

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXI, 21

SECTIO D

1966

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Irena KRZECZKOWSKA, Stanisław SZCZEPANIAK

Badania nad składem aminokwasowym torfu.

I. Analiza jakościowa

Investigations on the Amino Acid Composition of Peat.

I. Qualitative Analysis

Złóża torfowe są bardzo cennym surowcem w wielu dziedzinach gospodarki narodowej. Między innymi torf znajduje zastosowanie do nawożenia gleby oraz do celów leczniczych pod postacią tzw. borowiny. Borowiny w zależności od pochodzenia różnią się między sobą dość znacznie, jeśli chodzi o oddziaływanie lecznicze (2). Najprawdopodobniej jest to uwarunkowane odmiennym składem jakościowym i ilościowym masy torfowej, będącej produktem humifikacji różnego materiału roślinnego.

Nasuwa się pytanie, czy w tym samym profilu torfu istnieją różnice w składzie aminokwasowym w zależności od głębokości złoża. Udział związków azotowych w humusie torfu jest dość znaczny. W częściowo oczyszczonych preparatach substancji humusowych znajdowano od 0,7 do 4,28% azotu (3). Pewna część azotu przypada na azot białkowy.

Wielu badaczy stwierdzało obecność aminokwasów w hydrolizatach różnych frakcji związków humusowych. Pavel, Kolousek i Smatlak (1) określili skład aminokwasowy w kwaśnym hydrolizacie kwasów huminowych. Aminokwasy identyfikowali chromatografią dwukierunkową na bibule Whatman nr 4 w układach fenol — woda i n-butanol — kwas octowy — woda. Znaleźiono: 1) kwas cysteinowy, 2) kwas asparaginowy, 3) kwas glutaminowy, 4) dwuhydroksyfenyloalaninę, 5) serynę, 6) glicynę, 7) treoninę, 8) α — alaninę, 9) lizynę, 10) argininę, 11) prolinę, 12) walinę-metioninę, 13) leucynę-izoleucynę, 14) sulfon metioniny i 15) ślady tyrozyny. Poza tym otrzymywali na chromatogramach dwie plamy, których nie byli w stanie zidentyfikować. Na żadnym chromatogramie nie stwierdzali obecności histydyny. Z powodu niezbyt dobrego rozdzielania nie mogli wnioskować o ilościowej zawartości poszczególnych aminokwasów.

Trojanowski i Łobarzewski (3) zidentyfikowali aminokwasy w dwu frakcjach kwasów hymatomelanowych, wyizolowanych z torfu. Frakcją pierwszą stanowił osad wytrącony z ekstraktu alkoholowego torfu za pomocą jonów wapnia. W skład frakcji drugiej wchodziły kwasy hymatomelanowe pozostałe w roztworze.

Rozdział aminokwasów w hydrolizatach tych frakcji przeprowadzano metodą chromatografii wstępującej, jednokierunkowej. Stosowano bibułę Whatman nr 1, oraz Schleicher—Schüll nr 2040 i układ rozpuszczalników n-propanol — woda (7:3). Zarówno we frakcji pierwszej, jak i drugiej zidentyfikowano siedem aminokwasów: cystynę, kwas glutaminowy, glicynę, cysteinę, tryptofan (ślady), beta-fenylalaninę i norleucynę. We frakcji drugiej otrzymywano ponadto plamę o najwyższym Rf, której nie zidentyfikowano.

Celem naszej pracy było określenie ewentualnych różnic w składzie aminokwasowym torfu w zależności od głębokości pokładu. Postanowiono przeprowadzić badania nad składem aminokwasowym torfu surowego, jak również alkoholowych ekstraktów torfu, zawierających kwasy hymatomelanowe.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań był torf z łąk Zemborzyckich koło Lublina o profilu wynoszącym 500 cm. Do doświadczeń wzięto 11 próbek położonych na następujących głębokościach: 1) 0—10 cm, 2) 40—50 cm, 3) 90—100 cm, 4) 140—150 cm, 5) 190—200 cm, 6) 240—250 cm, 7) 290—300 cm, 8) 340—350 cm, 9) 390—400 cm, 10) 440—450 cm i 11) 490—500 cm.

Materiał otrzymano od prof. dr Adama Paszewskiego, Kierownika Katedry Fizjologii Roślin, Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS w Lublinie, za co składamy bardzo serdeczne podziękowanie. Próbkę torfu wysuszone na powietrzu rozcierano w moździerz porcelanowym aż do uzyskania bardzo drobnego proszku. Sproszkowany torf przesiewano na sicie o wielkości oczek 0,3 mm celem oddzielenia zanieczyszczeń. Ekstrakcję kwasów hymatomelanowych przeprowadzano wg metody Trojanowskiego (3).

BADANIA WŁASNE

Sproszkowany i oczyszczony torf oraz ekstrakty alkoholowe poddawano hydrolizie w 6 n HCl w zatopionych ampulkach we wrzącej łaźni wodnej. Czas hydrolizy wynosił 24 godziny. Hydrolizaty odparowywano pod promiennikami podczerwieni aż do uzyskania roztworu obojętnego. Rozdział aminokwasów przeprowadzano za pomocą jednokierunkowej chromatografii bibułowej. Stosowano technikę wstępującą, bibułę What-

Tab. 1. Ilość substancji wyekstrahowanej etanolem z 2 g torfu
The quantity of the alcoholic extract from 2 g. of peat

Nr próbki	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Ilość mg ekstraktu	140	178	182	233	236	189	134	77	62	38	42

man nr 3 oraz układ rozpuszczalników n-butanol — kwas octowy — woda w stosunku objętościowym 4 : 1 : 1. Łącznie z próbkami badanymi zawsze наносzono na bibułę mieszaninę wzorcową, zawierającą 18 aminokwasów. W tym układzie rozpuszczalników, po dwukrotnym przepuszczeniu ich

Tab. 2. Skład aminokwasowy torfu surowego — Amino acid composition of raw peat

Lp.	Aminokwas	Próbki torfu pobrane na wysokości										
		cm										
		0—10	40—50	90—100	140—150	190—200	240—250	290—300	340—350	390—400	440—450	490—500
1	Cystyna	+—	—	+—	+—	—	+	+—	+	+	+	+
2	Lizyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Histydyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
5	Kwas asparaginowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Seryna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Glicyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Treonina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	Kwas glutaminowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	Alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Prolina	+—	—	—	—	—	+	+—	+	+	+	+
12	Tyrozyna	+	+—	+—	+—	+—	+	+	+	+	+	+
13	Tryptofan	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14	Metionina	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
15	Walina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	Fenylalanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	Izoleucyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	Leucyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: + aminokwas obecny, — aminokwas nieobecny, + — aminokwas wykrywany na niektórych chromatogramach

przez bibułę, rozdzielały się wystarczająco wszystkie aminokwasy z wyjątkiem seryny i glicyny, treoniny i kwasu glutaminowego oraz leucyny i izoleucyny. Celem zidentyfikowania tych aminokwasów rechromatografowano plamy odpowiadające tym parom metodą krążkową, stosując układy: n-butanol — aceton — woda (2 : 2 : 1) dla pierwszej pary, n-butanol — etanol — woda (4 : 1 : 1) dla drugiej i n-butanol — kwas octowy — woda (4 : 1 : 5) dla trzeciej. Chromatogramy wywoływano na zimno za pomocą 0,2% roztworu ninhydryny w acetonie.

Skład aminokwasowy hydrolizatów poszczególnych próbek torfu surowego przedstawiono w tab. 2. W tab. 1 zestawiono ilości gramów ekstraktów alkoholowych, otrzymanych z 2 g torfu położonego na różnych głębokościach. W tab. 3 natomiast przedstawiono skład aminokwasowy hydrolizatów ekstraktów alkoholowych poszczególnych próbek torfu.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

W całym profilu torfu surowego, a więc we wszystkich próbkach położonych na różnych głębokościach, wykryto następujące aminokwasy: lizynę, histydynę, kwas asparaginowy, serynę, glicynę, treoninę, kwas glutaminowy, alaninę, walinę, fenyloalaninę, izoleucynę, i leucynę. Jeśli chodzi o argininę, to jej obecność stwierdzano we wszystkich próbkach z wyjątkiem ostatniej, tj. położonej na największej głębokości. W żadnej próbce nie stwierdzono metioniny. Drugi aminokwas siarkowy — cystyna w wyższych warstwach występuje w ilościach śladowych lub wcale jej nie ma, natomiast w próbkach znajdujących się najgłębiej jej obecność została bezspornie stwierdzona. To samo dotyczy proliny, tyrozyny i tryptofanu.

W hydrolizatach surowego torfu stwierdzono również obecność plamy, umiejscowionej tuż za czołem rozpuszczalnika, a więc posiadającej najwyższy współczynnik R_f. Substancja ta z ninhydryną zabarwienia nie daje, natomiast izatyna barwi ją na kolor brunatny. W świetle UV wykazuje ona brązową fluorescencję. Najbardziej intensywne plamy, odpowiadające aminokwasom zawartym w hydrolizatach torfu surowego, stwierdzano w próbce XI, a więc położonej na największej głębokości.

W składzie aminokwasowym ekstraktów alkoholowych torfu dla większości aminokwasów sytuacja kształtuje się analogicznie do tej, jaka została stwierdzona w torfie surowym. Jedynie dla argininy, proliny i tryptofanu obraz uległ zmianie. Argininę wykryto tylko w wyższych warstwach torfu, natomiast w pięciu ostatnich próbkach, a więc położonych najgłębiej, aminokwasu tego nie stwierdzono. Prolina została zidentyfikowana tylko w dwu próbkach i to w ilościach śladowych. Tryptofanu nie wykryto na całej głębokości złoża torfowego.

Reasumując należy stwierdzić, że przeprowadzone badania wykazały nieco bogatszy skład aminokwasowy humusu torfowego niż podaje piśmiennictwo. Jak wynika z tabeli drugiej i trzeciej w naszej pracy zidentyfikowano 17 aminokwasów, podczas gdy Pavel i współprac. (1) wykryli w kwasach huminowych 15 aminokwasów, a Trojanowski i Łobarzewski (3) w kwasach hymatomelanowych stwierdzają obecność siedmiu tych związków.

Większych różnic w składzie aminokwasowym torfu w zależności od głębokości pokładu nie dało się zaobserwować. Spośród 17 aminokwasów trzynaście występuje w całym profilu torfu. Tylko cystyna, prolina, tyrozyna i tryptofan zostały wykryte jedynie w warstwach położonych najniżej. Nie zauważono również poważniejszych różnic między składem aminokwasowym torfu surowego i ekstraktów alkoholowych. Różnica dotyczy tylko argininy, proliny i tryptofanu. W torfie surowym, szczególnie w warstwach położonych niżej, prolinę i tryptofan stwierdzano bezspornie, natomiast w masie wyekstrahowanej etanolem prolinę wykryto tylko w dwu próbkach niżej położonych, a obecności tryptofanu nie stwierdzono w żadnej warstwie.

PIŚMIENNICTWO

1. Pavel L., Kolousek J., Smatlak V.: Sbornik Českoslov. Akad. Zemedel. Ved. 27, 207—212, 1954.
2. Szmytówna M.: Balneologia Polska, 11, 65—68, 1962.
3. Trojanowski J., Łobarzewski J.: Biuletyn Lubelskiego Towarzystwa Naukowego, 1, 169—178, 1961.

Pracę otrzymano 25 V 1966 r.

Исследования аминокислотного состава торфа. I. Качественный анализ

Резюме

При помощи хроматографии на бумаге определены аминокислотные составы гидролизатов сырого торфа и спиртовых вытяжек в зависимости от глубины слоя.

Установлен аналогичный состав сырого торфа и спиртовых вытяжек.

Все испытательные пробы, проводящиеся на различных глубинах, содержали следующие аминокислоты: лизин, гистидин, аспаргиновую кислоту, серин, глицин, треонин, глютаминовую кислоту, аланин, валин, фенилаланин, изолейцин и лейцин.

Цистин, пролин, тирозин и триптофан были обнаружены только в низлежащих слоях.

Табл. 1. Количество спиртовой вытяжки из 2 г торфа.

Табл. 2. Аминокислотный состав сырого торфа.

Табл. 3. Аминокислотный состав спиртовых вытяжек торфа.

Investigations on the Amino Acid Composition of Peat.

I. Qualitative Analysis

Summary

The amino acid composition of the hydrolizates of raw peat and its alcoholic extracts was determined in relation to the depth of the bed, by paper chromatography.

The amino acid composition of the raw peat and that of its alcoholic extracts were found to be similar.

In all test samples, placed at various levels, the following amino acids were found: lysine, histidine, aspartic acid, serine, glycine, threonine, glutamic acid, alanine and leucine.

Cystine, proline, tyrosine and tryptophan were detected only in the lowest layers.

