



Биолог. журн. Армении, 3 (72), 2020

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНУЛИНА В ЭКСТРАКТЕ КЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА

И.Э. МЕЛКУМЯН

НПЦ “Армбиотехнология” НАН Республики Армения
inna.melkumyan@inbox.ru

В результате проведенных исследований разработан быстрый, простой в исполнении метод определения инулина в растворе, в частности, в экстракте клубней топинамбура. В его основе лежит образование окрашенного комплекса со специфическим реагентом резорцина в соляной кислоте с максимумом поглощения при 490 нм. Предлагаемый метод может успешно применяться как в технологических процессах, так и в исследованиях биоконверсии инулина в различные продукты.

Топинамбур – экстракт – инулин – резорцин – соляная кислота

Չետազոտությունների արդյունքում մշակվել է գետնախնձորի պալարների մեջ ստացված լուծամզվածքում ինուլինի որոշման արագ, պարզ մեթոդ: Նրա հիմքում ընկած է աղաթթվի և ռեզորցինի հատուկ ռեակտիվի հետ գունավոր համալիր միացության ձևավորումը, որի առավելագույն կլանումը 490 նմ է: Առաջարկվող մեթոդը կարող է հաջողությամբ կիրառվել ինչպես տեխնոլոգիական գործընթացներում, այնպես էլ տարբեր ապրանքների մեջ ինուլինի կենսակոնվերսիայի ուսումնասիրություններում:

Գետնախնձոր – լուծամզվածք – ինուլին – ռեզորցին – աղաթթու

As a result of the research, a fast, simple method for determining inulin in solution, in particular in the extract of Jerusalem artichoke tubers, was developed. It is based on the formation of a colored complex with a specific resorcin reagent in hydrochloric acid with a maximum absorption at 490 nm. The proposed method can be successfully applied both in technological processes and in studies of inulin bioconversion into different products.

Jerusalem artichoke – inulin – extract – resorcin – hydrochloric acid

Инулин является естественным высокомолекулярным полисахаридом (полифруктан), с молекулярной массой 5000-6000 (C₆H₁₀O₅)_n (рис.1). Молекула инулина представляет собой полимерную цепочку, состоящую из 30-35 остатков фруктозы и 1-2 остатков глюкозы. Остатки фруктозы соединены β-1-2-гликозидными связями. В конце полимерной цепи имеется один остаток глюкозы. При гидролизе под действием кислот образует фруктозу и небольшое количество глюкозы.

Инулин широко распространен в растениях, относящихся к семействам сложноцветных, лилейных, злаковых и т.д. (Compositae, Liliaceae, Gramineae). Значительные его количества содержат клубни топинамбура, георгина, артишока, а также корни цикория и одуванчика [2, 7].

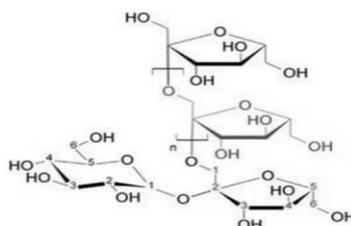


Рис.1. Структурная формула повторяющегося отрезка инулина

Мировое производство инулина доходит до 100 тыс. тонн в год. Большая часть инулина, предлагаемого потребителю, производится из клубней топинамбура. Топинамбур или земляная груша (*Helianthus tuberosus*) – многолетнее травянистое растение семейства сложноцветных. Возделывается как ценное, кормовое, техническое и продовольственное растение и не требует высокой агротехники. Для выделения инулина используется щадящая технология, максимально сохраняющая его ценные свойства. На выходе получается концентрированный порошок с высоким содержанием полисахарида [3,4]. Инулин является сырьем для производства фруктозы, этанола, фруктозо – глюкозного сиропа, разных олигофруктанов и их производных и т.д. [10]. Инулин применяется также в медицине для лечения и профилактики сахарного диабета, атеросклероза, остеопороза, дисбактериоза, при некоторых методах определения различных заболеваний в моче и плазме крови. Он также является самым широко используемым пребиотиком в мире [11].

В настоящее время разработаны различные методы количественного определения содержания инулина в растительном сырье [12]. В описанных методах инулин предварительно подвергается химическому или ферментативному гидролизу с помощью инулиназы и далее по количеству образовавшихся моносахаридов, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, фотометрии, рефрактометрии и др. методов рассчитывается количество инулина. [8,9]. Отметим, что известные методы определения количества инулина многоступенчатые, объемисты и не всегда удобны для применения в технологических процессах и в исследованиях биоконверсии инулина. В настоящей работе представлен разработанный нами быстрый, одноэтапный метод определения инулина в экстракте клубней топинамбура. Расчёт концентрации проводился с использованием стандартного образца инулина (Sigma).

Материалы и методы. Приготовление экстракта клубней топинамбура.

К промытым и измельченным клубням топинамбура добавляется вода в соотношении 1:2 и смесь при перемешивании выдерживается в течение 60 мин при температуре 70-80⁰С. Затем смесь фильтруется с помощью бумажной мяжки, фильтрат обесцвечивается активированным углем и осадок удаляется центрифугированием при 8000 оборотов в минуту. Полученный экстракт инулина далее использовали для разработки количественного метода определения инулина [5]. В табл.1. представлены оптимальные параметры получения экстракта клубней топинамбура.

Таблица 1. Условия получения экстракта клубней земляной груши

Степень измельчения клубней (мм)	Соотношение сырья и экстрагента	Продолжительность нагревания (мин)	Температура нагревания (°С)	pH среды (ед)	Центрифугирование экстракта (об/мин)
1.5-2.0	1:2	60	70-80	6.8	8000/1

Для разработки метода количественного определения инулина использовали:

Стандартный раствор: 100 мг инулина (Sigma) растворяется в 100 мл дистиллированной воды. Исследуемый раствор: в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 1 мл экстракта. Для точного определения инулина раствор разбавляли в 100 раз дистиллированной водой. Реактив Селиванова: 0.05 г резорцина растворяется в 100 мл 25 % -ного раствора соляной кислоты и хранится в темном месте [1, 6]

Спектрофотометрические определения проводили на спектрофотометре (PERKLIN-ELMER 550S) при максимальном поглощении в области 490 нм.

Результаты и обсуждение. С целью определения количества инулина в экстракте клубней топинамбура предварительно строится калибровочная кривая стандартного раствора инулина (0.1 %). Различные объемы (0.5, 1.0, 1.5 и 2.0 мл) стандартного и исследуемого растворов в пробирках доводили до 2 мл водой, затем добавляли 1 мл реактива Селиванова. Смесь нагревали в кипящей водяной бане (100⁰С) в течение 10 мин, затем охлаждали и измеряли оптическую плотность окрашенного комплекса, образовавшегося в результате гидролиза инулина с резорцином и соляной кислотой, на спектрофотометре при длине волны 490 нм (рис.1). Калибровочный график строили в системе координат: концентрация стандартного раствора (мг/мл) – оптическая плотность (ОП). В табл. 2 представлена схема построения калибровочной кривой стандартного раствора инулина.

Таблица 2. Схема построения калибровочной кривой стандартного раствора инулина (0.1 %)

Концентрация инулина (мг/мл)	Значение оптической плотности при 490 нм
0.5	0.024
1.0	0.05
1.5	0.08
2.0	0.115

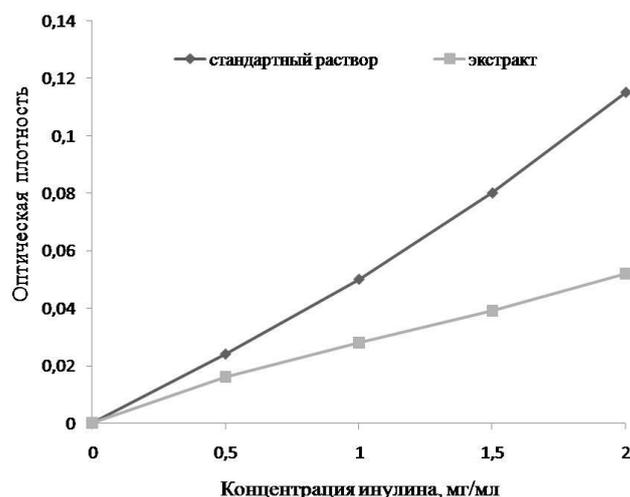


Рис.2. Калибровочные графики стандартного раствора инулина и исследуемого раствора

Исследования показали, что имеется линейная зависимость между оптической плотностью и количеством инулина. Концентрацию анализируемого раствора C_x находят по калибровочному графику после определения его оптической плотности D_1 в тех же условиях. В дальнейших исследованиях при определении количества инулина нами было предложено использовать формулу:

$$C_x (\%) = \frac{C * D_1}{D} * K,$$

где C – содержание инулина стандартного раствора (мг/мл) D_1 – оптическая плотность исследуемого раствора, D – оптическая плотность стандартного раствора, K – коэффициент разбавления исследуемого раствора.

С применением разработанной методики было определено количественное содержание инулина в экстракте клубней топинамбура (табл. 3)

Таблица 3. Содержание инулина в экстракте клубней топинамбура

Экстракт клубней топинамбура (мл)	Оптическая плотность при 490 (нм)	Количество инулина (мг)
0.5	0.016	33.4
1.0	0.028	56
1.5	0.039	74
2.0	0.052	90

В результате проведенных исследований разработан быстрый, простой в исполнении метод определения инулина в растворе, в частности в экстракте клубней топинамбура. В основе разработанной методики было установлено, что исследуемый раствор-экстракт, аналогично стандартному раствору (0.1 % инулина) при нагревании также подвергается гидролизу в присутствии концентрированной соляной кислоты и резорцина, в результате чего образовавшаяся фруктоза легко образует оксиметилфурфурол – комплекс вишнево красного цвета [6], имеющий максимальное поглощение в диапазоне 490 нм. Показано, что данная реакция является высокоспецифичным реагентом для определения полифруктанов. Предлагаемый метод может успешно применяться как в технологических процессах, так и в исследованиях биоконверсии инулина в различные продукты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запруднова Е.А., Гладилкина А.Г. Практикум по биохимии. Владимир, с. 35, 2011.
2. Кретович В.Л., Биохимия растений. М., “Высшая школа”, с.189, 1986.
3. Леонтьев В.Н, В.В. Титок, Д.А. Дубарь, О.С. Игнатовец, В.Г. Лугин, Е.В. Феськова. Инулин из топинамбура: структура, свойства, применение, Труды БГУ, 9, часть 1, Биотехнология, с. 180, 2014.
4. Сумин Ю.А. Программа “Топинамбур” – стратегический ресурс России. Наша власть. 61, 3, с.42-44, 2006.
5. Шаззо Р.И., Екутеч Р.И., Кондратенко В.В., Купин Г.А. Способ получения инулиносодержащего раствора из топинамбура. Патент РФ№2493171, с.4, 2012.
6. Щербина А.Э. Органическая химия. Лабораторный практикум по органическому синтезу. А.Э. Щербина, Л.Г. Магусевич, И.В. Сенько. Минск, БГТУ, с. 415, 2006.
7. A. Erdei, *Abstr. IX Seminar on Inulin, Hungary*, p.10-11, 2002.

8. *Camelia Neagu, Gabriela Bahrim*. Inulinase-A Versatile for Biotechnology. Innovative Romanian Food Biotechnology, 9, p.1-11, 2011
9. *Chris van Waes, Joost Baert, Lucien Carlier, Erik VanBockstaele*. A Rapid Determination of the Total Sugar Content and the Average Inulin Chain Length in Roots of Chicory (*Cichorium intybus L.*). Journal of the science of Food and Agriculture, 76,1, p. 107-110, 1999.
10. *Da Wang, Fu-Li Li, Shi-An Wang*. A One-Step Bioprocess for Production of Inulin of High-content Fructo-oligosaccharides from inulin by Yeast. Carbohydrate Polymers, 151, p. 1220-1226, 2016
11. *Hofer K. and Dieter Jenewein*. Enzymatic determination of Inulin in Food and Dietary Supplements, European Food Research and Technology, 209, p.423-427, 1999
12. *Saengkanuk Araya, Suporn Nuchadomrong, Sanum Jogloy, Aran Patanothal, Supalax Saengkanuk, Supalax Srijaranai*. A Simplified Spectrophotometric Method for the Determination of Inulin in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*) Tubers. European Food Research Technology, 233, p. 609-616, 2011.

Поступила 29.05.2020