

## БИОХИМИЯ

М. А. Тер-Карпетян, академик АН Армянской ССР, и Э. А. Манташян

## Синтез пролина при брожении виноградного сусла

(Представлено 16/IV 1965)

При спиртовом брожении посредством дрожжевых организмов комплекс азотсодержащих компонентов виноградного сусла подвергается глубокой перестройке.

В период основного брожения сусла, соответствующего расщеплению наибольшей доли сахаров до этилового спирта, происходит почти полное исчезновение аммиачной и амидной форм азота. фракция аминного азота вначале значительно уменьшается, а затем остается постоянной или несколько повышается; пептиды и полипептиды показывают небольшие количественные изменения или в некоторой степени повышаются к моменту завершения процесса брожения.

Важнейшее значение представляют процессы ассимиляции азотистых веществ дрожжами, приводящие к их уменьшению в сусле, а также процессы выделения в сусло аминокислот, пептидов и т. п., образуемых в дрожжевых клетках.

Показано, что аминный азот как виноградного сусла, так и продуктов его брожения состоит из аминокислот, полипептидов и других соединений (<sup>1-4</sup>), которые идентифицировались методом хроматографии на бумаге (<sup>4,5</sup>). Таковыми являются глютаминовая и аспарагиновая кислоты, аланин, глицин, серин, треонин, валин, пролин.

Исследования Сисакяна, Безингер и других исследователей установили, что в процессе брожения все аминокислоты сусла исчезают из среды в силу ассимиляции их дрожжами, за исключением пролина, количество которого остается неизменным (<sup>6-10</sup>).

Дальнейшее появление аминокислот в молодом вине при его формировании истолковывается этими же авторами как выделение в среду аминокислот из дрожжевых организмов.

Механизм исчезновения и накопления свободных аминокислот в бродящем виноградном сусле изучен весьма недостаточно. Здесь особенно важно определить, какова интенсивность процессов усвоения и выделения аминокислот в условиях анаэробной жизнедеятельности дрожжей, какова роль частичного автолиза дрожжевых клеток в создании состава свободных аминокислот сброженного сусла. В этом отношении особый

интерес представляет аминокислота пролин настолько, поскольку вышеизложенные литературные данные не дают точного представления о его обмене в вышеупомянутых условиях.

Настоящая работа преследует цель изучения динамики пролина и установления факта синтеза этой аминокислоты в процессе брожения виноградного сусла.

Субстратом брожения служило виноградное сусло сорта Воскеат урожая 1961 года, слабо сульфитированного сернистым ангидридом и пастеризованного при 90°C в течение 60 минут в бутылках емкостью 0,75 л. Стерильное сусло хранилось в подвале. В качестве дрожжевой культуры был выбран производственный штамм Кахури-7, относящийся к виду *Saccharomyces vini* (11).

Таблица 1

Динамика общего азота, аминокислотного азота и пролина в процессе брожения сусла (опыты поставлены в бутылках)

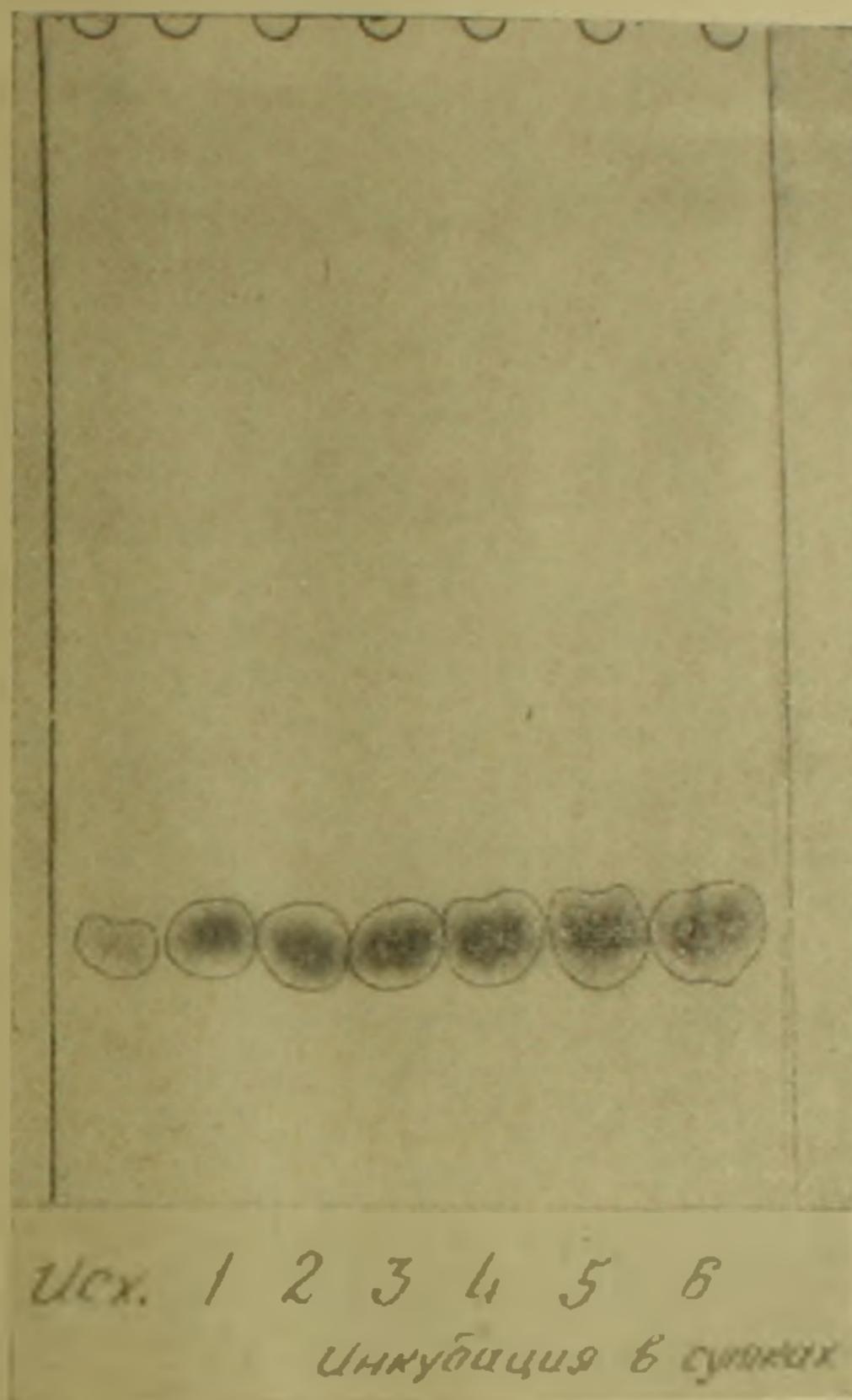
Дата опы-тов	Продолжи-тельность опыта в сутках	Содержа-ние суммы сахаров в г/100 мл	Общий азот в мг/100мл	Аминый азот в мг/100 мл	Азот про-лина в мг/100 мл
24, XI 1962 г.	Исходное	23,6	68,2	35,5	1,6
	2	19,0	37,5	21,0	2,4
	3	15,6	33,0	21,9	4,1
	5	8,8	17,0	19,7	3,3
	6	8,4	29,7	18,6	3,3
	10	5,9	19,2	17,5	3,4
	17	0,9	37,5	17,0	3,6
23/II 1963 г.	Исходное	23,7	86,0	37,8	1,7
	2	20,4	57,7	18,7	2,7
	3	17,5	24,7	16,3	4,8
	4	13,0	22,7	18,7	4,5
	5	10,0	31,5	18,7	3,9
	10	5,2	29,7	14,0	5,7
	15	4,5	24,5	19,2	5,7
18, V 1963 г.	Исходное	23,7	57,0	34,6	1,5
	2	14,6	45,0	27,7	4,2
	3	9,0	41,2	21,4	5,1
	4	3,9	40,2	20,1	5,7
	5	2,6	48,7	17,0	7,3
	10	0,3	52,5	15,2	—
	15	0,0	42,5	15,7	7,0

Культура хранилась в музейных условиях. Перед каждым опытом производился пересев на двухпроцентный сусло-агар. В опытах использовалась двухсуточная культура, вносимая в количестве 2—3 мг сухой биомассы на 100 мл сусла. Опыты ставились в условиях преобладающего анаэробноза в бутылках емкостью 0,75 л, содержащих 350 мл сусла и закупоренных специальными клапанами с водой, позволяющими определять убыль CO<sub>2</sub> путем взвешивания. Брожение велось также и в трубках длиной 100 см, диаметром 3 см с объемом сусла в 600 мл.

Некоторые опыты ставились в условиях аэрирования в конических колбах емкостью 750 мл, содержащих 100 мл сусла и подвергаемых взбалтыванию на круговой качалке со скоростью 200—250 об/мин.

Все опыты велись при температуре 20 ± 1°C.

Как в исходном сусле, так и в продуктах брожения были определены редуцирующие сахара по методу Хагедорн-Йенсена; общая, аммиачная, амидная формы азота по микрокельдалю; аминный азот формол-титрованием; аминокислоты — после разделения методом хроматографии на бумаге и проявления нингидрином за исключением пролина, который определяли путем проявления изатинном и последующей элюцией фенолом, насыщенным водой (12).



Фиг. 1. Динамика пролина в процессе брожения сусля. Исх.—пролин в исходном сусле; 1, 2, 3, 4, 5, 6—пролин в разных сроках брожения сусля.

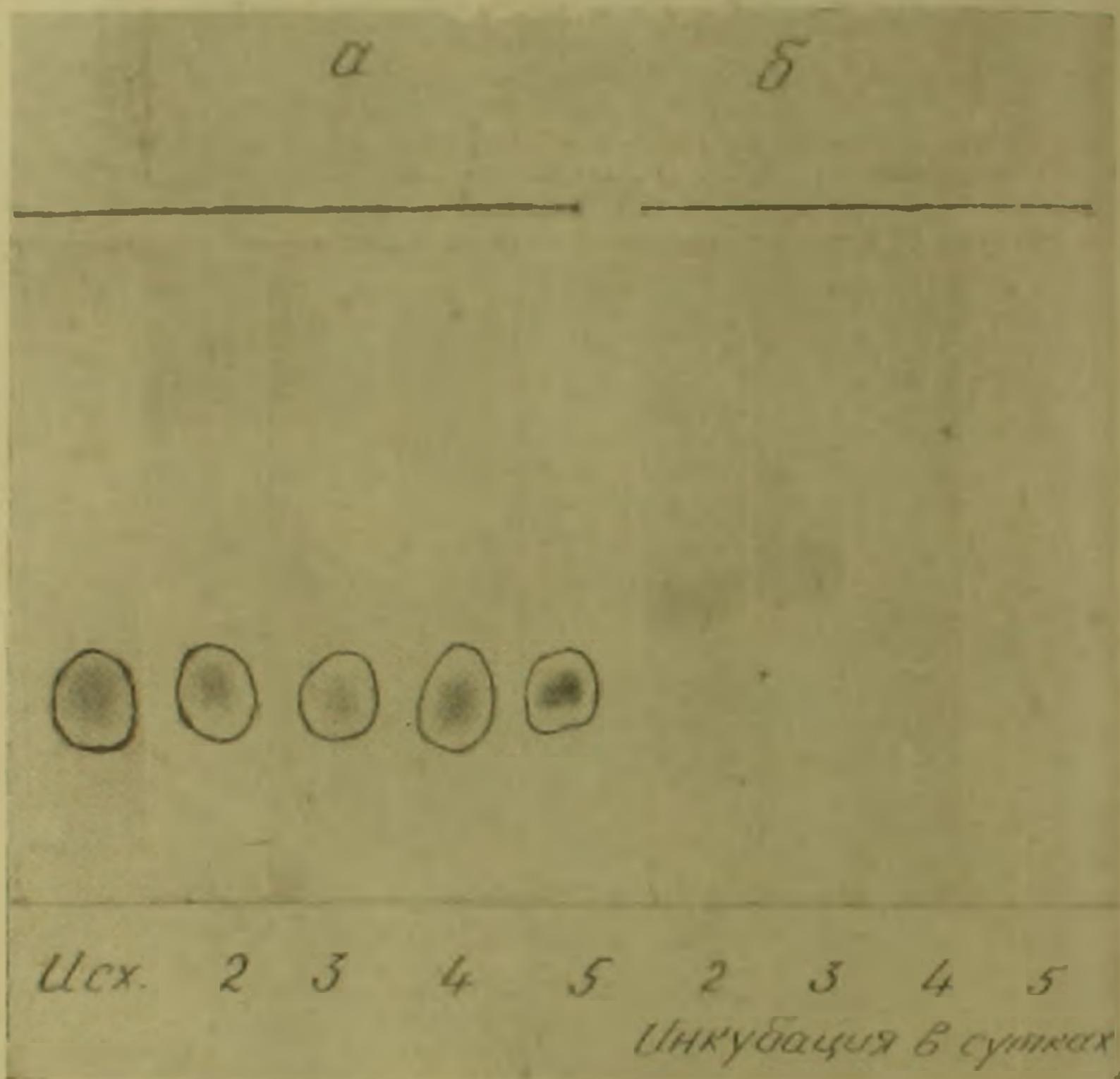
В табл. 1 приведены данные, полученные по трем разным режимам брожения, а именно: быстрый, средний и медленный, а на фиг. 1 представлена динамика пролина в одном из опытов (25/VII 1963 г.).

Полученные данные характеризуют особенности динамики пролина на фоне изменения сахаров, общей и аминной формы азота бродящего сусля: период бурного брожения завершается к 4—5 суткам после начала инкубации. Этот период характеризуется расщеплением 80—90% исходных редуцирующих сахаров, резким снижением общего азота, в ча-

стности аминного, в состав которого входят, в основном, аминокислоты.

При завершении брожения общая и аминная формы азота остаются относительно постоянными, но в этот период иногда происходит некоторое, еще трудно управляемое повышение этих групп соединений, приписываемое выделению аминокислот и пептидов из дрожжей в среду.

Динамика пролина наглядно отличается от таковой остальных фракций азота, так как концентрация его постоянно повышается от начала до конца брожения. В некоторых случаях до начала бурного брожения



Фиг. 2. Динамика пролина: а—в процессе брожения сусла; б—в процессе аэробного выращивания дрожжей в сусле; Исх.—пролин в исходном сусле; 2, 3, 4, 5—пролин в разных сроках брожения или аэробного выращивания.

происходит частичное снижение количества пролина в среде, но это явление имеет временный характер и объясняется тем, что за этот промежуток времени процессы усвоения пролина возрастающей биомассой преобладают над процессами его синтеза.

Так как внесенный в сусло посевной материал приносит с собой незначительное количество аминокислот, повышение концентрации пролина в процессе спиртового брожения сусла может быть объяснено лишь синтезом его дрожжевыми клетками.

Предварительные опыты, поставленные в описанных условиях, показали (табл. 2 и фиг. 2), что пролина образуется исключительно при преобладающем анаэробнозе, в то время как в аэробных условиях культивирования, когда происходит интенсивное размножение клеток, вместо синтеза происходит исчезновение из среды исходного пролина. Убыль пролина при аэробном культивировании дрожжей может быть вызвана двумя причинами, а именно: накоплением синтезированного пролина в биомассе или подавлением процессов синтеза.

Таблица 2

Влияние аэрирования на синтез пролина (анаэробные варианты поставлены в трубках, аэробные — в колбах. I, II — параллельные сосуды)

Продолжительность опыта в сутках	В а р и а н т ы	Содержание сахара в г/100 мл	Азот пролина в мг/100 мл	
Исходное	Опыт 25/VII 1963 г.			
			23,6	1,8
	2	I Анаэробный . . . . .	21,1	1,8
		II то же . . . . .	21,4	1,2
		I Аэробный . . . . .	15,0	следы
II то же . . . . .		15,0	следы	
3	I Анаэробный . . . . .	14,6	3,0	
	II то же . . . . .	14,6	3,4	
	I Аэробный . . . . .	6,5	нет	
	II то же . . . . .	6,5	нет	
4	I Анаэробный . . . . .	5,7	5,4	
	II то же . . . . .	6,8	4,8	
	I Аэробный . . . . .	1,8	нет	
	II то же . . . . .	1,5	нет	

В доступной нам литературе мы не встречались еще с фактом накопления пролина в бродящих сусле — как виноградного, так и солодового (3-6, 8, 13). Имеется лишь одно указание о накоплении пролина в дрожжевых клетках при спорообразовании (14).

Вышеприведенные исследования дают объективное основание считать вполне возможным синтез пролина при брожении виноградного сусла.

Так как это явление наступает с ранних фаз брожения, исключается априори возможность образования пролина за счет расщепления белковых компонентов дрожжевых клеток.

Ереванский государственный университет

И. А. СЕГ-ԿԱՐԱԳԵՏՅԱՆ, Հայկական ՍՍՏ ակադեմիկոս, Լ. Է. Ա. ՄԱՆՔԱՇՅԱՆ

**ՊՐՈԼԻՆԻ ԱԻՆՐԵԿՐ ԽԱՂՈՂԻ ԲԱՊԿՈՒՄԻ ԽՈՐՈՄԻԱՆ ԸՆԲՐԱԳՐՈՒՄ**

Խմորասնկերի կողմից խաղողի թաղանթի սպիրտային խմորման ժամանակ, թաղանթի ազոտ-պարունակող բաղադրի մասերը, հատկապես ամինաթթուները, ամիդները և այլն, խորը վերափոխման են ենթարկվում:

Քաղցուի խմորման ընթացքում ազատ ամինաթթուների և հատկապես պրովինի յուրացման կուտակման օրինաչափությունները դեռևս անբավարար են ուսումնասիրված:

Ներկա աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել պրովինի փոխանակության դինամիկան սկզբնառ սորաի խազոզի քաղցուի սպիրտային խմորման ընթացքում: Որպես խմորի օրգանիզմ ընտրվել է *Saccharomyces vini* կախուրի-7 ջնդը:

Ստացված փորձնական տվյալները (աղ. 1, նկ. 1) ցույց են տալիս, որ, ի տարբերություն ընդհանուր և ամինային ազոտի ֆրակցիաների, որոնք սկզբում զգալիորեն պակասում են, իսկ հետո համեմատաբար մնում կայուն, պրովինի քանակությունը՝ քաղցուի խմորման առաջին իսկ ֆազաներից սկսած մինչև վերջը, խիստ ավելանում է:

Քանի որ, որպես ցանքանյութ ծառայող խմորասնկերը միջավայրին բերում են շատ լայն քանակությամբ պրովին, ենթադրվում է, որ պրովինի կուտակումը տեղի է ունենում խմորասնկերի կողմից կատարվող սինթեզի շնորհիվ:

Խմորվող քաղցուի մեջ պրովինի կուտակումը նկատվում է բացառապես խմորասնկերի անաերոբ կենսազործունեության պայմաններում (աղ. 2, նկ. 2):

Բացի դրանից, բացառվում է նաև պրովինի կուտակումը խմորասնկային բջիջների սպիտակուցների քայքայման հետևանքով, քանի որ պրովինի ինտենսիվ սինթեզը դնում է խմորման վաղ ֆազաներում:

### ЛИТЕРАТУРА — ՊՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- <sup>1</sup> Хенниг, Zeitsch. Unters. Lebensmitt, т. 87, 40, 1944. <sup>2</sup> А. И. Опарин, Э. И. Безингер, „Биохимия“, т. 14, 3, 291, 1949. <sup>3</sup> Н. М. Сисакян, Э. И. Безингер, „Биохимия“, 18, 4, 412, 1959. <sup>4</sup> Н. М. Сисакян, Э. И. Безингер, ДАН СССР, т. 69, 4, (1949). <sup>5</sup> Н. М. Сисакян, Э. И. Безингер, Сб.: „Биохимия виноделия“, АН СССР, т. 3, 85, 1950. <sup>6</sup> Г. Н. Беридзе, Э. И. Безингер, М. Г. Сирбиладзе, Е. Б. Куваева, Сб.: „Биохимия виноделия“, АН СССР, т. 4, 187, 1953. <sup>7</sup> Г. Н. Беридзе, М. Г. Сирбиладзе, „Виноделие и виноградарство СССР“, № 1, 1961. <sup>8</sup> Г. Г. Валуйко, В. И. Нилов, Труды ВНИИВиВ „Магарач“ и „Виноделие“, т. 7, 72, 1959. <sup>9</sup> Г. Н. Беридзе, М. Г. Сирбиладзе, Сб. „Биохимия виноделия“, АН СССР, т. 7, 102, 1963. <sup>10</sup> В. И. Нилов, Г. Г. Валуйко, „Виноделие и виноградарство СССР“, № 4, 1958. <sup>11</sup> В. И. Кудрявцев, Систематика дрожжей, М., 1954. <sup>12</sup> Е. Храбетова, Я. Тули, J. Chromat., т. 3, 2, 199, 1960. <sup>13</sup> Е. Бартон — Райт, Bloch, Biophys. Acta 3, 5/6, 679, 1949. <sup>14</sup> С. Рамиз, С. Миллер Nature (London), т. 197 (4868), 722, 1963.