

Н. М. СИСАКЯН и Э. Н. БЕЗИНГЕР

## РАЗДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В ВИНЕ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ НА БУМАГЕ

(Представлено академиком А. И. Опариным 4 X 1949)

В настоящее время нет прямых доказательств, указывающих на влияние азотистых соединений на качество вина. Тем не менее, такое предположение не лишено оснований. Известно, что дрожжи при спиртовом брожении образуют из некоторых аминокислот ароматические спирты<sup>(1)</sup>, которые сами или, что более вероятно, в сочетании с органическими кислотами в виде сложных эфиров могут являться источником «букета» вина.

С другой стороны, аминокислоты виноградного сусла используются дрожжами при брожении в качестве азотистого питания. Имеющиеся в литературе указания<sup>(2-4)</sup> и др.) свидетельствуют о том, что для роста и развития пивных дрожжей совсем не безразличным является аминокислотный состав питательной среды. Дрожжи отдают явное предпочтение одним аминокислотам в ущерб другим и значительно лучше развиваются на среде, где источником азотистого питания являются не отдельные аминокислоты, а их смесь.

Чтобы глубже проникнуть в биохимические процессы, совершающиеся при азотистом обмене, и проследить судьбу азотсодержащих соединений при созревании вина, необходимо детальное знакомство с составом как свободных аминокислот в виноградном сусле и вине, так и более крупных молекул, в которые они связаны,— полипептидов, белков.

До настоящего времени исследователи, изучая превращение азотистых веществ при брожении вина, обычно ограничивались определением различных форм азота. Метод хроматографии распределения на бумаге<sup>(5)</sup> дает широкие возможности для учета незначительных количеств аминокислот (от 2—5  $\mu\text{g}$ ), что очень существенно для изучения такого объекта, как вино.

Не только относительно малое содержание аминокислот в вине, но и большое количество других веществ, входящих в его состав, представляли затруднения для их исследования. Мы надеялись с помощью указанного метода преодолеть и эту трудность.

Наиболее подходящими для применения хроматографического метода нам представлялись кахетинские вина Грузии. Действительно, в них, согласно нашим данным (табл. 1), отношение количества аминного азота к общему азоту оказалось значительно выше, чем в винах европейского типа.

Исследуя более подробно азотистые соединения вина, А. И. Опарину и Э. Н. Безингер<sup>(7)</sup> удалось показать наличие свободных аминокислот в вине и подтвердить присутствие полипептидов в нем.

Применяя ту же схему анализа для катехинских вин, мы установили, что содержание азота свободных аминокислот ( $\text{COOH} - \text{N}$ ), определяв-

Таблица 1

## Содержание общего азота и аминного азота в кахетинских винах

Кახетинское вино	Общий N в мг/л	NH <sub>2</sub> — N в мг/л	Отношение NH <sub>2</sub> — N к общему N в %
1947 г. . . . .	200,0	91,2	45,6
	214,0	95,4	44,5
1948 г. . . . .	361,9	171,4	47,4
	301,6	138,3	45,8

шегося по нингидринному методу Ван-Слайка и сотр., в некоторых случаях превышало количество азота аминных групп (NH<sub>2</sub> — N), обнаруженного методом диазотирования того же автора (табл. 2).

Таблица 2

Содержание аминного азота (NH<sub>2</sub>) по методу диазотирования Ван-Слайка и азота свободных аминокислот (COOH — N) в кахетинских винах

Год урожая	NH <sub>2</sub> — N в мг/л	COOH — N в мг/л
1947 г. . .	115,2	130,7
1947 г. . .	113,6	130,4
1948 г. . .	138,3	163,6
1948 г. . .	171,4	182,0

атмосферу 0,1% NH<sub>3</sub>. Полученные значения сведены в табл. 4 и 5. В опытах, приведенных в табл. 4, применялась фильтровальная бумага ватман № 2, а в опытах, приведенных в табл. 5 — ватман № 4. В каче-

Эти данные могли показаться парадоксальными, если учесть наличие в вине также и полипептидов, свободные аспарагиновой кислоты и, главным лишь по второму способу. Как видно из данных табл. 3, полипептиды были также обнаружены в кахетинских винах.

Однако присутствие в вине отчасти аспарагиновой кислоты и, главным образом, пролина и оксипролина вполне объяснило бы полученные результаты (8).

Пользуясь методом хроматографии распределения на бумаге (5), мы применяли в качестве растворителя фенол, насыщенный водой, с прибавлением в

Таблица 3

Содержание азота полипептидов в мг/л в кахетинских винах до и после гидролиза 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (урожай 1947 г.)

Общий азот	До гидролиза		После гидролиза		Азот полипептидов
	NH <sub>2</sub> — N	COOH — N	NH <sub>2</sub> — N	COOH — N	
214,0	95,4	130,7	134,5	147,5	39,1
	115,2		120,0		

стве объекта исследования мы воспользовались кахетинским вином урожая 1948 г., приготовленным по новой технологии Г. И. Беридзе и любезно предоставленным им. Из вина удалялись летучие кислоты и после нейтрализации оно сгущалось до нужной концентрации.

Полученные нами скорости движения чистых аминокислот, растворенных в воде (контрольные задачи 1 и 5), были близки к значениям R<sub>F</sub> Консдена и сотр. (5), которые работали с ватманской бумагой № 1; в табл. 5 контрольные задачи (1 и 5) совпали с данными Дента (9), работавшего, так же как и мы в этих опытах, с ватманской бумагой № 4.

Таблица 4

Скорости движения аминокислот ( $R_F$ ) в феноле

Аминокислоты	№№ задач					Значение $R_F$ по (*)
	1	2	3	4	5	
	Контроль, аминок-та, раств. в воде	Аминок-та, раств. в вине	Вино	Аминок-та, раств. в вине	Контроль, аминок-та, раств. в воде	
Аспарагиновая I	0,12	0,14	0,12	—	—	0,12
» II	0,12	0,14	—	—	—	
Глутаминовая I	—	—	0,24	0,25	0,21	0,19
» II	—	—	0,25	0,25	0,20	
Серин I	—	—	0,33	0,32	0,34	0,35
» II	—	—	0,30	0,30	0,32	
Глицин I	0,38	0,37	—	—	—	0,41
» II	0,38	0,36	0,37	—	—	
Треонин I	—	—	0,44	0,45	0,48	0,47
» II	—	—	0,42	0,42	0,46	
Аланин I	0,56	0,51	0,51	—	—	0,55
» II	0,53	0,50	0,50	—	—	
Валин I	—	—	0,69	0,69	0,75	0,76
» II	—	—	0,67	0,66	0,71	
Пролин I	—	—	0,80	0,80	0,90	0,89
» II	—	—	0,77	0,78	0,85	

Таблица 5

Скорости движения аминокислот ( $R_F$ ) в феноле

Аминокислоты	№№ задач					Значение $R_F$ по (*)
	1	2	3	4	5	
	Контроль, аминок-та, раств. в воде	Аминок-та, раств. в вине	Вино	Аминок-та, раств. в вине	Контроль, аминок-та, раств. в воде	
Аспарагиновая	0,17	0,19	0,19	—	—	0,17
Глутаминовая	—	—	0,28	0,28	0,30	0,28
Серин	0,44	0,40	0,44	—	—	0,42
Глицин	—	—	неясно	0,44	0,50	0,42
Треонин	—	—	0,54	—	—	0,50
Аланин	0,67	0,62	0,62	—	—	0,62
Валин	—	—	0,75	—	—	0,80
Пролин	—	—	0,84	—	—	0,86
Фенилаланин	—	—	0,92	0,90	0,90	0,86

Рядом с контрольными задачами, где аминокислоты были растворены в воде (1 и 5), наносились на расстоянии 2 см капли 2 и 4, где те же аминокислоты были смешаны с испытуемым вином.

Такая постановка опыта давала возможность наблюдать те сдвиги в значениях  $R_F$ , которые обуславливались влиянием других веществ вина на скорость продвижения аминокислот. Действительно,  $R_F$  в задачах 2 и 4 иногда значительно отличались от  $R_F$  в контроле (1 и 5). В задаче 3 наносилась капля испытуемого вина без внесения препаратов аминокислот. Капля 3 наносилась на ту же полоску бумаги между каплями 2 и 4 для лучшего сравнения. Значения  $R_F$  в задаче 3 совпадали или были близки с таковыми в задачах 4 и 5.

Идентифицированные в вине аминокислоты после проявления нингидрином не только по значению  $R_F$ , но и по окраске пятен вполне совпадали с данными Консдена и сотр. (5) и Дента (10).

Уже в наших предварительных опытах на основании интенсивности окраски пятен и их величины можно было сделать предположение об относительных количествах аминокислот в вине. Так, можно было предположить, что глутаминовой кислоты, аланина и валина в кахетинском вине больше, чем аспарагиновой кислоты, серина, глицина и треонина. Очень четко вырисовывались на хроматограмме желтые пятна пролина, которого в вине оказалось много. Следовательно, данные хроматографии подтвердили наши предположения, сделанные на основании количественных определений  $\text{COOH}-\text{N}$  и  $\text{NH}_2-\text{N}$  о присутствии пролина в вине.

Возможно, что в кахетинском вине есть фенилаланин, но в незначительных количествах. Это предположение требует еще дополнительных доказательств, так как полученные на хроматограмме пятна слабо окрашены или несколько сдвинуты.

Таким образом, с помощью метода хроматографии распределения на бумаге в вине обнаружены аминокислоты: глутаминовая, аланин, валин и пролин. В незначительных количествах найдены также аспарагиновая кислота, серин и треонин. Предполагается присутствие фенилаланина.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР  
и Институт виноградарства  
и виноделия Академии наук  
Груз. ССР

Поступило  
3 X 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. R. Porter, *Bacterial Chemistry and Physiology*, N.-Y., 1946. <sup>2</sup> N. Nielsen, *C. R. trav. Lab. Carls., sér. physiol.*, **21**, 395 (1936); *C. R. trav. Lab. Carls., sér. chim.*, **22**, 384 (1938). <sup>3</sup> V. Hartelius, *Bioch. Zs.*, **299**, 317 (1938). <sup>4</sup> R. S. W. Thorne, *Wallerstein Labor. Comm.*, **9**, No. 27 (1946). <sup>5</sup> R. Connsden, A. H. Gordon and A. J. P. Martin, *Biochem. Journ.*, **38**, 224 (1944). <sup>6</sup> J. Ribereau-Gayon et E. Peynaud, *Analyse et contrôle des vins*, Paris et Liège, 1947. <sup>7</sup> А. И. Опарин и Э. Н. Безингер, *Биохимия*, **14**, 291 (1949). <sup>8</sup> D. D. Van Slyke, D. A. Macfadyen and P. Hamilton, *Journ. Biol. Chem.*, **141**, 671 (1941). <sup>9</sup> C. B. Dent, *Biochem. Journ.*, **41**, 240 (1947). <sup>10</sup> C. E. Dent, *ibid.*, **43**, 169 (1948).