

K OTÁZKE AMINOKYSELÍN VO FERMENTAČNÝCH PÔDACH (I) IDENTIFIKÁCIA KYSELINY γ -AMINOMASLOVEJ V KUKURIČNOM VÝLUHU

J. ZELINKA, M. HUDEC

Pokusné pracovisko kukuričného výluhu Slovenských škrobární, n. p., Boleráz

Metabolizmu aminokyselín v priebehu biosyntetických procesov u mikroorganizmov sa v poslednom čase venuje zvýšená pozornosť. Týka sa to najmä biosyntézy penicilínu [1, 5, 6, 11, 15]. Pretože sa vo fermentačných pôdach pri biosyntéze penicilínu používa kukuričný výluh ako základná surovina, študoval sa tento aj z hľadiska obsahu aminokyselín. Náš názor na možnosť vplyvu povahy a obsahu aminokyselín jednotlivých výrobných šarží na kvalitu kukuričného výluhu sme uverejnili v predchádzajúcej práci [25]. Podľa klasickej práce E. V. Cardinala a L. R. Hedricka [4] obsahuje kukuričný výluh tieto aminokyseliny: leucín, izoleucín, valín, kyselinu glutamovú, treonín, lyzín, arginín, histidín, prolín, fenylalanín, metionín, kyselinu asparágovú, cystín, alanín a tyrozín. M. Herold [10] udáva ten istý výskyt aminokyselín okrem cystínu. Okrem týchto aminokyselín sú podľa K. Smolka [19] v kukuričnom výluhu prítomné glycín, serín, cysteín a tryptofán. Podľa A. J. H. Pyleho [15] kukuričný výluh obsahuje tieto aminokyseliny: kyselinu asparágovú, kyselinu glutamovú, glycín a) alebo serín, alanín, ornitín a) alebo lyzín, tryptofán, prolín, valín, leucín, arginín a histidín.

Po predbežnej analýze aminokyselín v kukuričnom výluhu pomocou papierovej elektroforézy metódou T. H. Wielanda a E. Fischera [23], ktorú použili F. Schneider, E. Reinfeld a H. Müller [18] pri analýze rastlinných štiav, rozdelili sme aminokyseliny kukuričného výluhu do 5 skupín: kyselina asparágová, kyselina glutamová, neutrálne aminokyseliny, kyselina γ -aminomaslová a zásadité aminokyseliny. Tú istú metodiku používajú T. Turský a E. Bielik [22] a T. Turský [21]. L. J. Reed [16] identifikoval kyselinu γ -aminomaslovú v kvasničnom extrakte Difco, C. E. Dent [7] v krvi, moči a v zemiakovom extrakte. V mozgu dokázali prítomnosť kyseliny γ -aminomaslovej J. Awapara a spolupracovníci [2], E. Roberts a S. Frankel [17], W. J. Wingo a J. Awapara [24]. V baktériách ju zistili E. F. Gale [8], V. A. Najjar a J. Fisher [14].

Predmetom tejto práce je dôkaz kyseliny γ -aminomaslovej v kukuričnom výluhu.

Metodická časť

Elektroforéza na papieri

Použila sa metóda zostupnej elektroforézy podľa O. Mikeša [13]. Pracovalo sa so svorkovým napätím 1280 V. Použil sa papier Whatman 1. Vzorka sa pri dôkaze nanášala

v množstve 0,01 ml roztoku 5 g sušiny kukuričného výluhu doplneného destilovanou vodou do 50 ml; pri kvantitatívnej analýze sa nanášalo 0,01 ml roztoku 2,5 g sušiny kukuričného výluhu doplneného destilovanou vodou do 50 ml ako čiara dlhá 1,5 cm kolmá na smer zostupu, vzdialená 16,5 cm od dolného okraja papiera. Rozstupy medzi nanesenými čiarami boli 3,5 cm. Papier sa postriekal tmivým roztokom o pH 3,75, ktorý sa pripravil nasledujúcim spôsobom: základný roztok o zložení 20 ml pyridínu + 60 ml ľadovej kyseliny octovej + 1420 ml destilovanej vody sa zriedil destilovanou vodou v pomere 1 : 9 [20]. Doba trvania elektroforézy: a) pri dôkaze 100 min., b) pri kvantitatívnej analýze 120 min. Po skončení elektroforézy sa papier vysušil pri 80 °C.

Jednorozmerná zostupná papierová chromatografia

Použil sa systém rozpúšťadiel podľa O. Mikeša [13]: 13 ml ľadovej kyseliny octovej a 43,5 ml destilovanej vody sa doplnilo butanolom do 200 ml, zmes sa roztrepala a rozdelila. Chromatografia prebiehala v sklenených vaniach zostupne za trojnásobného vyvíjania. Na dno vane sa v Petriho miskách umiestilo rozpúšťadlo. Vzorka sa nanášala v množstve 0,01 ml z roztoku ako pri kvantitatívnej analýze s rozstupmi 3 cm kolmo na smer zostupu vo vzdialenosti 10 cm od horného okraja papiera Whatman 1 o rozmeroch 16 × 46 cm. Doba jedného vyvíjania trvala 16—18 hod. pri laboratórnej teplote.

Dvojrozmerná zostupná papierová chromatografia

Použili sa tieto systémy rozpúšťadiel: v prvom rozmere ako pri jednorozmernej chromatografii, v druhom rozmere fenol sýtený vodou [9].

Elektrochromatografia

Elektrochromatografia sa uskutočnila kombinovaním elektroforézy na papieri a jednorozmernej zostupnej papierovej chromatografie, pričom poradie týchto dvoch operácií sa menilo. V prípade použitia elektroforézy ako prvej fázy sa vzorka nanášala v množstve 0,02 ml roztoku 5 g sušiny kukuričného výluhu doplneného destilovanou vodou do 50 ml ako čiara dlhá 1,5 cm kolmá na smer zostupu elektroforézy, vzdialená 16,5 cm od dolného okraja papiera a 10 cm od ľavého okraja papiera. Elektroforéza prebiehala za uvedených podmienok 100 min. Po skončení elektroforézy sa papier vysušil pri 80 °C, načo sa chromatografovalo tak, že smer zostupu rozpúšťadla bol kolmý na smer elektroforézy. Chromatografovalo sa za uvedených podmienok. Doba jedného vyvíjania bola 24—30 hod. pri laboratórnej teplote. Ak chromatografia predchádzala elektroforézu, nanášalo sa to isté množstvo vzorky ako čiara 1,5 cm dlhá, vzdialená 10 cm od horného okraja papiera, pričom začiatok tejto čiary bol 15 cm od ľavého okraja. Ostatné podmienky boli nezmenené.

Detekcia

Na detekciu sa použila metóda F. Bodeho [3]: 450 mg ninhydrínu, 5 ml ľadovej kyseliny octovej a 5 ml destilovanej vody sa doplnilo do 100 ml acetónom p. a. V tomto roztoku sa chromatogramy, elektroforegramy a elektrochromatogramy pretiahli a vysušili za 15 min. pri 80 °C. Po vysušení sa fixovali dusičnanom mednatým, ktorý sa upravil takto: 1 ml nasýteného roztoku dusičnanu mednatého sa zmieša s 0,02 ml kyseliny dusičnej a doplní sa acetónom do 100 ml. V tomto roztoku sa papier pretiahol a usušil v tme pri laboratórnej teplote za 30 min.

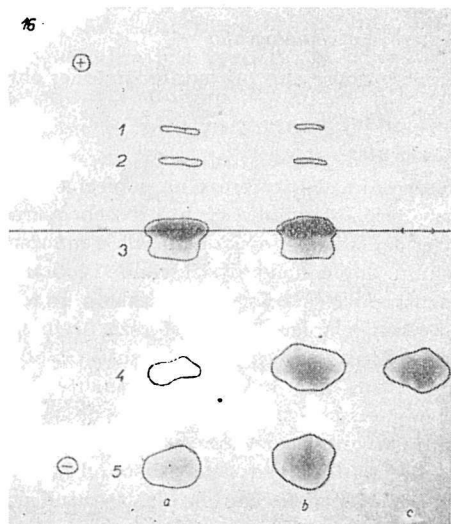
Pridávanie kyseliny γ -aminomaslovej

Roztok kyseliny γ -aminomaslovej, ktorý sa pridával do kukuričného výluhu a používal sa ako kontrola, pripravil sa doplnením 20 mg kyseliny γ -aminomaslovej do 50 ml desti-

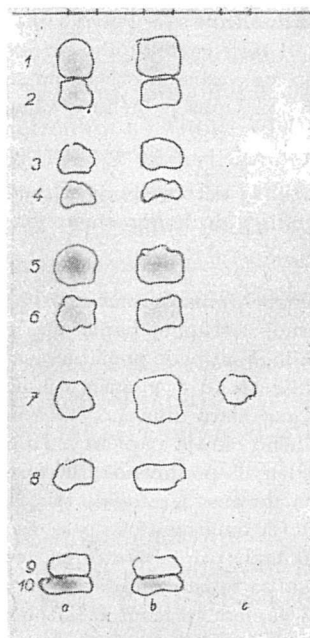
lovanou vodou. Z tohto roztoku sa pri elektroforeze a jednorozmernej chromatografii pipetovalo 0,01 ml (4 μg) a pri elektrochromatografii 0,02 ml (8 μg), ktoré sa naniesli na filtračný papier.

Kvantitatívna analýza kyseliny γ -aminomaslovej papierovou elektroforézou

Pri kvantitatívnej analýze sa okrem vzoriek kukuričného výluhu nanášal štandardný roztok kyseliny γ -aminomaslovej, aby sa získala kalibračná krivka pre fotokolorimetrické stanovenie. Použil sa roztok 0,1 g kyseliny γ -aminomaslovej doplnenej na 50 ml. Z tohto roztoku sa nanášalo 0,002 ml (4 μg), 0,005 ml (10 μg) a 0,01 ml (20 μg). Ostatné podmienky ostali nezmenené. Po detekcii a fixácii sa rovnaké plochy papiera so škvrnami rozstrihali na úzke prúžky a eluovali v skúmavkách podľa F. Bodeho [3] metanolom.



Obr. 1.



Obr. 2.

Obr. 1. Elektroforegram aminokyselín v kukuričnom výluhu.

a) kukuričný výluh, b) kukuričný výluh + kyselina γ -aminomaslová, c) kyselina γ -aminomaslová.

1. kyselina asparágová; 2. kyselina glutamová; 3. neutrálne aminokyseliny; 4. kyselina γ -aminomaslová; 5. zásadité aminokyseliny.

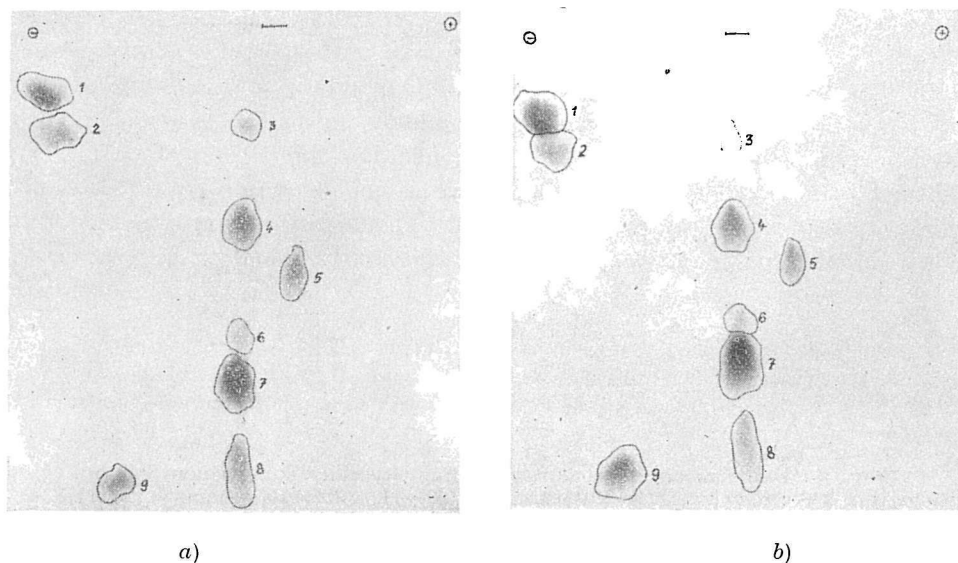
Obr. 2. Jednorozmerný chromatogram aminokyselín v kukuričnom výluhu.

a) kukuričný výluh, b) kukuričný výluh + kyselina γ -aminomaslová, c) kyselina γ -aminomaslová.

1. cystín, kyselina asparágová; 2. arginín, histidín, lyzín; 3. kyselina glutamová, glycín; 4. treonín; 5. alanín; 6. prolín; 7. kyselina γ -aminomaslová; 8. valín, metionín; 9. fenylalanín; 10. leucín, izoleucín.

Výsledky

Z obr. 1 je zrejmé, že pridanie kyseliny γ -aminomaslovej k vzorke kukuričného výluhu sa prejaví zväčšením škvrny oddelenej kyseliny γ -aminomaslovej na elektroforegrame (b). Poloha škvrny úplne súhlasí so škvrnou kontroly (c). Podľa obr. 2 súhlasí poloha škvrny kyseliny γ -aminomaslovej s polohou kontroly (b, c) na jednorozmernom chromatograme, na ktorom sa za podmienok, ktoré sme použili, kyselina γ -aminomaslová dobre oddeľuje. Na elektrochromatogramoch, najmä tých, na ktorých v prvej fáze prebiehala elektroforéza (obr. 3, b-9), je zrejmé pridanie kyseliny γ -aminomaslovej. Na



Obr. 3. Horná časť elektrochromatogramu aminokyselín v kukuričnom výluhu.

a) kukuričný výluh, b) kukuričný výluh + kyselina γ -aminomaslová.

1. arginín, histidín; 2. lyzín; 3. cystín; 4. glycín; 5. kyselina glutamová; 6. treonín; 7. alanín; 8. prolín; 9. kyselina γ -aminomaslová.

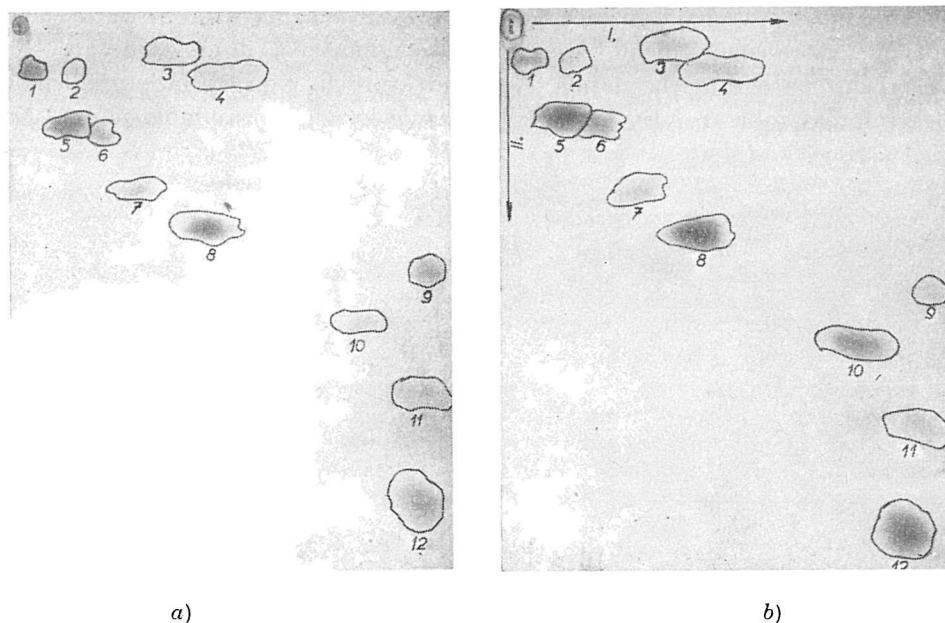
elektrochromatograme, ako aj na dvojrozmernom chromatograme (obr. 4, b-10) sa pridaná kontrolná kyselina γ -aminomaslová umiestila v súlade s kyselinou γ -aminomaslovou z kukuričného výluhu.

V tab. 1 sú uvedené predbežné analýzy prevádzkových šarží kukuričného výluhu na obsah kyseliny γ -aminomaslovej, ktorý je vyjadrený v percentách na sušinu. Obsah kyseliny γ -aminomaslovej v našom kukuričnom výluhu presahuje v priemere 2 %, počítané na sušinu kukuričného výluhu, čo je vyššie než jej obsah v kvasničnom extrakte Difco, ako udáva L. J. Reed [16].

Z chromatogramov, elektroforegramu a elektrochromatogramov je ďalej zrejmé, že sme v našom kukuričnom výluhu, vyrobenom na jeseň 1957, zatiaľ

identifikovali tieto aminokyseliny: cystín, kyselinu asparágovú, arginín, histidín, lyzín, kyselinu glutamovú, glycín, treonín, alanín, prolín, kyselinu γ -aminomaslovú, valín, metionín, fenylalanín, leucín a izoleucín.

Zatiaľ nie je známe, či kyselina γ -aminomaslová vzniká už v kukurici alebo



Obr. 4. Dvojrozmerný chromatogram aminokyselín v kukuričnom výluhu.

a) kukuričný výluh, b) kukuričný výluh + kyselina γ -aminomaslová.

1. kyselina asparágová; 2. cystín; 3. lyzín; 4. arginín + histidín; 5. kyselina glutamová; 6. glycín; 7. treonín; 8. alanín; 9. prolín; 10. kyselina γ -aminomaslová; 11. valín + metionín; 12. fenylalanín + leucín + izoleucín.

I. fenol—voda; II. butanol—kyselina octová—voda.

Tabuľka 1

Označenie vzorky	Sušina v %	Obsah kyseliny γ -aminomaslovej v % na sušinu
240957	56,2	2,37
260957	61,4	2,85
011057	57,0	2,40
031057	65,6	2,89
051057	58,9	2,54
141057	62,8	2,85
161057	63,2	1,91
181057	61,8	2,08
221057	65,0	2,43
241057	62,8	2,28

v priebehu máčania kukurice dekarboxyláciou kyseliny glutamovej. T. H. Mead a M. V. Stack [12] zistili v kukuričnom výluhu β -fenyletylamín a β -*p*-hydroxyfenyletylamín (tyramín). Predpokladajú, že látky, ktoré izolovali, môžu vznikáť bakteriálnou dekarboxyláciou príslušných aminokyselín (fenylalanínu, resp. tyrozínu) v priebehu máčacieho procesu.

Súhrn

V kukuričnom výluhu sa identifikovala kyselina γ -aminomaslová, ktorá sa dobre oddeľuje elektroforézou na papieri, jednorozmernou a dvojrozmernou papierovou chromatografiou v systémoch rozpúšťadiel butanol—kyselina octová—voda a fenol—voda, ako aj elektrochromatografiou.

Podľa predbežných analýz je obsah kyseliny γ -aminomaslovej v kukuričnom výluhu, počítaný na sušinu výluhu, v priemere 2—2,5 %.

V kukuričnom výluhu vyrobenom na jeseň 1957 v závode Slovenských škrobární, n. p., doteraz sa identifikovali tieto aminokyseliny: cystín, kyselina asparágová, arginín, histidín, lyzín, kyselina glutamová, glycín, treonín, alanín, prolín, kyselina γ -aminomaslová, valín, metionín, fenylalanín, leucín a izoleucín.

Ďakujeme doc. MUDr. T. Turskému, kandidátovi chem. vied, prednostovi Biochemického ústavu Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, za poskytnutie štandardu kyseliny γ -aminomaslovej a za cenné metodické pripomienky.

К ВОПРОСУ АМИНОКИСЛОТ В ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ СРЕДАХ (I) ИДЕНТИФИЦИРОВАНИЕ γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В КУКУРУЗНОМ ЭКСТРАКТЕ

Я. ЗЕЛНКА, М. ГУДЕЦ

Опытная станция для исследования кукурузного экстракта Словацкого крахмального завода, г. п., Болераз

Выводы

В кукурузном экстракте была идентифицирована γ -аминомасляная кислота, которая хорошо отделяется электрофорезом на бумаге, одно- и двухмерной хроматографией в системах растворителей бутанол—уксусная кислота—вода и фенол—вода а также и электрохроматографией.

На основании предварительных анализов содержание γ -аминомасляной кислоты в кукурузном экстракте по пересчете на сухие вещества в среднем равняется 2—2,5 %.

В кукурузном экстракте, приготовленном осенью 1957 в Словацком крахмальном заводе, были пока что идентифицированы следующие аминокислоты: цистин, аспарагиновая кислота, аргинин, гистидин, лизин, глютаминовая кислота, глицин, треонин, аланин, пролин, γ -аминомасляная кислота, валин, метионин, фенилаланин, лейцин и изолейцин.

Поступило в редакцию 9. 12. 1957 г.

ZUR FRAGE DER AMINOSÄUREN IN FERMENTATIONSBÖDEN (I) IDENTIFIZIERUNG DER γ -AMINO BUTTERSÄURE IM MAISQUELL- WASSER

J. ZELINKA, M. HUDEC

Versuchsarbeitsstätte für Maisquellwasser der Slowakischen Stärkefabriken, National-
unternehmen in Boleráz

Zusammenfassung

In Maisquellwasser wurde γ -Aminobuttersäure identifiziert, welche sich durch Elektro-
phorese auf Papier gut abtrennt, ferner durch ein- und zweidimensionale Papierchromato-
graphie in den Lösungsmittelsystemen Butanol—Essigsäure—Wasser und Phenol—Was-
ser, sowie auch durch Elektrochromatographie.

Nach vorläufigen Analysen beträgt der Gehalt an γ -Aminobuttersäure im Maisquell-
wasser durchschnittlich 2—2,5 %, berechnet auf die Trockensubstanz des Maisquell-
wassers.

Im Maisquellwasser, welches im Herbst 1957 im Betriebe der Slowakischen Stärke-
fabriken, Nationalunternehmen hergestellt wurde, gelang bisher die Identifizierung
folgender Aminosäuren: Cystin, Asparaginsäure, Arginin, Histidin, Lysin, Glutamin-
säure, Glykokoll, Threonin, Alanin, Prolin, γ -Aminobuttersäure, Valin, Methionin,
Phenylalanin, Leucin und Isoleucin.

In die Redaktion eingelangt den 9. 12. 1957

LITERATÚRA

1. Arnstein H. R. V., Grant P. T., *Bact. Rev.* 20, 133 (1956). — 2. Awapara J.,
Landua A. J., Fuerst R., Seale B., *J. Biol. Chem.* 187, 35 (1950). — 3. Bode F.,
Biochem. Z. 326, 433 (1955). — 4. Cardinal E. V., Hedrick L. R., *J. Biol. Chem.* 172,
609 (1948). — 5. Demain A. L., *Arch. Biochem. Biophys.* 64, 74 (1956). — 6. Demain
A. L., *Arch. Biochem. Biophys.* 67, 844 (1957). — 7. Dent C. E., *Biochem. J.* 43, 169
(1948). — 8. Gale E. F., *Biochem. J.* 39, 46 (1945). — 9. Hais I. M., Macek K., *Papí-
rová chromatografie*, Praha 1954. — 10. Herold M., *Antibiotika*, Praha 1952.

11. Levitov M. M., *Materiály Všesvázovej konferencie o antibiotikách*, Moskva 1957. —
12. Mead T. H., Stack M. V., *Biochem. J.* 42, XVIII (1948). — 13. Mikeš O., *Chem. listy*
51, 138 (1957). — 14. Najjar V. A., Fisher J., *J. Biol. Chem.* 206, 215 (1954). — 15. Pyle
A. J. H., *J. Gen. Microbiol.* 11, 191 (1954). — 16. Reed L. J., *J. Biol. Chem.* 183, 451
(1950). — 17. Roberts E., Frankel S., *J. Biol. Chem.* 187, 55 (1950). — 18. Schneider
F., Reinfeld E., Müller H., *Biochem. Z.* 327, 189 (1955). — 19. Smolek K., *Průmysl
potravin* 3, 447 (1952). — 20. Turský T., osobné oznámenie.

21. Turský T., *Biológia* 12, 118 (1957). — 22. Turský T., Bielík E., *Bratislavské
lekár. listy* 36, 404 (1956). — 23. Wieland T. H., Fischer E., *Naturwissenschaften* 35,
29 (1948); citované z [17]. — 24. Wingo W. J., Awapara J., *J. Biol. Chem.* 187, 267
(1950). — 25. Zelinka J., *Kvasný průmysl* 2, ved. příloha, č. 3, 8 (1956).

Došlo do redakcie 9. 12. 1957