

**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ
Кафедра почвоведения**

Р.В. ОКУНЕВ

**СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В ПОЧВАХ И ХРО-
МАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ:
УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ**

Казань – 2023

УДК 631.4
ББК 40.3

*Принято на заседании учебно-методической комиссии
Института экологии и природопользования
Протокол № 3 от 11 мая 2023 года*

Рецензенты:

кандидат биологических наук, заведующий кафедрой почвоведения КФУ

Е.В. Смирнова

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института проблем экологии и недропользования АН РТ **С.С. Рязанов**

Окунев Р.В.

Свободные аминокислоты в почвах и хроматографические методы их определения: учебно-методическое пособие / Р.В. Окунев. – Казань: Казан. ун-т, 2023. – 34 с.

Учебно-методическое пособие содержит информацию о свободных аминокислотах почвы, рекомендации по способам их извлечения и определения методом ВЭЖХ. Предназначено для студентов, обучающихся по направлению «06.03.02 – Почвоведение»

© Окунев Р.В., 2023
© Казанский университет, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	5
1. Химия и биогеохимия аминокислот	5
2. Происхождение свободных аминокислот	9
3 Извлечение свободных аминокислот из почвы	13
4. Определение аминокислот методом ВЭЖХ	20
5. Пример использования ВЭЖХ свободных аминокислот почвы с предколоночной дериватизацией фенилизотиоцианатом	24
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	32

ВВЕДЕНИЕ

Аминокислоты являются важными компонентами питания не только для человека и животных, но и практически для любого живого организма. Для человека некоторые из данных соединений являются жизненно необходимыми, а потребность в них составляет от 1,4 до 4,8 г/кг [1]. По этой причине определению количественного и качественного состава аминокислот в продуктах питания уделяется много внимания. Растения, в свою очередь синтезируют аминокислоты в различных частях своего тела или получают их извне (из почвы или через листовое питание). Несмотря на то, что по современным исследованиям, пул свободных аминокислот является важным источником питания растений, информации об их роли в питании растений мало. Основная часть почвенных аминокислот находится в связанном состоянии в структуре органического вещества почвы. Их определение обычно проводится путем кислотного, щелочного или ферментативного гидролиза самой почвы или разных органических фракций. Так, более 20 % от общего количества азота в почвах принадлежит аминокислотам, 99,5% которых присутствует в связанном состоянии [2]. В составе гумусовых кислот идентифицируется 11–20 аминокислот. Основными источниками свободных аминокислот являются связанные аминокислоты органической части почвы, преимущественно входящие в состав белковых и гумусовых веществ. Они возникают в результате деполимеризации почвенного гумуса и почвенных белков внеклеточными ферментами микроорганизмов. Другими источниками свободных аминокислот являются клетки микробов и грибов, ткани животных, выделения микроорганизмов и растений [3]. Для их извлечения из почвы пользуются различными методами: от экстракции водой до применения вакуум-лизиметров, а определение часто проводится с помощью хроматографических методов усложненных трудной пробоподготовкой.

Данное учебно-методическое пособие предназначено для студентов, обучающихся по направлению «06.03.02 – Почвоведение», а также может быть полезным для студентов других направлений, которые в своей учебно-научной деятельности занимаются исследованием органического вещества почвы.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Химия и биогеохимия аминокислот

Первая аминокислота (аспарагин) была найдена в природе французскими химиками Вокеленом и Робике в 1806 году. Сам термин «аминокислоты» начали использовать только с 1898 года, к этому времени уже было открыто большинство аминокислот, участвующих в биосинтезе белка [4].

Глубокий интерес к геохимии и происхождению аминокислот начали проявлять после работ Эйбельсона в 1955 году. Эйбельсон показал, что древние аминокислоты сохранились в минеральной матрице раковин моллюсков миоценового периода, а так же во многих ископаемых костных тканях принадлежащих различным геологическим эпохам. В процессе исследования остатков ископаемых микроорганизмов установлено, что аминокислоты существуют на Земле более трех миллиардов лет [4]. Прогресс в сфере хроматографических технологий привел к быстрому развитию исследований в области геохимии аминокислот [5].

Аминокислоты являются структурной единицей белков и основой функционирования живых систем, поэтому изучение их происхождения вызывает интерес и по нынешний день. В своей работе Миллер [6] показал, что аминокислоты могут возникнуть при электрическом разряде в разряженной атмосфере содержащей метан, аммиак, водород и воду. Так же, первые аминокислоты могли синтезироваться при высоких температурах и давлениях в гидротермальных источниках глубоко под землей [7].

В природе существует более 700 различных аминокислот. Из них 20–22 аминокислоты – протеиногенные, т.е. участвуют в образовании белков. В живых организмах, биологических и геологических системах, кроме входящих в состав белков аминокислот, содержатся «свободные» аминокислоты. В организмах они нужны для выполнения специфически задач. Концентрации свободных аминокислот могут значительно различаться в клетках и тканях различных видов организмов. Например, в тканях млекопитающих содержание белков составляет 10–20 % от массы тела, а соотношение свободных аминокис-

лот к связанным (белковым) в теле животных примерно 1:30 г/г [8].

Для гигиены питания интересны все те же 20–22 аминокислоты. Незаменимыми для человека являются 10 аминокислот, которые не могут быть синтезированы в теле человека (метионин, триптофан, лизин, фенилаланин, лейцин, изолейцин, треонин, валин) или не синтезируются в достаточном количестве в организме у детей (аргинин, гистидин). Каждая из незаменимых аминокислот, кроме участия в образовании структурных белков, обладает индивидуальными свойствами и выполняет физиологически важные функции в организме. Их недостаток ведет к серьезным последствиям. Например, при нехватке гистидина снижается уровень гемоглобина и ухудшается условно-рефлекторная деятельность. При недостатке валина, лизина – нарушается кровообращение и снижается количество эритроцитов. Нехватка треонина вызывает задержку роста. Метионин участвует в реакциях метилирования в организме, играет важную роль в обмене веществ, работе надпочечников. Триптофан необходим для поддержания азотистого равновесия и необходим для образования никотиновой кислоты. Фенилаланин участвует в синтезе тироксина (аминокислоты белка щитовидной железы) и связан с тирозином, из которого образуется адреналин [9].

Аминокислоты – это карбоновые кислоты с общей формулой $RCH(NH_2)COOH$, содержащие одну или несколько аминогрупп. Их физико-химические свойства объясняются присутствием в молекуле одновременно карбоксильной и амино-группы. Существует несколько классификаций протеиногенных аминокислот. В классификации по радикалу [10] протеиногенные аминокислоты делят на неполярные (гидрофобные) и полярные (гидрофильные). К неполярным относят: аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, метионин, триптофан, фенилаланин. Остальные аминокислоты – полярные. Среди них выделяют: полярные нейтральные (серин, глицин, цистеин, треонин, аспарагин, глутамин, тирозин), полярные заряженные отрицательно (аспартат, глутамат), полярные заряженные положительно (гистидин, лизин, аргинин).

Тривиальные названия аминокислоты, получили, в основном, от материалов из которых они впервые были выделены, от предшественников при хими-

Продолжение таблицы 1

Название	Сокращение	Структурная формула при нейтральном pH
Аланин	Ala [A]	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Валин	Val [V]	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ / \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
Лейцин	Leu [L]	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ / \quad \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
Изолейцин	Ile [I]	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{C} \quad \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
Содержащие OH-группу в боковой цепи		
Серин	Ser [S]	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
Треонин	Thr [T]	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
Тирозин	Tyr [Y]	(см. ароматические)
Серосодержащие		
Цистеин	Cys [C]	$\begin{array}{c} \text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
Метеонин	Met [M]	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \quad \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
Содержащие кислую группу в боковой цепи		
Аспарагиновая кислота	Asp [D]	$\begin{array}{c} ^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
Глутаминовая кислота	Glu [E]	$\begin{array}{c} ^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \quad \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$

Так же существует множество других классификации аминокислот: по характеру катаболизма у животных, по путям биосинтеза, по функциональным группам, по классам аминоацил-tРНК-синтетаз.

В живых организмах металлы обычно выполняют свою функцию в виде хелатных комплексов. В качестве хелатообразователей, наряду с белками и карбоновыми кислотами, выступают аминокислоты [12]. Комплексы аминокислота-металл имеют высокую биологическую активность и играют важную роль в миграции и трансформации микроэлементов и тяжелых металлов в системе

почва – растение – животное, в связи с чем, для почвоведов и экологов представляет интерес классификация аминокислот по наличию дополнительных донорных групп [13]. Группа –COO аминокислот дает девять форм связывания молекулы аминокислоты с металлом. Наличие аминогрупп и дополнительных донорных групп в боковой цепи многократно увеличивает количество форм связывания. Так, по наличию дополнительных донорных групп можно выделить аминокислоты:

- 1) без донорной группы (Gly, Ala, Val, Leu, I-leu, Pro);
- 2) с кислотной донорной группой (Tyr, Asp, Glu);
- 3) с основной донорной группой (Lys, Arg, Orn, His).
- 4) содержащие серу или спиртовую группу (Ser, Thr, Cys, Met).

2. Происхождение свободных аминокислот

Аминокислоты являются неспецифическими органическими веществами почв, источником для которых служат растительные и животные остатки, а так же синтезированные живыми организмами вещества [14]. В почвах они находятся в трех формах: растворенные в почвенном растворе (свободные аминокислоты), обменные (адсорбированные на поверхности почвенных частиц) и связанные [3]. Основными источниками свободных и обменных аминокислот являются связанные аминокислоты органической части почвы (Рисунок 1), преимущественно входящие в состав гумусовых веществ. Сами гуминовые вещества, в отличие от биологических молекул, (таких как белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды) которые построены однотипно, выражаются гетерогенностью и большим набором различных фрагментов [14].



Рисунок 1. Номенклатурная схема органического вещества почвы по Орлову [14]

Исследование гидролизатов гумусовых кислот показало, что в их составе имеется тот же спектр протеиногенных аминокислот, что у растений и микроорганизмов. Всего идентифицировано 22 аминокислоты [15]. В гидролизатах их содержание достигает 5-12% от массы препарата. Часть аминокислот находится в составе негидролизуемых фрагментов гумусовых кислот (ГК). Содержание аминокислот в ГК различных почв варьирует от 450 до 800 мкмоль/г препарата. В фульвокислотах их содержание находится в диапазоне от 430 до 600 мкмоль/г. В составе ГК преобладают основные (13–18% от суммы аминокислот) и циклические (8–11% от суммы аминокислот) аминокислоты.

Органические формы азота доминируют в почвах, и примерно 40% от валового азота представлена пептидами и белками. Основная часть свободных аминокислот возникает в результате деполимерализации этих белков внеклеточными ферментами. В почвенных растворах содержание азота свободных аминокислот составляет около 5% от азота растворенного органического веще-

ства (РОВ). Остальная часть азота РОВ представлена пептидами и белками [3]. Другими источниками, свободных аминокислот являются клетки микробов и грибов, ткани животных, выделения микроорганизмов и растений (Рисунок 2).

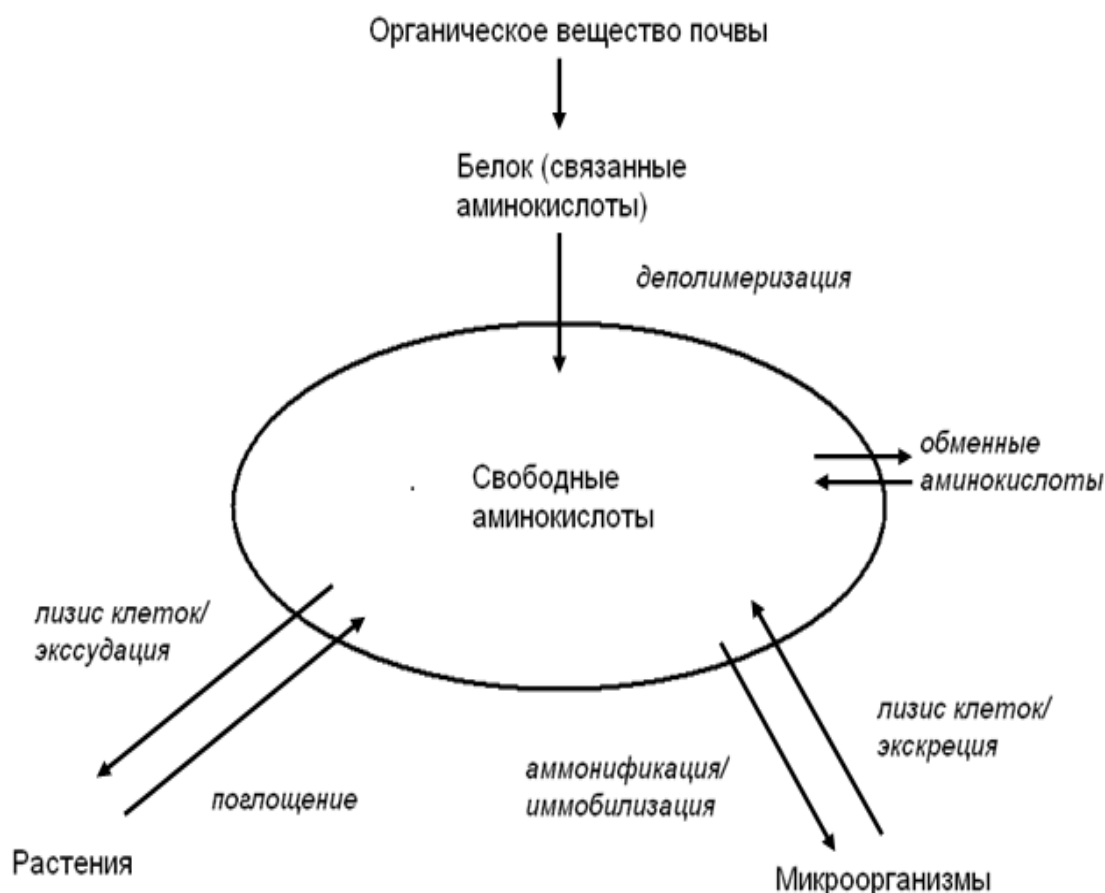


Рисунок 2. Источники свободных аминокислот в почвах [3]

Концентрация свободных аминокислот в почвах находится в диапазоне от 0,1 мкмоль – в свободной от корней почвах, и до 5 ммоль – возле разорвавшихся клеток растений и микроорганизмов. К примеру, в работе [3] установлено, что в пастбищных почвах Швеции, содержание свободных аминокислот варьировало от 0,1 до 12,7 мкмоль. В большинстве почв среди свободных аминокислот доминируют аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и глицин, однако встречаются почвы с аминокислотным профилем представленным главным образом серином, аланином, аргинином, глутамином, гистидином, лейцином. Их содержание может варьировать в течение всего вегетационного периода в широких пределах.

В свободном состоянии аминокислоты находятся в почвенном растворе. Сам почвенный раствор – это жидкая фаза почвы, основными источниками воды для которой могут являться атмосферные осадки, грунтовые воды, парообразная влага, росы и гуттация. Почвенные растворы являются отражением процессов, протекающих в почве и любые изменения биологического, физико-химического характера отражаются на его составе [16]. Так, например, изменение концентрации аминокислот в почвенном растворе может происходить в результате минерализации (аммонификации), микробиологической иммобилизации (включение аминокислот в биомассу), поглощения растениями, адсорбции на заряженных поверхностях, а так же в результате выщелачивания. Аминокислоты могут быть так же дезаменированы внеклеточными ферментами микроорганизмов [17].

Физическое состояние аминокислот в почвенном растворе зависит от их заряда при данных рН почвы. При рН близких к нейтральному значению аминокислоты находятся в форме цвиттерионов, с увеличением кислотности приобретают свойства катионов, а при уменьшении – анионов [17]. Аминокислоты могут адсорбироваться несколькими способами: 1) аминогруппой; 2) карбоксильной группой; 3) за счет гидрофобных взаимодействий алкильных групп [2]. Кроме того, возможны слабые электростатические взаимодействия и включение в межслойные пространства минералов. Аминокислоты адсорбируются на минералах в соответствии с механизмом катионного обмена, вытесняя из глины катионы. Количество адсорбированных аминокислот зависит от типа обменного катиона и типа аминокислоты. Основные аминокислоты, в отличие от кислот, за счет положительного заряда, активнее вступают в реакции с глинами.

3.Извлечение свободных аминокислот из почвы

Способов определения содержания свободных аминокислот несколько. Первый из них связан с получением почвенного раствора и изучением концентрации растворенных в нем аминокислот. Второй – с извлечением аминокислот растворителями (экстракция, элюирование почвенных колонок). Почвенные растворы могут быть получены как в поле (извлечением из нетронутой почвы), так и в лабораторных условиях, тогда как получение вытяжек из почвы – лабораторный способ. Методы экстракции аминокислот различными вытяжками менее трудоемки и обеспечивают полное взаимодействие образца с экстрагентом. Однако экстрагирующий раствор может вызывать сильные химические изменения, из-за чего полученные концентрации вещества могут быть неадекватными [3].

Схема способов экстракции почвенного раствора показана на Рисунке 3. Все методы выделения почвенного раствора можно разделить на две большие группы: лабораторные и полевые. Самым распространенным и вносящим наименьшие изменения в состав почвенного раствора способом его извлечения считают метод вакуум-фильтрации. Вакуум-фильтрация проводится с использованием специальных микропористых емкостей (фильтров). Капиллярное давление в пористой емкости (чашки) должно быть ниже, чем в почве, тогда вода из почвы будет проникать в эти чашки. Для создания отрицательного давления можно использовать вакуумный насос, или простой шприц, если емкость небольшого размера. По составу, чашки бывают из стекла, тефлона, керамики или алюминия. Их размеры варьируют от 1 мм и до 3 см в диаметре. Самые тонкие пробоотборники предназначены для более точного отбора почвенного раствора, например в зоне корневых экссудатов.

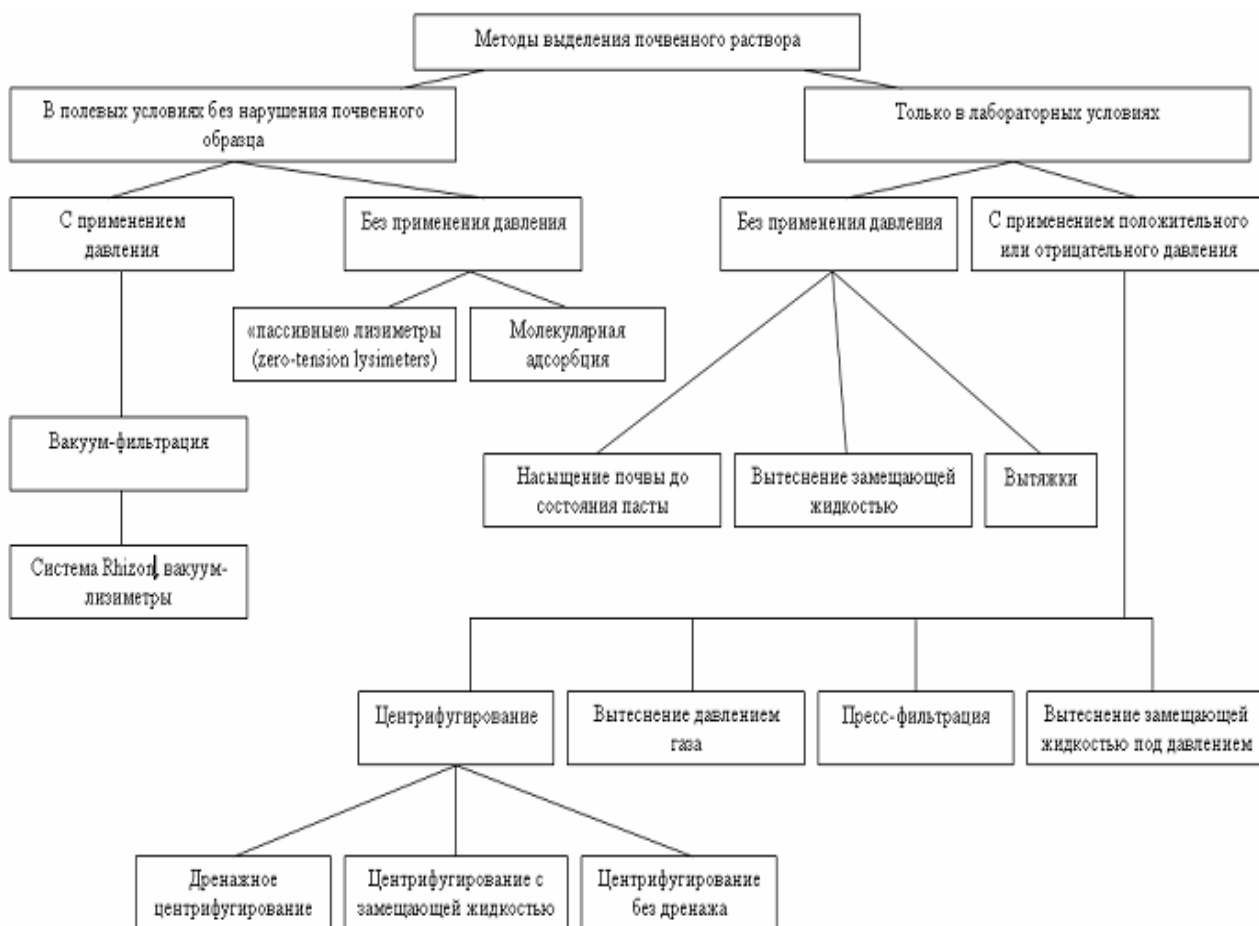


Рисунок 3. Методы выделения почвенного раствора

Примером таких тонких пробоотборников может являться система Rhizon, (Рисунок 4) [18]. Такой пробоотборник имеет слой пористого ПВХ изнутри и гидрофобного полимера снаружи. Диаметр пор – 0,2 мкм. Rhizon при применении к нему отрицательного давления способен в течение часа накопить до 7 мл почвенного раствора. Rhizon применяли при изучении влияния хвойных деревьев и эндомикоризных грибов на концентрацию органических кислот в почвенном растворе.

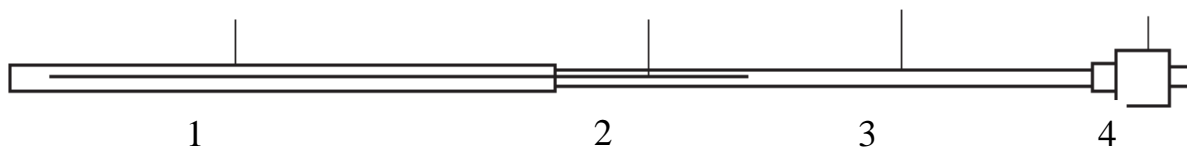


Рисунок 4. Система Rhizon (Ризон): 1 – гидрофильный полимерный материал; 2 – фильтр; 3 – капилляр; 4 – коннектор [18].

В работе [19] показана похожий на Ризон система отбора почвенного раствора в зоне ризосферы (Рисунок 5).

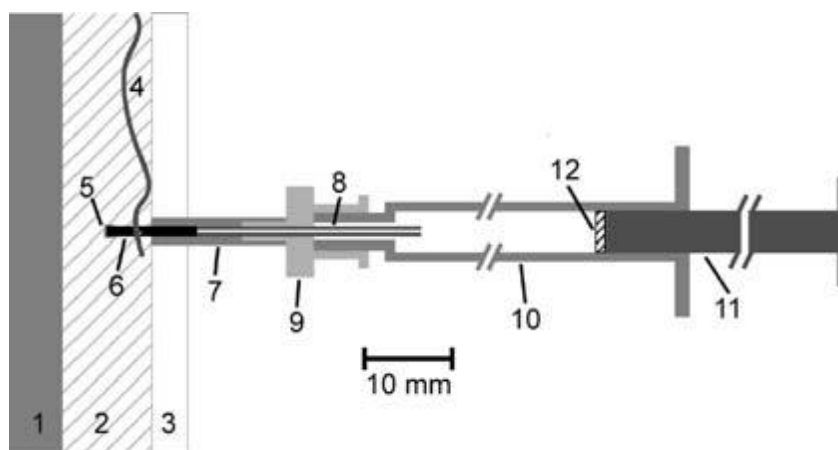


Рисунок 5. Пробоотборник для исследования корневых экссудатов.

1 – стенка емкости с почвой; 2 – почва; 3 – прозрачный материал; 4 - корень; 5 – шапка; 6 – керамический капилляр; 7 – внешняя трубка; 8 – внутренняя трубка; 9 – коннектор; 10 – шприц; 11 – поршень; 12 – формальдегид [19]

В другой работе [20] было предложено вакуумное устройство для отбора почвенной влаги. Была построена герметичная коробка из поливинилхлорида, внутри которого создавался вакуум. Через специальные пористые трубки раствор попадал в приемник (Рисунок 6).

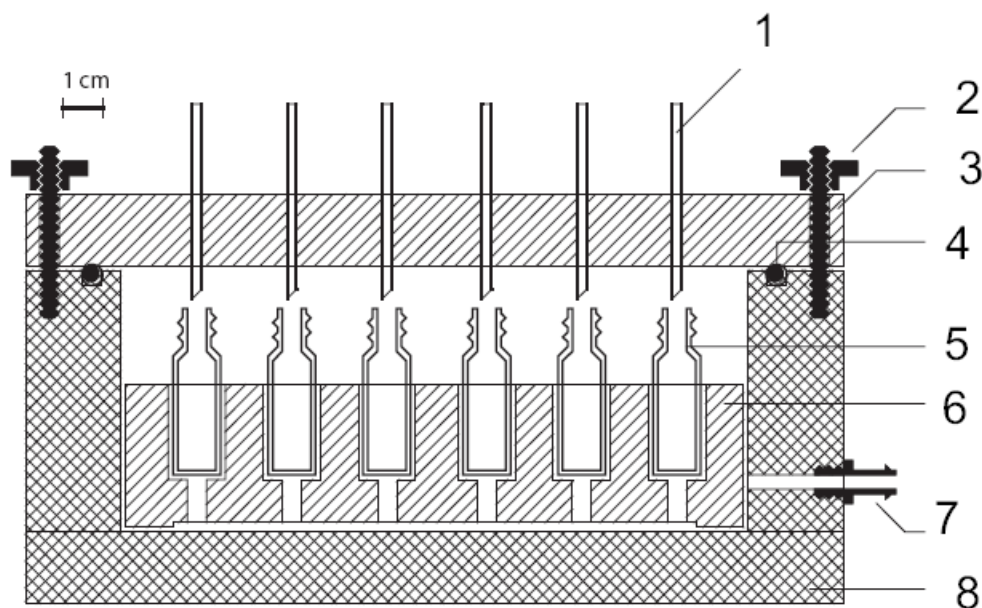


Рисунок 6. 1 – капилляр; 2 – винт; 3 – крышка из плексигласа; 4 – резиновый валик; 5 – посуда для сбора раствора; 6 – подставка из плексигласа; 7 - коннектор для насоса; 8 – ящик из ПВХ [20].

В лабораторных условиях часто пользуются методом дренажного центрифугирования. Он основан на дренаже воды порового пространства через пористые пластины в водосборник во время центрифугирования навесок почвы. Так, Джонс с соавторами [2] изучали свободные аминокислоты в почвенных растворах, полученных этим методом. Свободные аминокислоты определялись методом ВЭЖХ.

Фишер с соавторами [21] непрерывным потоком H_2O и CO_2 выщелачивали из почвенной колонки аминокислоты и сахара в течение 13 часов. Общее количество вымытых из колонки аминокислот составило 8,2 мкмоль/л, среди которых доминировал: аланин 14,4 % , глицин 13,4 % , глутаминовая кислота 9,9 % , серин 9,4% и лейцин 9,3 % . Автор отмечает, что концентрация свободных аминокислот, полученная выщелачиванием ниже, чем при использовании спиртовых вытяжек (10% этанола), в которых содержание аминокислот варьировало от 6,3 до 22 мг/кг.

Для извлечения свободных аминокислот из типичного чернозема

Татарии, Гидо [22] использовал почвенные колонки. Колонки элюировали 20 %-ным раствором этанола при скорости прокачки 25 мл/час. В полученном элюате определял содержание аминокислот на автоматическом анализаторе, который работает по принципу ионообменной хроматографии.

Для извлечения свободных аминокислот из почвы используются различные экстрагенты: воду, этанол, солевые растворы и буферы. Эти методы в наибольшей степени удобны для стандартизации получаемых данных [23]. Содержание аминокислот различается в зависимости от использованных экстрагентов. Тида с соавторами [24] исследовали почвы садовых участков на содержание свободных аминокислот. Экстракцию проводили различными солевыми растворами (1/15М фосфатный буфер, 10 ммоль CaCl_2 , 1М KCl , 0,5М K_2SO_4), водой и методом дренажного центрифугирования. Суммарное содержание аминокислот (ССА) полученное данными методами, увеличивалось в ряду: дренажное центрифугирование < CaCl_2 < H_2O < KCl < K_2SO_4 < фосфатный буфер. По словам авторов, при экстракции солевыми растворами получаем не только растворенные в почвенном растворе аминокислоты, но и часть аминокислот, десорбированных с поверхности почвенных частиц, поэтому ССА в таких вытяжках больше, чем в водной вытяжке или почвенном растворе, извлеченном непосредственно из почвы. Считается, что раствор, содержащий K_2SO_4 , нарушит целостность клеточных мембран, и экстрагирует, не только свободные аминокислоты почвы, но и аминокислоты цитоплазмы почвенных микроорганизмов.

Варман и Бишоп [25] сравнивали содержания аминокислот в экстрактах пахотного слоя подзолистой почвы (Квебек, Канада). Перед тем, как извлечь аминокислоты водой, почву обрабатывали 0,5М смесью HF и HCl . Авторы пришли к выводу, что данная предварительная обработка увеличивает экстракцию органического вещества почвы, но при этом некоторые аминокислоты разрушаются.

Хиаочуан с соавторами [26] для извлечения аминокислот, нитратов и аммиака использовали 0,5М K_2SO_4 и H_2O . Из-за лизиса микробных клеток, в высушенных почвах содержание изучаемых компонентов значительно выше, чем

в свежо отобранных образцах. Раствор 0,5М K_2SO_4 экстрагирует значительно больше аммония и аминокислот, чем вода, так как извлекает молекулы, адсорбированные на поверхности почвенных частиц.

Хиан-ю с соавторами [27] использовали воду и солевые растворы различных концентраций (0,01М K_2SO_4 , 0,5М K_2SO_4 , 0,01М Na_2SO_4 , 0,5М Na_2SO_4 , 0,02М $NaCl$, 1М $NaCl$, 0,02М KCl , 1М KCl) для извлечения аминокислот из почв, отобранных на чайной плантации (почва А), овощном поле (почва Б) и рисовом поле (почва В). Общее количество экстрагированных аминокислот варьировало от 0,81–6,17 мг/кг почвы. В общей сложности, чем концентрированнее экстрагент, тем больше аминокислот извлекается из почвы. На рисунке 7 показано, сколько аминокислот извлекается из почвы, если проводить экстракцию 0,5М K_2SO_4 последовательно 5 раз. Количество аминокислот уменьшалось после каждой последующей экстракции. Суммарное содержание аминокислот различалось для почв с различных территорий (А, Б, В).

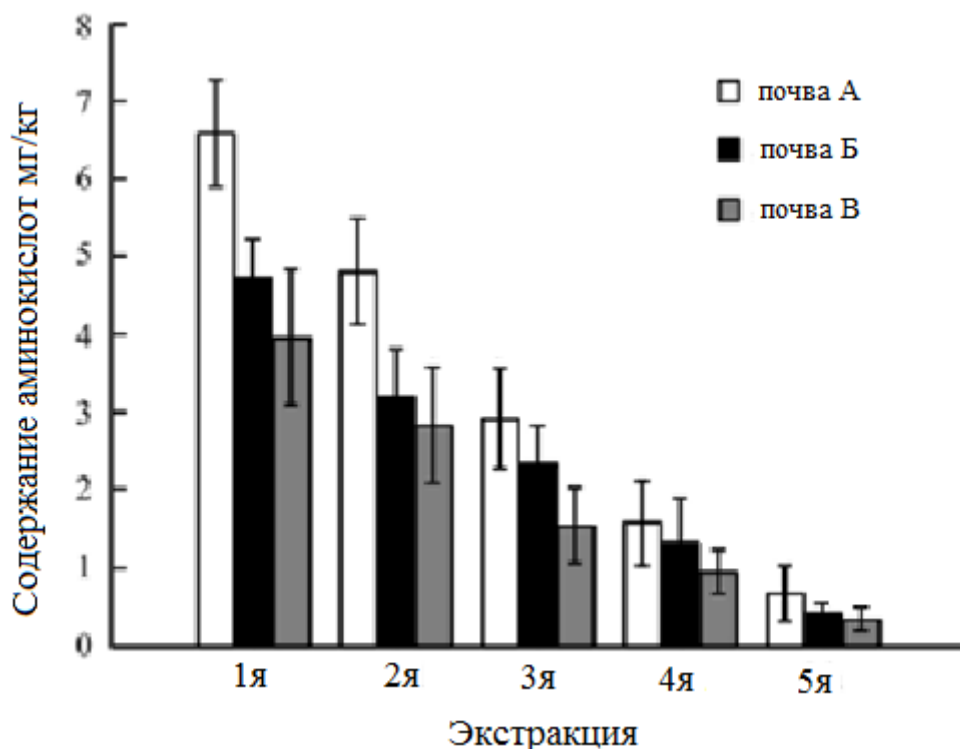


Рисунок 7. Аминокислоты, извлеченные из почв трех разных полей 0,5М K_2SO_4 (последовательная экстракция проводилась 5 раз) [27]

Большое влияние на получаемые результаты оказывает время экстракции. В разных работах использовали различное время экстракции: от 15 минут до 36 часов [25–28]. Роузк и Джонс [28] изучали содержание аминокислот и глюкозы при экстракции дистиллированной водой и 0,5М K_2SO_4 . Экстрагирование проводилось при 20°C и 4°C в присутствии ингибитора микробиологической деятельности ($HgCl_2$ и Na-азид) или без него. Было показано, что увеличение времени экстракции приводит к увеличению интенсивности минерализации аминокислот и глюкозы (Рисунок 8).

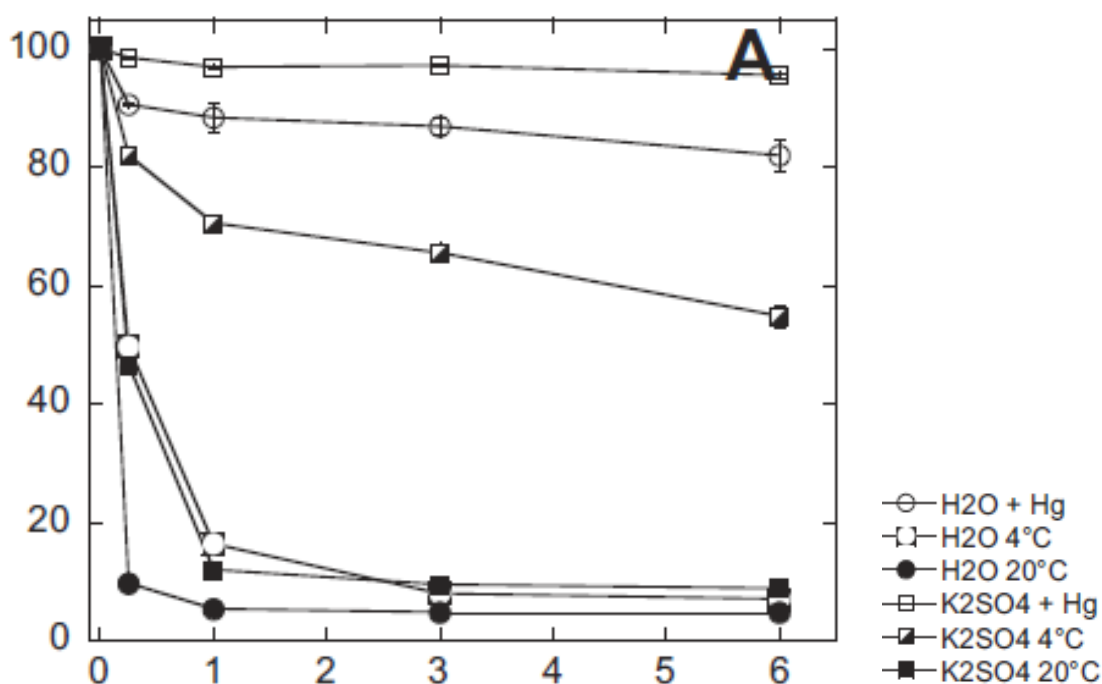


Рисунок 8. Зависимость минерализации аминокислот от времени экстракции H_2O и K_2SO_4 при температурах 20°C и 4°C в присутствии Hg и без него [28]

Более низкая температура (4°C) привела к снижению интенсивности минерализации глюкозы и аминокислот. Наличие микробных ингибиторов эффективно приостановило минерализацию.

Таким образом, на содержание аминокислот в вытяжках влияет химический состав экстрагента, температура и время экстракции. Особое внимание необходимо уделять микробиологической деятельности почвы, которая сильно влияет на концентрацию экстрагируемых аминокислот.

4. Определение аминокислот методом ВЭЖХ

Содержание аминокислот в объектах окружающей среды, обычно, проводят с помощью тонкослойной, ионообменной, газовой, жидкостной хроматографией или спектрофотометрическими методами. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) является мощным инструментом для определения многих органических компонентов почвы (органических кислот, сахаров, фенолов и других соединений), в том числе и аминокислот [29].

Жидкостная хроматография (ЖХ) – это метод разделения смесей веществ в потоке жидкости на поверхности твердого вещества. Как метод ЖХ была открыта в 1903 г. русским ученым – М.С.Цветом, который на колонках набитых мелом провел разделение растительных пигментов [30]. Современная высокоэффективная жидкостная хроматография и ультра-эффективная жидкостная хроматография являются одними из самых востребованных методов разделения и определения органических соединений.

Подвижной фазой в ВЭЖХ является жидкость, а неподвижной фазой является твердый тонкопористый и тонко измельченный химически модифицированный наполнитель [30]. В зависимости от природы подвижной и неподвижной фазы, ВЭЖХ разделяют на обратно-фазовую (или обращенно-фазовую) и нормально-фазовую хроматографию. В нормально-фазовой ВЭЖХ твердый наполнитель колонки – полярный (например, силикагель), а разделение изучаемых смесей проводится с помощью неполярных растворителей, таких как гексан, хлороформ и спирты. У полярных твердых фаз на поверхности существует некомпенсированный заряд или постоянный дипольный момент. Чем больше полярность – тем больше удерживание для полярных компонентов. В обратно-фазной хроматографии твердая фаза имеет неполярную C8 или C18 компоненту, а в качестве подвижной фазы используются более полярные растворители (вода с ацетонитриллом, метанолом, и др.). Чем больше неполярность – тем больше удерживание веществ [30]. Принцип действия ВЭЖХ заключается в следующем. Раствор, содержащий смесь компонентов вводится в хроматограф. С помощью насоса смесь прокачивается элюентом через хроматографическую

колонку, в которой происходит разделение анализируемой смеси на отдельные компоненты. Далее, компоненты проходят через детектор (ультрафиолетовый, флуоресцентный, хромато – масс – спектрометрический и др.). Показания детектора отображаются в виде пиков на хроматограмме.

Основная проблема при определении аминокислот методом ВЭЖХ - отсутствие в большинстве молекул хромофорных групп, необходимых для эффективной их идентификации флуоресцентными или ультрафиолетовыми детекторами хроматографа. Так, при использовании, к примеру, ультрафиолетового детектора, аминокислоты предварительно подвергают химической модификации для получения соединений чувствительных к данному типу детекторов. Для этой цели широко используются такие модификаторы, как 5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлорид, о-фталевый альдегид (ОФА), 9-флуоренилметилхороформат (ФМХФ), фенилизотиоцианат (ФИТЦ) и др.

Предколоночная дериватизация (диметиламино)азобензен-сульфонил хлоридом (Dabs-Cl). АМК полученные с дериватизацией Dabs-Cl показывают максимум адсорбции при длине волны 436 нм и являются очень стабильными [31]. Предколоночная дериватизация Dabs-Cl является одной из наиболее часто употребляемых для ультрафиолетового детектора (Рисунок 9.).

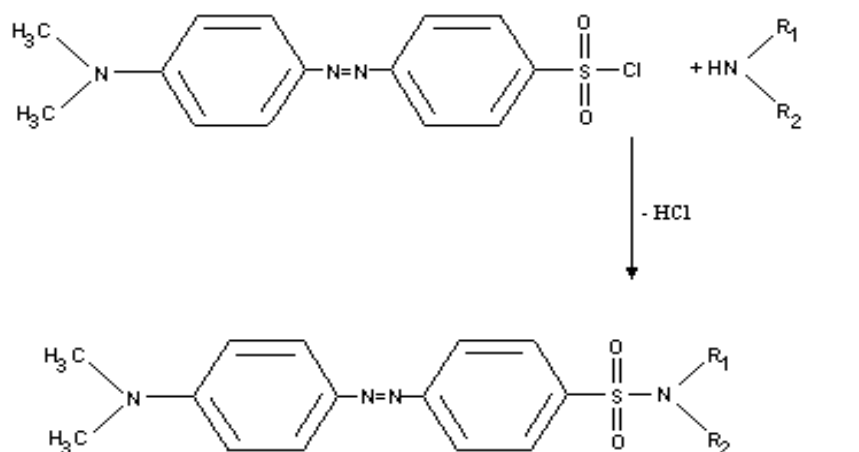


Рисунок 9. Реакция дериватизации с использованием Dabs-Cl

Он образует стабильные соединения с аминокислотами, которые можно хранить при комнатной температуре. Dabs-Cl растворяют в ацетоне или ацетонитриле (4 наномоль/мкл). Пример разделения Dabs-аминокислот можно увидеть на рисунке 10.

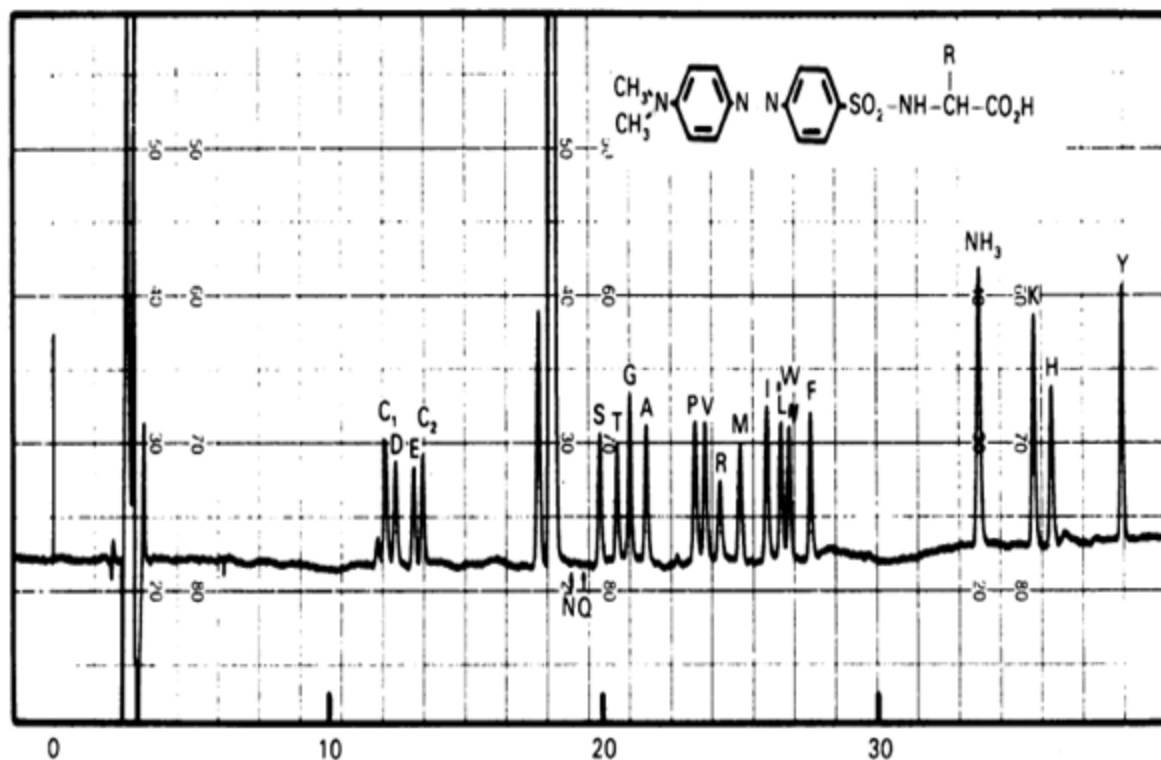


Рисунок 10. Хроматограмма Dabs-аминокислот [31]

Предколоночная дериватизация ФМХФ, реагируя с аминокислотами, формирует флуоресцентные продукты. Кроме гистидина стабильны все продукты реакции. ФМХФ-аминокислоты обычно разделяются на колонках C_{18} . Разделение проводят градиентным элюированием смеси ацетонитрил:уксусная кислота (50:50). Двадцать аминокислот хроматографируются в течение 20 минут.

Предколоночная дериватизация орто-фталевым альдегидом (ОФА) используется очень часто, так как дает высокочувствительные соединения, определяемые флуоресцентным детектором. Юю с соавторами [32] определяли аминокислоты дериватизированные ОФА в почвенных растворах. Для разделения

использовали колонку C_{18} длиной 25 см и размером частиц 5 мкм.

Фенилизотиоцианат (ФИТЦ), наряду с ОФА и ФМХФ, широко используется для определения свободных аминокислот в биологических жидкостях. Он, реагируя с первичными и вторичными аминокислотами, дает фенилтиокарбамильные (ФТК) производные аминокислот, определяемые УФ-детектором на длине волны 254 нм.

В работе Сандерс с соавторами [32] сравнивались два дериватизатора: ФИТЦ и ОФА. Эти реагенты использовали для модификации свободных аминокислот в органеллах клеток растений. Результаты показали, что разделение аминокислот методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией ФИТЦ превосходит дериватизацию ОФА по ряду параметров, таких как: стабильность, длительность хроматографирования и четкость разделения пиков на хроматограмме (Таблица 2).

Таблица 2

Сравнительный анализ предколоночной дериватизации ОФА и ФИТЦ [32]

Параметры	ОФА	ФИТЦ
Длительность хроматографирования (мин)	80	35
Детектор	флуоресцентный	ультрафиолетовый
Лимит определения (пикамоль)	5-20	10-50
Возможность определить вторичные амины (и пролин)	нет	да
Стабильность деривативов	стабильны недолгое время	стабильны
Разделение на хроматограмме	хорошее	отличное
Приготовление образца	простое, быстрое	сложное, долгое
Количество определяемых аминокислот	18	23

5. Пример использования ВЭЖХ свободных аминокислот почвы с предколоночной дериватизацией фенилизотиоцианатом

В работе были исследованы свободные аминокислоты в пахотных почвах в зависимости от содержания фосфорных удобрений. Удобрения вносились в воздушно-сухую серую лесную почву в дозах 0; 1,0; 2,1; 4,2; 10,6; 53,1; 212,5; 1062,5 г/кг. Данные дозы выбраны исходя из рекомендаций по применению удобрений производителя. Использованная фосфоритная мука является продуктами переработки природного фосфорсодержащего сырья Егорьевского месторождения (Костромской химзавод, Россия) с содержанием P_2O_5 – 19 % . Приобретенный суперфосфат содержит P_2O_5 не менее 26 % (Русагрохим, Россия). Далее почва инкубировалась при оптимальной для жизнедеятельности микроорганизмов влажности (60% от полной влагоемкости почвы). После инкубации свободные аминокислоты извлекали водой. Для этого в течение 1 часа почва перемешивалась на встряхивателе при 200 об/мин. Затем суспензия суспензия центрифугировалась при 4000 об/мин, надосадочная жидкость фильтровалась через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Chromafil Xtra PA-20/25, Германия).

Свободные аминокислоты извлеченные из почв определялись методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией аминокислот фенилизотиоцианатом. Фильтраты 400 мкл полученные после извлечения аминокислот из почвы высушивались при 65°C под вакуумом. Сухой остаток растворялся в 150 мкл смеси метанол – вода – триэтиламин (2:2:1) (v/v), раствор выпаривали под вакуумом. Дериватизация проводилась добавлением 100 мкл реагента метанол – вода – триэтиламин – фенилизотиоцианат в объемных соотношениях 7,5:1:1:1 (по объему). Пробирки тщательно встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 20 мин. Затем, для удаления избытка дериватирующего реагента смесь выдерживали под вакуумом при 50°C. Перед вводом в ВЭЖХ сухой остаток растворяли в 300 мкл 5 ммоль Na_2HPO_4 , pH 7,4 и пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

Определение свободных аминокислот проводили на высокоэффективном

жидкостном хроматографе Flexar (Perkin Elmer, США). Использовали хроматографическую колонку Brownlee Analytical C18 (Perkin Elmer, США) размером 150×4,6 мм упакованную частицами размером 3мкм. Элюирование колонки проводили при комнатной температуре в линейном градиенте при использовании системы состоящей из водного буфера, приготовленного добавлением 0,5 мл/л триэтиламина к 0,14 М раствору ацетата натрия доведенного уксусной кислотой до pH 6,0 (Элюент А) и смеси ацетонитрил – вода в объемном соотношении 60:40 (Элюент В). Скорость потока подвижной фазы – 0,9 мл в мин. Идентификация производных аминокислот проводилось при помощи УФ-детектора на длине волны 254 нм. Для калибровки хроматографа использовали смесь из стандартных образцов L-аминокислот («Sigma Aldrich», Бельгия): аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, валин, пролин, гистидин, глутамин, глутаминовая кислота, изолейцин, лейцин, лизин, серин, тирозин, треонин, фенилаланин. Микробную биомассу почвы определяли путем пересчета скорости субстрат-индуцированного дыхания (СИД). Величину СИД определяли методом газовой хроматографии на хроматографе Clarus-580, США.

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программы Statistica 9,1 (StatSoft, Tulsa, USA). Данные в тексте и на диаграммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($n = 3$; $p < 0.05$). Для установления взаимосвязей между значениями переменных использовали корреляционный анализ по Спирмену. Значимость различий между вариантами определяли с помощью теста ANOVA при $p < 0,05$. Были получены следующие результаты.

Длительное выдерживание почвы в условиях близких к оптимальных для жизнедеятельности микроорганизмов, неизбежно влечет за собой изменения активности почвенной микрофлоры, и как следствие процессов трансформации органического азоте. В результате изменения затрагивают и пул свободных аминокислот. Так перед проведением инкубационного опыта в серой лесной почве обнаруживалось 15 свободных аминокислот, содержания которых варьировало от 0,28 мкг/кг до 6,12 мкг/кг. Доминирующими являлись полярные аминокислоты – серин и глицин – содержание которых составляет 6,12 и 3,9 мкг/кг

(24,8 % и 16,0% от суммарного содержания свободных аминокислот соответственно). Концентрации отрицательно заряженных аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой кислоты) составили 1,56 и 0,98 мкг/кг соответственно. Количество положительно заряженных аминокислот (лизина, гистидина, аргинина) варьировало от 0,74 до 1,59 мкг/кг. Содержание остальных аминокислот (треонин, аланин, пролин, тирозин, валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин) составило от 0,28 до 3,94 мкг/кг. Суммарная концентрация свободных аминокислот составляла 24,67 мкг/кг. Через 30 дней инкубации суммарное содержание свободных аминокислот снизилось до 17,3 мкг/кг, в первую очередь за счет снижения ниже предела обнаружения концентрации аспарагиновой кислоты и лизина. Фенилаланин на хроматограммах полученных после инкубации был поглощен неизвестным пиком, поэтому его концентрация в дальнейшем так же не учитывалась.

Изменения в содержании свободных аминокислот в серой лесной почве обогащенной различными дозами фосфоритной муки так же оценивали через 30 дней инкубации. Как было указано выше, в контрольном варианте опыта (без добавки фосфоритной муки) суммарное содержание свободных аминокислот составило 17,3 мкг/кг (Рисунок 11). Доминирующими аминокислотами являлись Gly (29,2 % от суммарного содержания свободных аминокислот), Ser (24,0 %) и Val (23,2 %). Гораздо меньшее содержание обнаружено для тирозина, треонина, аланина, гистидина, лейцина и изолейцина (от 1,2 до 4,9 %). Добавление фосфоритной муки на уровне минимальной дозы рекомендуемой для внесения в почвы (1,0 г/кг) снизило суммарное содержание аминокислот с $17,33 \pm 2,53$ мкг/кг до $14,44 \pm 2,11$ мкг/кг. При дальнейшем увеличении доз удобрения в рамках рекомендуемых норм (до 4,2 г/кг) наблюдалось снижение до $7,81 \pm 1,15$ мкг/кг.

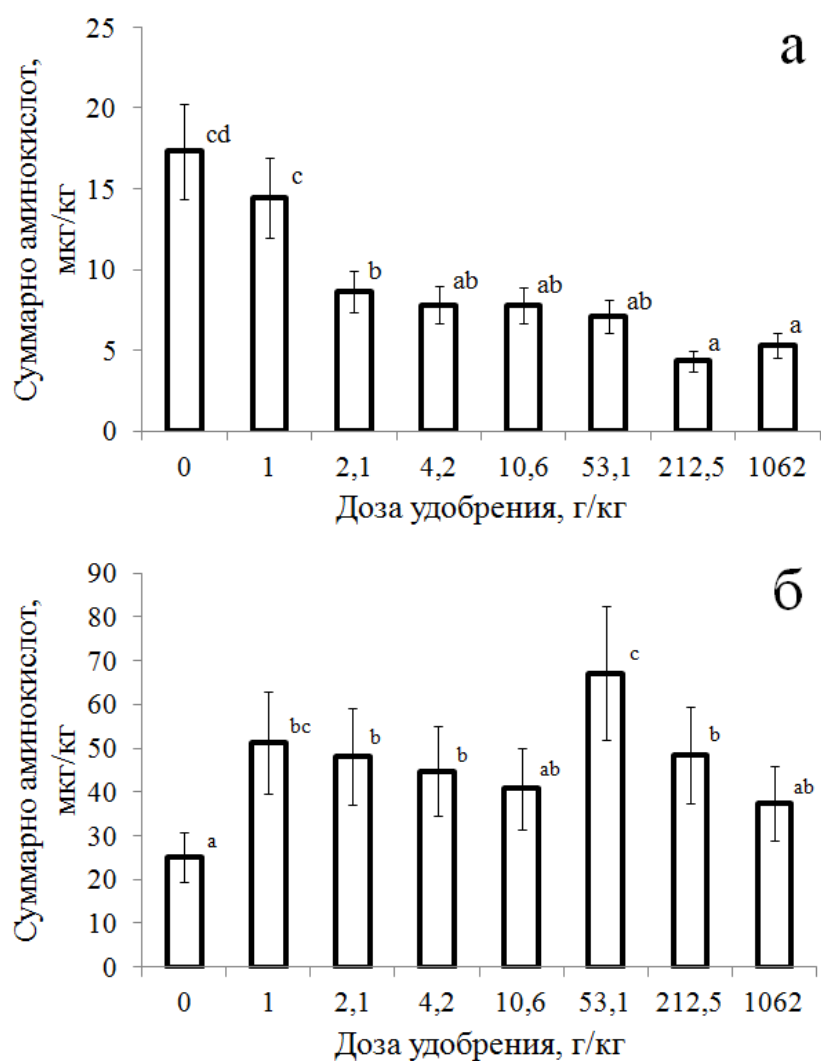


Рисунок 11. Влияние фосфоритной муки (а) и суперфосфата (б) на суммарное количество свободных аминокислот (значения с разными латинскими буквами значительно различаются при $p < 0,05$)

Тенденция к снижению отмечалась практически у всех выявленных свободных аминокислот (кроме изолейцина и лейцина). Начиная с дозы 2,1 мг/кг, содержания аланина и гистидина оказались ниже предела обнаружения. При дозах удобрения от 2,1 до 53,1 г/кг как суммарная концентрация свободных аминокислот не изменялась значительно, однако начиная с дозы 53,1 г/кг, содержание треонина оказалось ниже предела обнаружения. При максимально высоких дозах фосфоритной муки концентрации свободных аминокислот достигают своего минимума. В процентном соотношении с повышением доз удоб-

рения значительно уменьшается относительное содержание глицина, но увеличивается содержание тирозина и валина.

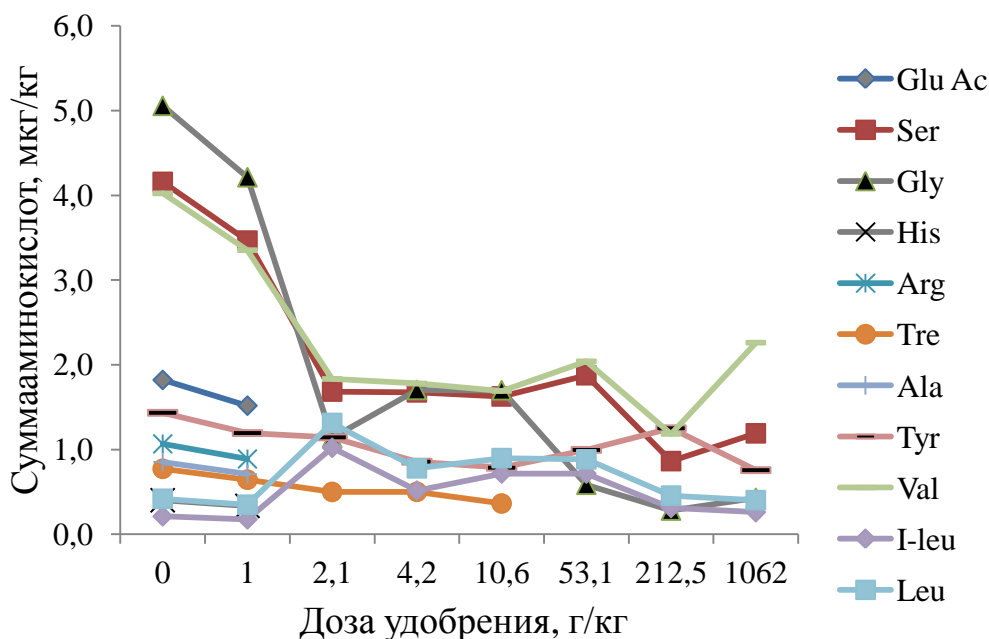


Рисунок 12. Влияние фосфоритной муки на содержание индивидуальных свободных аминокислот в почве

Основное влияние на образование свободных аминокислот оказывает жизнедеятельность микроорганизмов. Примерно 40 % от валового азота представлена пептидами и белками, и основная часть свободных аминокислот возникает в результате деполимерализации этих белков внеклеточными ферментами [33]. Микробная биомасса почвы определенная путем пересчета скорости СИД для контрольной почвы составила $2,5 \pm 0,5$ г С/кг почвы. Далее с повышением дозы удобрения показатель постепенно снижался, достигая минимума $1,9 \pm 0,3$ г С/кг почвы при максимальном содержании фосфоритной муки. Такой негативный эффект фосфорных удобрений на почвенную микрофлору обнаруживается в случае его значительного влияния на кислотность почвы [34]. Высокая корреляционная связь ($r = 0,95$) между суммарным содержанием свободных аминокислот и $C_{\text{микро}}$ показывает, что с уменьшением микробной биомассы наблюдается и уменьшение содержания свободных аминокислот.

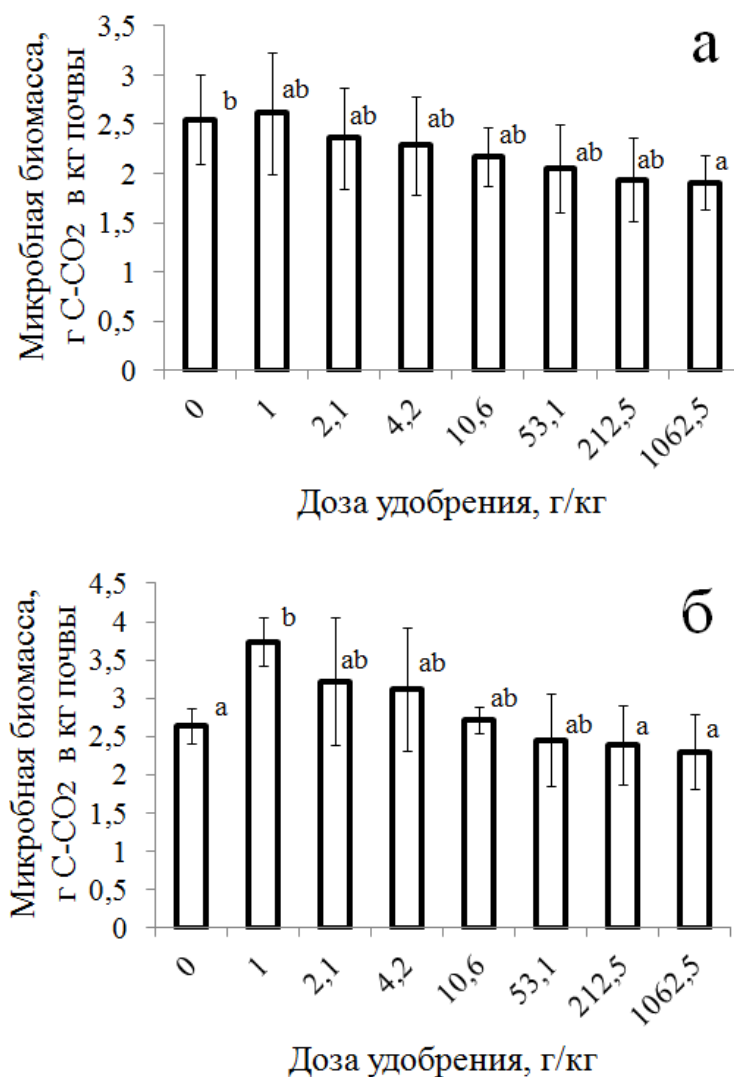


Рисунок 13. Влияние фосфоритной муки (а) и суперфосфата (б) на микробную биомассу в почвах (значения с разными латинскими буквами значительно различаются при $p < 0,05$)

При внесении минимальной дозы суперфосфата таким образом, внесение суперфосфата несколько иначе повлияло на содержание свободных аминокислот. Основным отличием от влияния внесения фосфоритной муки можно считать увеличение суммарного содержания свободных аминокислот. Минимальная доза суперфосфата – 1г/кг – повысила концентрацию аминокислот до $51,2 \pm 11,6$ мкг/кг. Дальнейшее увеличение доз удобрения в диапазоне 2,1–10,6 г/кг привело к некоторому снижению их содержания по сравнению с первым максимумом. Второй максимум концентрации свободных аминокислот наблюдался

при дозе 53,1 мг/кг удобрения. Рост содержания по сравнению с контрольной почвой наблюдалось практически для всех аминокислот, однако процентное их соотношение несколько изменялось. Высокие дозы удобрения привели к относительному уменьшению содержания глицина и серина, но несколько увеличили концентрацию аргинина и треонина.

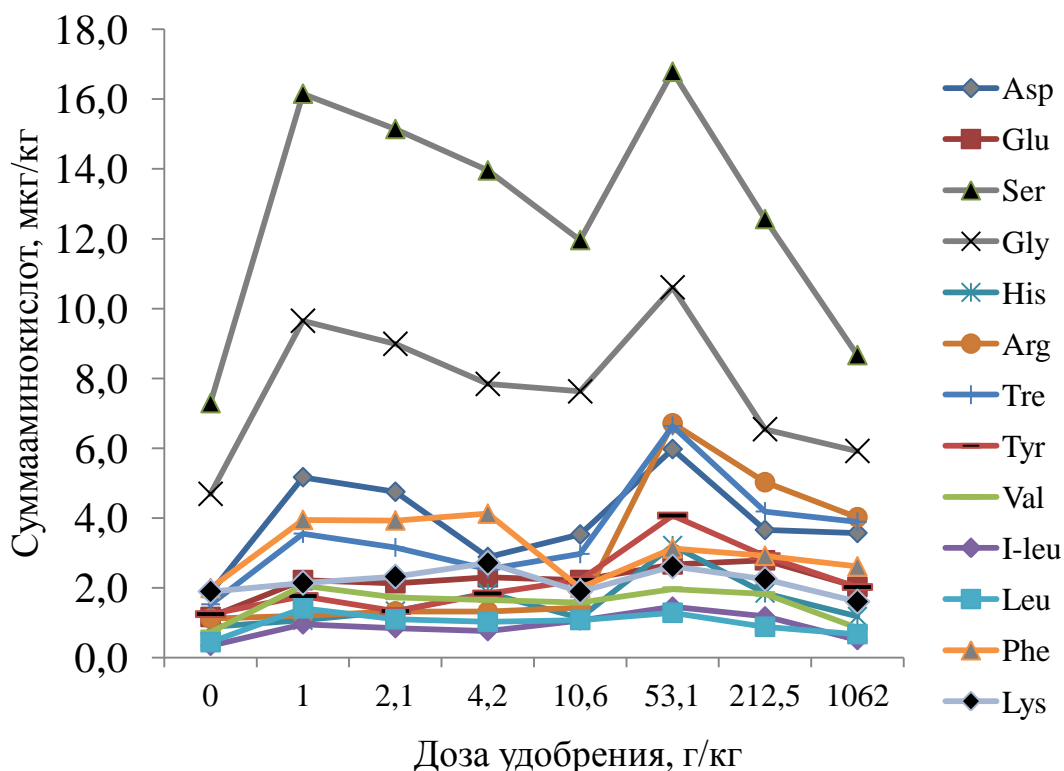


Рисунок 14. Влияние суперфосфата на содержание индивидуальных свободных аминокислот в почве

Показатель микробной биомассы при внесении в почвы различных доз суперфосфата, в целом, несколько выше, чем при внесении фосфоритной муки. Это можно объяснить тем, что суперфосфата гораздо лучше растворяется в почвах, и в течение инкубации микроорганизмы получили больше питательного вещества, чем при применении фосфоритной муки. В добавок, при производстве суперфосфата, удобрение обрабатывается аммонием, поэтому вместе с фосфором в почву попадает 6–9 % минерального азота, который так же является одним из основных питательных элементов микроорганизмов. Применение вместе с фосфором источников азота или углерода благоприятно влияет на

микрофлору почвы. Однако, повышение доз суперфосфата несколько снижает значения биомассы микробов, что вероятно, как и в случае с фосфоритной мукой связано с изменением кислотности среды влияющей на активность микроорганизмов. Корреляционная связь между суммарным содержанием свободных аминокислот и $C_{\text{микр}}$ составила $r = 0,90$

Таким образом, при разных дозах фосфоритной муки суммарное содержание свободных аминокислот варьировало от $7,8 \pm 1,1$ до $14,4 \pm 2,1$ мкг/кг, и даже минимальная рекомендуемая к внесению доза фосфоритной муки ($1,0$ г/кг) вызвала значительное снижение их концентрации. Количество идентифицируемых аминокислот при внесении больших доз фосфоритной муки уменьшилось от 9 до 6 раз. При внесении различных доз суперфосфата, наоборот, суммарная концентрация свободных аминокислот значительно увеличилась по сравнению с контролем и варьировала от $37,5 \pm 8,5$ до $67,1 \pm 15,2$ мкг/кг, однако с повышением дозы удобрения наблюдалось некоторое снижение по сравнению с максимумом при небольших дозах. Корреляционный анализ показал высокую связь между показателем микробной биомассы почвы и содержанием свободных аминокислот, как в случае применения фосфоритной муки ($r = 0,95$), так и суперфосфата ($r = 0,90$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рядчиков В. Г. Улучшение зерновых белков и их оценка. М.: Колос, 1978. – 368с.
2. David L. J., Andrew G. O., John F. F. Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solutions and soil extracts // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2002. – Vol. 34. – P. 1893–1902.
3. Jämtgård S. The Occurrence of Amino Acids in Agricultural Soil and their Uptake by Plants: doctoral thesis. Sweden, Umea, 2010. – 52 p.
4. Якубке Х. Д., Ешкайт Х. М. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1985 – 455 с.
5. Goodfriend G. A. Perspectives in Amino Acid and Protein Geochemistry. New York: Oxford university press, 2001. – 366 p.
6. Miller S. L. A production of amino acids under possible primitive Earth conditions // *Science*. – 1953. – Vol. 117(3046). – P. 528–529.
7. Amend J. P., Shock E. L. Energetics of amino acid synthesis in hydrothermal ecosystems // *Science*. – 1998. – Vol. 281 (5383). – P. 1659–1662.
8. Дроздова Т. В. Геохимия аминокислот. М.: Наука, 1977. – 199 с.
9. Петровский К. С., Ванханен В. Д. Гигиена питания: учебник. М.: Медицина, 1981. – 528 с.
10. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. – 816 с.
11. Guoyao W. Amino acids: biochemistry and nutrition. Boca Raton: CRC Taylor and Francis Group, 2013.
12. Григорьян Б. Р. Исследование металл-аминокислотного уровня в кормах и биологической активности хелата меди с метионином: дис. ... канд. биол. наук. Казань, 1980. – 169 с.
13. Болотин С. Н. Буков Н. Н., Волынкин В. А., Панюшкин В. Т. Координационная химия природных аминокислот. М.: ЛКИ, 2008. – 240 с.
14. Орлов Д. С., Садовникова Л. К., Суханова Н. И. Химия почв: учебное пособие. М.: Высшая школа, 2005. – 558 с.

15. Безуглова О. С. Гуминовые вещества в биосфере: учебное пособие. Ростов на Дону: Изд-во Южного федерального ун-та, 2009. – 120с.
16. Трофимов С. Я., Караванова Е. И. Жидкая фаза почв: учебное пособие по некоторым главам курса химии почв. М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 2009. – 73с.
17. Henry H. A. L., Jefferies R. L. Free amino acid, ammonium and nitrate concentrations in soil solutions of a grazed coastal marsh in relation to plant growth // *Plant, Cell and Environment*. – 2002. – Vol. 25. – P. 665–675.
18. Bonito M. D. Trace elements in soil pore water. A comparison of sampling methods: doctoral thesis. Nottingham, 2005. – 298 p.
19. Dessureault-Rompere J., Nowack B., Schulin R., Luster J. Modified micro suction cup/rhizobox approach for the in-situ detection of organic acids in rhizosphere soil solution // *Plant and Soil*. – 2006. – Vol. 286. – P. 99–107.
20. Göttlein A, Stanjek H. Micro-scale variation of solid-phase properties and soil solution chemistry in a forest podzol and its relation to soil horizons // *European Journal of Soil Science*. – 1996. – Vol. 47. – P. 627–636.
21. Fischer H., Meyer A., Fischer K., Kuzyakov Y. Carbohydrate and amino acid composition of dissolved organic matter leached from soil // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2007. – Vol. 39. – P. 2926–2935.
22. Гидо Х. Исследования кинетики десорбции аминокислот почвы методом элюирования из колонки: дипл. раб. Казань: Каз. гос. ун-т, 1988. – 58с.
23. Быстрицкая Т. Л., Волкова В. В., Снакин В. В. Почвенные растворы черноземов и серых лесных почв. М.: Наука, 1981. – 148с.
24. Tida G. E., Nie S. A., Huang D. F., Xiao H., Jones D. L., Iwasaki K. Assessing soluble organic nitrogen pools in horticultural soils: a case study in the suburbs of Shanghai (China) // *Soil and Plant Science*. – 2010. – Vol. 60(6). – P. 529–538.
25. Warman P. R., Bishop C. Free and HF-HCL-extractable amino acids determined by high performance liquid chromatography in a loamy sand soil // *Biology and Fertility of Soils*. – 1987. – Vol. 5. – P. 215–218.

26. Xiaochuan C., Rousk J., Jones D. L. Rice uptake of soil adsorbed amino acids under sterilized environment // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2013. – Vol. 62. – P. 13–21.

27. Xian-you C., Liang-huan W. U., Xiao-chuang C., Animesh S., Yuan-hong Z. An experimental method to quantify extractable amino acids in soils from south-east China // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2013. – Vol. 12. – P. 732–736.

28. Rousk J., Jones D. L. Loss of low molecular weight dissolved organic carbon (DOC) and nitrogen (DON) in H₂O and 0.5 M K₂SO₄ soil extracts // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2010. – Vol. 42. – P. 2331–2335.

29. Patrick A. W. H., David L. J., Jentschke G., Douglas L. G. Organic acid concentrations in soil solution: effects of young coniferous trees and ectomycorrhizal fungi // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2005. – Vol. 37. – P. 771–776.

30. Краснов Е. А., Блинникова А. А. Современные хроматографические методы (ГЖХ, ВЭЖХ) в фармацевтическом анализе: учебное пособие. Томск: Сибир. гос. мед. ун-т, 2007. – 152 с.

31. Cooper C., Packer N., Williams K. Amino acid analysis protocols. New Jersey: Humana Press Inc., 2001 – 265 p.

32. Saunders J. A. Saunders J. M, Morris S., Wynne S. A. Amino acid analysis of subcellular fractions by PITC and OPA // *Chromatogram*. – 1988. – Vol. 9. – P. 2–4.

33. Cao X., Ma Q., Wu L., Zhu L., Jin Q., Effects of ammonium application rate on uptake of soil adsorbed amino acids by rice // *Zhejiang Univ-Sci. B*. – 2016. – Vol. 17. – P. 294–302.

34. Giovannini C., Garcia-Mina J. M., Ciavatta C., Marzadori C. Effect of organic-complexed superphosphates on microbial biomass and microbial activity of soil // *Biology and Fertility of Soils*. – 2013. – Vol. 49(4). – P. 395–401.