (матрасах) при 25–28⁰С в течение 2–3 суток. Полученную биомассу смывали холодной дистиллированной водой, центрифугировали (6000об/мин) и дважды промывали. Экстрагирование свободных внутриклеточных аминокислот из сырых дрожжей проводили 80⁰-м этанолом (гидромодуль 30) в центрифужных пробирках с обратным холодильником в течение одного часа при 76–78⁰С. Полученные экстракты сливали и использовали для количественного определения аминокислот после первого экстрагирования. Оставшуюся биомассу подвергали второй, а затем и третьей экстракции половинным по гидромодулю объемом этанола. В полученных экстрактах определяли количественное содержание спирторастворимых аминокислот методом хроматографии распределения на бумаге [5, 6], аминный азот по [7], а также общий азот дрожжей по [5].

Результаты и обсуждение. Содержание общего и аминного азота в исследуемых штаммах представлено в табл. 1. Низкие величины обусловлены спецификой культивирования инокула на твердой агаризованной среде с лимитированным запасом питательных веществ. Отметим, что в дальнейшем в экспоненциальной фазе роста клеток в условиях аэробного культивирования как на виноградном сусле, так и на другой полноценной среде процентное содержание свободных аминокислот возрастает вдвое, а некоторых аминокислот – как тирозин – в 8 раз [8].

Таблица 1

Содержание общего азота в дрожжах и аминного азота в спиртовых экстрактах аминокислот (мкг/100мг сухой биомассы)

Определяемые показатели	Исследуемые штаммы *				
	1	2	3	4	5
Общий азот	2,10	2,80	2,50	2,90	2,60
Аминный азот					
I экстракция	0,154	0,221	0,182	0,300	0,182
II экстракция	0,017	0,058	0,022	0,034	0,022
III экстракция	0,014	0,024	0,014	0,026	0,014
Сумма	0,185	0,303	0,218	0,360	0,218

* В таблицах 1–5: 1 – *Sacch. vini* (штамм 246), 2 – *Sacch. oviformis*, 3 – *Sacch. vini* (штамм VI-8), 4 – *Sacch. vini* (штамм 107), 5 – *Sacch. vini* (штамм 253).

Данные по многоступенчатому экстрагированию свободных аминокислот представлены в табл. 2–4. Поскольку прочность связей в тех или иных аминокислотах существенно различается, характеристика последних после первого экстрагирования этанолом, как оказалось, является неполноценной. Из исследуемых 15 аминокислот преобладают лей-илей, ала, вал-мет, в меньших количествах – арг, гли, лиз. Высокая концентрация алифатических, дикарбо-

новых и двухосновных аминокислот при первом экстрагировании (табл. 2) сохраняется в основном и при последующих экстракциях.

Таблица 2

Содержание свободных внутриклеточных аминокислот при первом экстрагировании (мкг/100мг сухой биомассы)

Аминокислоты	Исследуемые штаммы*				
	1	2	3	4	5
лиз+гис	69,8	98,5	88,2	160,1	108,4
арг	62,2	71,4	87,3	95,4	76,0
асп+сер	88,4	131,4	119,3	218,3	84,3
гли	55,0	80,1	90,1	150,4	65,2
глу	53,6	42,4	50,0	30,5	31,3
тре	89,9	103,4	120,2	240,1	130,5
ала	148,5	200,2	180,0	378,6	300,2
тир	8,9	15,1	9,0	14,8	8,1
ГАМК	7,8	23,8	15,5	22,0	13,5
вал-мет	147,4	157,9	148,6	115,6	138,0
лей-илей	251,3	260,4	204,7	249,9	120,4
Сумма	982,8	1184,6	1112,9	1675,7	1075,9

Таблица 3

Содержание свободных внутриклеточных аминокислот при втором экстрагировании (мкг/100мг сухой биомассы)

Аминокислоты	Исследуемые штаммы*				
	1	2	3	4	5
лиз+гис	16,35	25,80	18,52	39,90	21,80
арг	12,80	20,70	21,20	29,30	17,30
асп+сер	25,87	38,70	21,30	35,30	24,30
гли	17,70	23,10	22,90	38,00	28,40
глу	14,40	7,50	12,50	12,90	12,20
тре	9,37	9,60	10,60	17,60	14,60
ала	16,80	22,50	17,80	26,40	19,10
тир	3,75	4,08	3,37	4,50	2,50
ГАМК	0,80	следы	1,85	следы	1,87
вал-мет	17,7	следы	30,00	37,50	24,00
лей-илей	17,02	20,70	17,60	25,80	14,60
Сумма	152,56	172,68	177,64	267,2	180,67

Важнейшие аминокислоты азотного обмена – глу, асп и ала – извлекаются, как видно из приведенных данных, неполностью, составляя и при третьем экстрагировании значительную часть аминокислотного пула, тогда как тир, ГАМК, вал-мет, лей-илей остаются в следовых количествах (табл. 4), не поддающихся определению в условиях данного эксперимента.

Таким образом, на примере пяти испытуемых штаммов винных дрожжей было показано (табл. 5), что при первом экстрагировании свободных аминокислот извлекается 77–80% от их суммарного содержания. При втором

и третьем экстрагировании эта цифра составляет 11–13 и 7–10% соответственно.

Таблица 4

Содержание свободных внутриклеточных аминокислот при третьем экстрагировании (мкг/100мг сухой биомассы)

Аминокислоты	Исследуемые штаммы*				
	1	2	3	4	5
лиз+гис	21,60	33,50	28,00	48,90	31,60
арг	20,20	28,60	26,02	38,40	31,80
асп+сер	8,65	15,05	10,10	13,70	12,40
гли	17,30	28,10	17,02	27,50	16,30
глу	14,40	14,27	19,60	7,69	6,30
тре	6,35	10,50	7,20	13,20	6,02
ала	5,12	6,90	4,90	8,30	9,30
тир	–	–	–	–	–
ГАМК	–	–	–	–	–
вал-мет	–	–	–	18,10	21,40
лей-илей	–	–	–	5,80	6,80
Сумма	93,62	136,92	112,84	181,59	141,92

Таблица 5

Результаты многократного экстрагирования свободных внутриклеточных аминокислот дрожжей

Суммарное содержание аминокислот (данные по трем экстракциям), мкг/100мг	Исследуемые штаммы*				
	1	2	3	4	5
	1228,98	1494,20	1403,38	2124,49	1398,49
Поэтапное извлечение аминокислот (% от суммы)					
I экстракция	80,00	79,20	79,30	79,00	77,00
II экстракция	12,00	11,60	12,70	12,60	13,00
III экстракция	7,60	9,20	8,00	8,50	10,00

Трудноизвлекаемыми можно считать, в первую очередь, дикарбоновые (глу и асп), алифатические (ала, гли), двухосновные (арг, лиз, гис) аминокислоты, в силу чего рекомендуется трехкратная экстракция этанолом при вышеописанных условиях.

Кафедра биохимии

Поступила 18.02.2005

ЛИТЕРАТУРА

1. Osanal Minoru and Yumico Yonezawa – Insect Biochemistry, 1986, v. 16(2), p. 373 – 385.
2. Арутюнян Т.Г., Карапетян С.А., Хачатрян М.А. – Биолог. ж. Армении, 1955, т. XLVIII, № 21.
3. Безбородов А.М. – Микробиологическая промышленность. М., 1971, вып. 2.
4. Siess M.-N., Morfaux J.N. – Revue des fermentations et des industries alimentaires, 1972, v. 27, № 4, p. 153–161.

5. Белозерский Л.Н., Проскуряков Н.М. Практическое руководство по биохимии растений. М.: Советская наука, 1951.
6. Lissitzky S., Laurent G. – Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, v. 37, p. 1177.
7. Harding W.Y., Mac Lean R.M. – JBC, 1916, v. 24, p. 503.
8. Мантясян Э.А. – Биолог. ж. Армении, 1977, т. XXX, № 1, с. 105.

Է. Ա. ՄԱՆԹԱՇԻԱՆ

ԳԻՆՈՒ ԽՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՆԵՐՔՋՋԱՅԻՆ ԱՉԱՏ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԷԹԱՆՈՒՆՎ ԲԱԶՄԱՊԱՏԻԿ ԷՔՍՏՐԱԿՑԻԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ամփոփում

Գինու խմորասնկերի հինգ շտամների օրինակի վրա ցույց է տրված ամփնաթթուների մաքսիմալ անջատման հնարավորությունը տաք էթանոլով բազմակի էքստրակցիայի ժամանակ, որը թույլ է տալիս հայտնաբերել ալիֆատիկ, դիկարբոնային, երկհիմնային և արոմատիկ ամփնաթթուների մեծ մասը:

E. A. MANTACHIAN

ON THE EXTRACTION OF INTRACELLULAR FREE AMINO ACIDS OF WINE YEAST AT MULTIPLE TREATMENT BY ETHANOL

Summary

An example of five species of wine yeast the possibility of maximum extraction of amino acids is shown in multiple treatment by hot ethanol, permissive to extract majority of aliphatic, dicarbonic, dibasic and aromatic amino acids.