

Kazimierz BLAIM, Jadwiga SZYNAL

Wstępne badania nad pektynami liści niektórych roślin rodzaju *Nicotiana*

Вступительные исследования пектина в листьях некоторых
растений вида *Nicotiana*

Preliminary Investigations on Pectins in the Leaves of some Plants from
Nicotiana Genus

Mimo bardzo wielu prac z dziedziny chemii i biochemii tytoni tylko nieliczne z nich dotyczą substancji pektynowych. Ten brak większego zainteresowania związkami, które stanowią przecież ok. 10% suchej masy liści, można tłumaczyć niedocenianiem biologicznej roli pektyn i ich znaczenia w technologii przerobu surowca tytoniowego.

Z dotychczasowych danych z piśmiennictwa wynika, że zawartość związków pektynowych w liściach tytoniu może wahać się w szerokich granicach w zależności zarówno od odmiany, jak i warunków środowiska (7, 8).

Obecność pektyn w liściach tytoniu jest według większości autorów zjawiskiem negatywnym z punktu widzenia ich wartości technologicznej (3). Niektórzy autorzy są jednak zdania, że pektyny nie wywierają wyraźnego wpływu ani na smak, ani na zapach tytoniu w czasie palenia (8). Według Döro (5) wpływ związków pektynowych na jakość tytoniu zależy przede wszystkim od wielkości ich cząsteczek, co jest uzależnione od sposobu przygotowywania surowca. Autor ten dochodzi do przekonania, że tylko w liściach o pełnej dojrzałości zachodzi w czasie ich suszenia intensywniejszy rozpad związków pektynowych. Tytonie papierosowe, których zbiór następuje przy pełnej dojrzałości, zawierają przeważnie pektyny drobnocząsteczkowe, w przeciwieństwie do tytoni cygarowych, których zbiór odbywa się przed okresem pełnej dojrzałości. Tytonie te charakteryzują się obecnością pektyn o dużym ciężarze cząsteczkowym. Wydaje się, że dotychczas zbyt mało zwracano uwagi na znaczenie biologiczne pektyn w tytoniach. Mamy tutaj na myśli przede

wszystkim rolę tych związków w gospodarce wodnej roślin, a także ich współdział w niektórych zjawiskach o charakterze odpornościowym. Badania prowadzone pod tym kątem mogą mieć znaczenie praktyczne i to zarówno od strony przerobu surowca, jak i niektórych zagadnień hodowlanych.

Niniejsza praca jest wstępem do badań nad występowaniem pektyn w liściach niektórych roślin rodzaju *Nicotiana* przede wszystkim z punktu widzenia ich roli biologicznej. Obejmuje ona badania porównawcze nad występowaniem poszczególnych frakcji pektyn w liściach *N. tabacum*, *N. rustica* i *N. glauca*. W badaniach tych zwrócono zwłaszcza uwagę na stopień metylacji protopektyn i oznaczono zawartość wapnia wolnego oraz związanego. Jak wiadomo bowiem, z ogólnej ilości wapnia w roślinach ok. 50% przypada na połączenia pektynowe (1). Przeprowadzono również badania nad występowaniem i stopniem metylacji pektyn oraz zawartością wapnia w liściach różnych pięt *N. tabacum*.

Niezależnie od tych badań zainteresowano się wpływem suszenia i fermentacji liści *N. tabacum* na zawartość i stopień metylacji pektyn.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były liście roślin *N. tabacum* (Virginia Kaznowskiego), *N. rustica* oraz *N. glauca*, zebrane w r. 1969 z poletek doświadczalnych należących do Pracowni Tytoniu IUNG w Puławach. Liście wymienionych roślin zbierano w okresie ich kwitnienia i, w zależności od przeznaczenia, odpowiednio je przygotowywano. W przypadku badań nad występowaniem związków pektynowych w liściach poszczególnych gatunków roślin zbierano liście środkowe i dzielono je na 3 części: jedną z nich stanowił zewnętrzny, peryferyjny pas blaszki liściowej o szerokości ok. 2 cm, część drugą — podobny pas przylegający do poprzedniego, część zaś trzecia stanowiła środek liścia. Tak przygotowany materiał suszono w temperaturze 105°C i następnie rozdrabniano.

W badaniach nad występowaniem pektyn w liściach różnych pięt *N. tabacum* liście dzielono na 3 grupy: pochodzące z dolnych, środkowych i wierzchołkowych (górnych) części rośliny. Poza tym postępowano podobnie jak w poprzednim przypadku.

Próbki do badań nad wpływem suszenia i fermentacji liści *N. tabacum* pobierano trzykrotnie. Pierwszą z nich pobrano z plantacji przemysłowej w czasie głównego zbioru. Surowiec natychmiast wysuszono w 105°C i rozdrobniono. Próbkę drugą pobrano z suszarni po zakończeniu okresu suszenia, zaś próbkę trzecią — po zakończeniu procesu fermentacji. Proces ten był prowadzony w Lubelskiej Wytwórni Tytoniu Przemysłowego. Wszystkie badania wykonano w trzech powtórzeniach.

Metoda oznaczania związków pektynowych i stopnia ich metylacji

Przy oznaczaniu związków pektynowych w liściach badanych roślin posługiwano się metodą kolorymetryczną opracowaną w naszym Zakładzie (2), z tą modyfikacją, że ekstrakcję protopektyn przeprowadzano przy użyciu 0,02 M wersenianu dwu-

sodowego (EDTA) w dwóch wariantach: w środowisku obojętnym oraz w środowisku alkalicznym ($pH = 9,6$). Z różnic, jakie uzyskiwano w ilościach oznaczanych związków, wnioskowano o stopniu ich metylacji. Nasza metoda oznaczania pektyn oparta jest bowiem na reakcji karbazolu z wolnymi grupami karboksylowymi. W przypadku ekstrakcji protopektyn w środowisku alkalicznym następuje proces ich demetylacji i całkowite uwalnianie grup karboksylowych. W czasie ekstrakcji w środowisku obojętnym grupy metoksyłowe nie ulegają rozkładowi, wobec czego z karbazolem reagują jedynie wolne karboksyle. Im więcej grup metoksyłowych zawierają protopektyny, tym większych różnic należy się spodziewać w ilości oznaczanych protopektyn, uzyskanych z ekstrakcji w środowisku alkalicznym i z ekstrakcji w środowisku obojętnym.

Metoda oznaczania wapnia

Przy oznaczaniu zawartości wapnia posługiwano się metodą manganometryczną (6).

WYNIKI

A. BADANIA PORÓWNAWCZE NAD WYSTĘPOWANIEM I OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PEKTYN LIŚCI *N. TABACUM*, *N. RUSTICA* I *N. GLAUCA*

Wyniki badań, dotyczące występowania i stopnia metylacji pektyn liści niektórych roślin rodzaju *Nicotiana*, podane zostały w tab. 1. Zawartość wapnia wolnego i związanego w badanych liściach przedstawia tab. 2. Jak widać, liście poszczególnych roślin różnią się przede wszystkim

Tab. 1. Występowanie i stopień metylacji substancji pektynowych w liściach niektórych roślin rodzaju *Nicotiana* (w % pektynianu wapnia w przeliczeniu na suchą masę surowca)

Occurrence and rate of the methylation of pectin substances in the leaves of some plants from *Nicotiana* genus (in per cent of calcium pectinate in terms of dry weight)

Surowiec (liście środkowe)		Pektyny rozp. w %	Protopektyny w %		Protopektyny zmetylowane w %
			Frakcja niealk.	Frakcja alk.	
<i>Nicotiana glauca</i>	zewn. cz.	1,91	4,00	5,38	1,38
	środk. cz.	1,61	4,20	5,36	1,16
	wewn. cz.	1,61	3,58	4,74	1,16
<i>Nicotiana rustica</i>	zewn. cz.	1,17	6,66	8,37	1,71
	środk. cz.	1,99	6,42	8,40	1,98
	wewn. cz.	1,99	5,45	8,40	2,95
<i>Nicotiana tabacum</i>	zewn. cz.	1,63	3,44	6,42	2,98
	środk. cz.	2,77	—	6,92	—
	wewn. cz.	1,84	3,68	5,24	1,56

Tab. 2. Zawartość wapnia wolnego i związanego w liściach niektórych roślin rodzaju *Nicotiana*Content of free and bound calcium in the leaves of some plants from *Nicotiana* genus

Surowiec (liście środkowe)		Wapń wolny w %	Wapń związany w %
<i>Nicotiana glauca</i>	zewn. cz.	0,34	3,61
	wewn. cz.	0,32	3,80
<i>Nicotiana rustica</i>	zewn. cz.	0,37	4,53
	wewn. cz.	0,29	3,89
<i>Nicotiana tabacum</i>	zewn. cz.	0,52	2,81
	wewn. cz.	0,49	3,17

ilością protopektyn, natomiast zawartość pektyn rozpuszczalnych nie wykazuje praktycznie żadnych różnic. Najwięcej protopektyn zawierają liście *N. rustica* (ok. 8%), najmniej zaś liście *N. glauca* (ok. 5%). Rozmieszczenie pektyn w blaszkach liściowych jest mniej więcej równomierne u wszystkich badanych roślin. Porównując zawartość protopektyn frakcji alkalicznej i frakcji obojętnej, można mieć pewne wyobrażenie o stopniu metylacji tych związków. Tak więc najbardziej zmetylowane wydają się pektyny liści *N. tabacum* w porównaniu do liści roślin pozostałych.

Przechodząc z kolei do omówienia wyników zawartych w tab. 2, stwierdzić można interesujące zjawisko. Najmniej wapnia związanego występuje w liściach *N. tabacum*, a więc tam, gdzie stopień metylacji pektyn wydaje się być największy. Liście te charakteryzuje również największa zawartość wapnia wolnego. Rozmieszczenie wapnia w blaszce liściowej jest na ogół równomierne.

B. BADANIA NAD PEKTYNAMI LIŚCI RÓŻNYCH PIĘTER *N. TABACUM*

Załączona tab. 3 przedstawia zawartość pektyn w liściach różnych pięter *N. tabacum*.

Jak widać z tabeli, względnie duże różnice w występowaniu pektyn obserwuje się w liściach różnych pięter. Liście dolne zawierają prawie dwukrotnie więcej pektyn rozpuszczalnych w porównaniu do liści górnych (wierzchołkowych). W przypadku natomiast protopektyn jest raczej odwrotnie. Stwierdzić można również różnice w stopniu metylacji protopektyn. Najmniej zmetylowane wydają się być pektyny liści dolnych, najbardziej zaś pektyny liści wierzchołkowych. Innymi słowy, w miarę starzenia się liści następują procesy demetylacji badanych związków. Zjawisko to zbiega się bardzo wyraźnie z zawartością wapnia związanego

Tab. 3. Występowanie i stopień metylacji substancji pektynowych w liściach różnych pięter *Nicotiana tabacum* (w % pektynianu wapnia w przeliczeniu na suchą masę surowca)

Occurrence and rate of the methylation of pectin substances in the leaves collected from different height of *N. tabacum* (in per cent of calcium pectinate in terms of dry weight)

Surowiec		Pektyny rozp. w %	Protopektyny w %		Protopektyny zmetylowane w %
			Frakcja niealk.	Frakcja alk.	
Liście dolne	zewn. cz.	2,99	4,05	4,05	—
	środk. cz.	3,55	4,70	4,70	—
	wewn. cz.	2,98	6,40	7,90	1,50
Liście środkowe	zewn. cz.	1,63	3,44	6,42	2,98
	środk. cz.	2,77	—	6,92	—
	wewn. cz.	1,84	3,68	5,24	1,56
Liście górne	zewn. cz.	0,73	4,13	5,92	1,79
	środk. cz.	1,19	3,87	7,10	3,23
	wewn. cz.	1,40	4,80	6,90	2,10

Tab. 4. Zawartość wapnia wolnego i związanego w liściach różnych pięter *N. tabacum*

Content of free and bound calcium in the leaves collected from different height of *N. tabacum*

Surowiec		Wapń wolny w %	Wapń związany w %
Liście dolne	zewn. cz.	0,66	3,04
Liście środkowe	zewn. cz.	0,52	2,81
Liście górne	wewn. cz.	0,39	1,41

(tab. 4). Zawartość wapnia związanego w liściach górnych jest o połowę mniejsza od zawartości tego pierwiastka w liściach pięter dolnych. To samo zresztą dotyczy i zawartości wapnia wolnego.

C. WPLYW SUSZENIA I FERMENTACJI LIŚCI *N. TABACUM* NA WYSTĘPOWANIE I METYLACJĘ PEKTYN

Jak można sądzić z danych załączonych w tab. 5, najintensywniejszy proces rozkładu związków pektynowych zachodzi w okresie suszenia. W czasie fermentacji przemiany pektyn są już o wiele wolniejsze. Widać

Tab. 5. Wpływ suszenia i fermentacji liści *Nicotiana tabacum* na zawartość i stopień metylacji pektyn (w % pektynianu wapnia w przeliczeniu na suchą masę surowca)

Influence of the drying and fermentation of *Nicotiana tabacum* leaves on the content of pectins and rate of their methylation (in per cent of calcium pectinate in terms of dry weight)

Surowiec	Pektyny rozp. w %	Protopektyny w %		Protopek- tyny zme- tylowane w %
		Frakcja niealk.	Frakcja alk.	
Przed suszeniem	2,04	6,03	7,14	1,11
Po suszeniu	3,40	3,40	4,33	0,93
Po fermentacji	3,20	3,20	3,90	0,70

to zarówno z ilości zmniejszania się protopektyn, jak i zwiększania się zawartości pektyn rozpuszczalnych. Wydaje się również, że wraz ze zmniejszaniem się ilości pektyn zmniejsza się też ich stopień metylacji. Wynika z tego, że rozpad substancji pektynowych poprzedzany jest ich demetylacją.

DYSKUSJA

W naszych badaniach porównawczych nad pektynami liści *N. tabacum*, *N. rustica* i *N. glauca* wykazaliśmy, że istnieją różnice w występowaniu tych związków. Różnice te nie polegają jedynie na różnej zawartości protopektyn, ale również i na stopniu ich metylacji. Wyższy stopień metylacji pektyn czyni je układem bardziej elastycznym, co rzutuje z kolei na fizyczne właściwości całych liści. Liście *N. tabacum* różnią się od liści roślin pozostałych zarówno wyższym stopniem metylacji pektyn, jak i niższą zawartością wapnia związanego. Jest to chyba jedną z przyczyn lepszych właściwości technologicznych tych liści w porównaniu na przykład z liśćmi machorki.

Jak wykazały dalsze nasze badania, związki pektynowe są na ogół równomiernie rozmieszczone w blaszce liściowej. Obserwuje się natomiast dużą zmienność o charakterze ontogenetycznym. W miarę starzenia się liści zawartość protopektyn maleje, zwiększa się natomiast ilość pektyn rozpuszczalnych. Zmianom tym towarzyszą także zmiany w stopniu metylacji tych związków. Najbardziej metylowane są pektyny liści młodych. Wraz ze starzeniem się liści obserwować można nasilenie w przebiegu procesu demetylacji. Równolegle z tym procesem zwiększa się zawartość

wapnia związanego w liściach. Wydaje się, że zjawisko demetylacji w miarę starzenia się liści ma charakter bardziej ogólny i nie ogranicza się tylko do związków pektynowych. I tak na przykład w liściach roślin rodzaju *Nicotiana* podczas ich starzenia następują procesy demetylacji nikotyny do nornikotyny (3). Nasza obserwacja dotycząca przemiany związków pektynowych w czasie suszenia i fermentacji liści może mieć pewne znaczenie praktyczne. Fakt, że przemiany te zachodzą przede wszystkim w okresie suszenia, pozwala bowiem na stwierdzenie, że regulowanie wspomnianych procesów może odbywać się właśnie w tej fazie przeróbki technologicznej surowca tytoniowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Blaім K.: Rola wapnia w zjawiskach odpornościowych u roślin. Post. Nauk Roln., 6, 114, 51, 1968.
2. Blaім K., Przeszlakowska M.: Wyodrębnianie i oznaczanie substancji pektynowych w materiale roślinnym. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio AA, vol. XXIII (1968), 27, Lublin 1969.
3. Blaім K.: Swoiste substancje roślin uprawnych. PWRiL, Warszawa 1965.
4. Brückner H.: Die Biochemie des Tabaks und der Tabakvorbereitung. Paul Parey, Berlin 1936.
5. Döro W.: Neue Anschauungen über des Pektins in Tabak. Süddeutsche Tabakzeitung, 59, 3 i 14, 1949.
6. Peterburgskij P. V.: Praktikum po agrochimii. Moskwa 1952.
7. Pyriki C., Moldenhauer W.: Untersuchungen über Tabakpektine und deren Einfluss auf die Tabakqualität. Berichte des Instituts für Tabakforschung, 10, 238, 1963.
8. Sz muk A. A.: Chimiya tabaka i machorki. Piszczepromizdat, Moskwa 1948.

РЕЗЮМЕ

Исследовали выступление и общую характеристику пектина в листьях *N. tabacum*, *N. rustica* и *N. glauca*. Установили, что большее содержание протопектина характерно для листьев *N. rustica*, а пектин с высокой степенью метилации и меньшее содержание связанного кальция характерны для листьев *N. tabacum*.

Из исследований пектина в листьях *N. tabacum* на разных ярусах растений следует, что по мере старения листьев содержание протопектина уменьшается, а содержание растворимых пектинов увеличивается. Этим изменениям сопутствует изменение в степени метилации. Наибольшую степень метилации имеют пектины в молодых листьях.

Исследования влияния сушки и ферментации листьев *N. tabacum* показали, что изменения в этих соединениях прежде всего происходят в период сушки.

SUMMARY

Investigations on the occurrence and general characteristics of pectins in the leaves of *N. tabacum*, *N. rustica* and *N. glauca* were carried out. It was found that the leaves of *N. rustica* contain the largest amount of protopectins, whereas the leaves of *N. tabacum* are characterized by the pectins of a higher rate of methylation and contain the smallest amount of bound calcium.

Investigations on the pectins of leaves collected from different height of *N. tabacum* showed that when the leaves grow older the content of protopectins decreases and the amount of soluble pectins increases. These changes are also followed by the changes of the rate of methylation. The pectins of young leaves show the highest rate of methylation.

Investigations on the influence of drying and fermentation of *N. tabacum* leaves on the occurrence and rate of pectin methylation showed that the metabolism of these compounds takes place first of all during drying.