

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԲԱՂԴԱՍԱՐՅԱՆ ԳՐԻԳՈՐ ԵՐՎԱՆԴԻ

ԻՆՈՒԼԱԶ ՖԵՐՄԵՆՏԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ *Taraxacum officinale* Wigg ԽԱՏՈՒՏԻԿԻ
ԱՐՄԱՏՆԵՐԻՑ ԵՎ ՆՐԱ ՈՐՈՇ ՖԻԶԻԿԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ԵՎ ԿԻՆԵՏԻԿԱԿԱՆ
ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Գ.00.04 - Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
զիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2015

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БАГДАСАРЯН ГРИГОР ЕРВАНДОВИЧ

ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТА ИНУЛАЗЫ ИЗ КОРНЕЙ ОДУВАНЧИКА *Taraxacum officinale* Wigg И ЕГО НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04 - Биохимия

ЕРЕВАН 2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝	ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Մ.Ա. Դավթյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Հ.Ռ. Վարդապետյան կենս. գիտ. թեկնածու Լ.Ս. Մարկոսյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2015թ. դեկտեմբերի 24-ին ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 Մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2015թ. նոյեմբերի 23-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար, կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель: академик НАН РА, доктор биол. наук, профессор М.А.Давтян

Официальные оппоненты: доктор биол. наук, профессор Г.Р. Вардапетян
кандидат биол. наук, Л.С.Маркосян

Ведущая организация Национальный аграрный университет Армении

Защита диссертации состоится 24-го декабря 2015г. в 14⁰⁰ часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 23-го ноября 2015г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051, кандидат биол. наук, доцент

М.А. Парсаданян

ՆԵՐԱՄՈՒԹՅՈՒՆ

Արդիականությունը: Բնույինը հանդիսանում է կիրառական կարևոր նշանակություն ունեցող բուսական բազմաշաքար: Այն հայտնաբերված է բարդածաղկավորների ընտանիքին պատկանող տարբեր տեսակների մոտ: Առանձնակի հետաքրքրություն են ներկայացնում գետնախնձորը (*Heliantus tuberosus*) և եղերդակը (*Ichorium intimus. Sativum L.*), որոնց պալարներն ու արմատները պարունակում են ինուլինի զգալի քանակներ: Արդյունաբերության աճող հետաքրքրությունը վերոհիշյալ բույսերի և ինուլինի նկատմամբ սկսվել է մոտ 30 տարի առաջ, երբ հետազոտությունների արդյունքում պարզվեց, որ ինուլինը հեռանկարային հումք է էթանոլի, որպես կենսավառելիք և ֆրուկտոզի ստացման համար: Այնուհետև եվրոպական մի շարք երկրներում՝ Ֆրանսիայում, Նիդերլանդներում, ինչպես նաև Կանադայում լայնորեն ներդրվեցին որպես մշակութային բույսեր գետնախնձորն ու ցիկորին: Բնույինը, հանդիսանալով ֆրուկտոզի (97%) և գլյուկոզի (3%) գծային պոլիմեր, կարևոր հումք է հանդիսանում տարբեր միացությունների ստացման համար:

Այսպես, օրինակ ինուլինի մանրէաբանական, ֆերմենտային և առանձին դեպքերում նաև քիմիական վերամշակման արդյունքում հնարավոր է ստանալ ֆրուկտոզ, որը լիարժեք փոխարինում է գլյուկոզին և խիստ կարևոր է շաքարախտով տառապող հիվանդների և մի շարք այլ հիվանդությունների կանխարգելման համար, ինչպես նաև պահածոների, քաղցրավենիքների և այլնի ստացման համար: Բնուլինից ստացվում է ֆրուկտոզ-գլյուկոզային օշարակ, որը լայն կիրառություն ունի սննդաարդյունաբերության բնագավառում: Ստացվում են նաև տարբեր օլիգոֆրուկտաններ, ցիկլոհիմուլֆրուկտաններ, օրգանական թթուներ, հիդրօքսիմեթիլֆուրֆուրոլ, էթանոլ և այլ կենսաբանորեն ակտիվ միացություններ: Ընդ որում, մեկ հեկտարից ստացված 40 տոննա գետնախնձորի պալարներից ստացվում է մոտ երկու անգամ ավելի էթանոլ, քան համապատասխան քանակի շաքարի ճակնդեղից: Վերոհիշյալ միացությունները լայն կիրառում ունեն սննդաարդյունաբերության, բժշկության, դեղագործության բնագավառներում, ինչպես նաև որպես պրոբիոտիկ: Նշենք նաև, որ լայն տարածում գտած գետնախնձորի պալարները ինուլինի վերամշակումից հետո արժեքավոր հումք են հանդիսանում մեթան գազի ստացման համար, ինչպես նաև օգտագործվում են որպես անասնակեր: Նշենք նաև, որ ինուլինի տարեկան արտադրությունն աշխարհում կազմում է մոտ 100 հազար տոննա (Голышев, 2006) և պահանջարկը աստիճանաբար աճում է: Այդ իսկ պատճառով շարունակվում են հետազոտությունները ինուլին պարունակող առավել հարուստ բույսերի նոր տեսակների հայտնաբերման, ինչպես նաև սելեկցիոն ճանապարհով նոր հիբրիդային սորտերի ստացման ուղղությամբ (Зеленков, 2001):

Բնուլինի վերամշակումը և կենսաձևափոխումը վերոհիշյալ տարբեր արգասիքների ստացման համար իրականացվում է հիմնականում ինուլինազ ֆերմենտի միջոցով: Հայտնաբերված և նկարագրված են երկու տիպի ինուլազներ՝ էկզո և էնդո: Առաջինը հիդրոլիզում է ինուլինը մինչև մոնոշաքարների՝ ֆրուկտոզի և գլյուկոզի, իսկ էնդոինուլազի ազդեցությամբ առաջանում են պոլիմերիզացիայի տարբեր աստիճան ունեցող

օլիգոֆրուկտաններ: Ներկայումս տարաբնույթ հետազոտություններ են իրականացվել ինուլինազների տարածվածության, նրանց կենսաքիմիական, ֆիզիկաքիմիական առանձնահատկությունների ուսումնասիրման և կիրառման ուղղությամբ: Ցույց է տրվել, որ հիմնականում վերոհիշյալ ֆերմենտային ակտիվությունը հայտնաբերվում է մանրէների՝ սնկերի, խմորասնկերի, որոշ բակտերիաների մոտ: Պարզվել է նաև, որ տարբեր մանրէներից անջատված և ուսումնասիրված ինուլինազներն իրենց առանձնահատկություններով տարբերվում են: Ներկայումս խմորասնկերից (*Kluyveromyces marxianus*) ստացված ինուլազը կիրառվում է ինուլինից էթանոլի և ֆրուկտոզ-գլյուկոզային օշարակի ստացման համար:

Սակայն միաժամանակ հարկ է նշել, որ ի տարբերություն մանրէային ինուլազներից, բուսական ծագում ունեցող ինուլազները գրեթե ուսումնասիրված չեն: Մինչդեռ հայտնի է, որ հատկապես ինուլին պարունակող բույսերում առկա է նաև ինուլազ ֆերմենտը, որն իրականացնում է ինուլինի նյութափոխանակությունը վեգետացիայի և այնուհետև հանգստի շրջանում: Վերոհիշյալ համառոտ շարադրանքից ակնհայտ է, որ ինուլազ ֆերմենտը խիստ կարևոր է ինուլինի կենսաձևափոխման և նրանից տարբեր արգասիքների ստացման համար: Միաժամանակ նշենք, որ գործնականում մեծ պահանջարկ կա ինուլազի առավել ակտիվ նոր ֆերմենտների ստացման ուղղությամբ:

Ներկայացված աշխատանքը նվիրված է ինուլինով հարուստ նոր բուսական տեսակների, ինչպես նաև նոր բուսական ծագում ունեցող ինուլազների հայտնաբերմանը և նրանց առանձնահատկությունների ուսումնասիրությանը:

Աշխատանքի նպատակն ու խնդիրները:

Աշխատանքի նպատակն է հայտնաբերել ՀՀ Մյունիքի մարզում տարածված բարդածաղկավորների ընտանիքին պատկանող, ինուլին պարունակող, ինչպես նաև ինուլազային ակտիվությամբ օժտված նոր հեռանկարային տեսակներ, ուսումնասիրել նրանց կենսաբանական առանձնահատկությունները և կիրառման հեռանկարները:

Նախատեսվում է իրականացնել հետևյալ հետազոտությունները՝

- ինուլին պարունակող նոր բուսատեսակների հայտնաբերման նպատակով ուսումնասիրել Մյունիքի մարզի բնակլիմայական պայմաններում աճող բարդածաղկավորների ընտանիքին պատկանող բույսերի տեսակները,
- ուսումնասիրել ինուլինի քանակի դինամիկան վեգետացիայի և հետվեգետացիոն ժամանակահատվածում, նրա ավելի մեծ քանակներ պարունակող բույսերի պալարներում,
- մշակել պարզեցված եղանակ ինուլինի ստացման համար,
- հայտնաբերել լայնորեն տարածված բուսատեսակ, որը պարունակում է բարձր ակտիվությամբ օժտված ինուլազ ֆերմենտ,
- մշակել եղանակ բույսից ինուլազ ֆերմենտի անջատման համար,
- ուսումնասիրել ֆերմենտի ֆիզիկաքիմիական, կենսաքիմիական առանձնահատկությունները և կիրառման հեռանկարները:

Գիտական նորույթը:

Առաջին անգամ հայտնաբերվել և ուսումնասիրվել են Մյունիքի մարզում տարածված բարդածաղկավորների ընտանիքին

պատկանող բույսերի վայրի տեսակներ՝ կռատուկ, եղերդակ, գետնախնձոր, խատուտիկ անտառային, խատուտիկ դաշտային, ծնեբեկ, գեորգինա, որոնք պարունակում են ինուլինի զգալի քանակներ: Պարզաբանվել է ինուլինի պարունակության դինամիկան վեգետացիայի ընթացքում, ինչպես նաև հետվեգետացիոն շրջանում:

Առաջին անգամ մեր կողմից մշակված եղանակով խատուտիկի (*Taraxacum officinalis*) արմատներից անջատվել է բուսական ծագում ունեցող բարձր կատալիտիկ ակտիվությամբ օժտված ինուլազ ֆերմենտը: Ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ վերոհիշյալ ֆերմենտը հանդիսանում է էկզո-տիպի ֆերմենտ, որը իր ֆիզիկաքիմիական և կենսաքիմիական առանձնահատկություններով որոշակիորեն տարբերվում է մանրէային ինուլազներից:

Գործնական նշանակությունը: Հայտնաբերվել են ինուլինի զգալի քանակներ պարունակող բույսերի նոր տեսակներ, որոնք կարող են հումք հանդիսանալ ինուլինի ստացման համար՝ հատկապես գետնախնձորի նոր սպիտակ սորտը: Մշակվել է ինուլինի պարզեցված եղանակ, որը կարող է կիրառվել արտադրական գործընթացներում: Խատուտիկի արմատներից անջատված ինուլազը կարող է կիրառվել ինուլինի կենսաձևափոխման և տարբեր արգասիքների ստացման համար:

Աշխատանքի փորձաքննությունը և հրատարակումները: Աշխատանքի արդյունքները քննարկվել են ԵՊՀ կենսաքիմիայի ամբիոնի սեմինարներում, Գորիսի, Գավառի համալսարանների գիտաժողովներում, ինչպես նաև հետևյալ միջազգային գիտաժողովում՝ “Образование, наука и экономика в вузах и школах. Интеграция в международное образовательное пространство” (2014, Ծաղկաձոր, Հայաստան, մարտի 24-29):

Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսությունը բաղկացած է ներածությունից, գրականության ակնարկից, փորձնական մասից, արդյունքների քննարկումից, ամփոփումից, եզրակացություններից: Հիմնական աշխատանքը շարադրված է համակարգչային տեքստի 104 էջերում, պարունակում է 3 աղյուսակ և 12 գծապատկեր:

Հրատարակումները: Հետազոտությունների արդյունքները հրատարակվել են 5 գիտական աշխատանքներում:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱՎՆԱՐԿ

Գրական ակնարկում վերլուծական եղանակով ներկայացված են բուսական բազմաշաքար ինուլինի տարածվածությունը բուսատեսակներում, քիմիական և կենսաբանական առանձնահատկությունները, կիրառման բնագավառները, ինչպես նաև տարբեր արգասիքների՝ ֆրուկտոզի, ֆրուկտոզ-գլուկոզ օշարակի, էթանոլի և այլնի ստացումը: Ներկայացված է նաև ինուլազ ֆերմենտի ուսումնասիրությունների արդի վիճակը և նրա մասնակցությունն ինուլինի կենսաձևափոխման գործընթացներում:

ԳԼՈՒԽ 2

ՆՑՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈՂՆԵՐ

2.1 Հետազոտման օբյեկտը: Հետազոտման օբյեկտներ են հանդիսացել ՀՀ Սյունիքի մարզում տարածված գետնախնձորի (*Helianthus tuberosus*) սպիտակ և կարմիր սորտերը, գեորգինայի (*Dahlia*)-ի պալարները, խատուտիկի (*Taraxacum officinalis*) արմատները, (*Cichorum intybus*) եղերդակը, (*Arctium*) կոստուկը և ծնեբեկը (*Asparagus officinalis* L.): Հետազոտությունները իրականացվել են 2010-2014 թթ ընթացքում:

Գետնախնձորի երկու սորտերն էլ ցանվում են վաղ գարնանը՝ մարտ ամսվա սկզբներին: Երբեմն բույսի վերգետնյա մասերը՝ ցողունը, ծաղիկները հեռացնելուց հետո արմատապալարներն ամբողջ աշնան և ձմռան ամիսներին մնում են հողի տակ, որտեղ նրանք լավ պահպանվում են: Հետազոտություններն իրականացնելու համար գետնախնձորի պալարները հավաքվել են աշնանը, պահպանվել են հողում կամ մանրացվել են, չորացվել և պահպանվել են չոր փոշու տեսքով փակ ապակե տարաներում:

2.2 Ինուլինի և ինուլազ ֆերմենտի պատրաստուկների ստացումը խատուտիկի արմատներից: Հետազոտությունների համար օգտագործվել են մարգագետնային կամ անտառային խատուտիկի (*Taraxacum officinalis*) արմատները: Ինուլինի և ինուլազ ֆերմենտի պատրաստուկները ստացվել են հետևյալ ձևով: Խատուտիկի արմատները լվացվել են, կեղևահանվել և մանրացվել են սանդուղի: Մանրացված զանգվածին ավելացվել է թորած ջուր 2:1 հարաբերությամբ: Նմուշը պահվել է 1.5 ժամ թերմոստատում, որից հետո ավելացվել է 0.15% Ca(OH)₂-ի լուծույթ, միջավայրի pH-ը պահպանելով 7.0-ի սահմաններում: Պատրաստուկը ցենտրիֆուգվել է 5000 պտույտ/րոպե արագությամբ 10 րոպե:

Վերնստվածքը չորացվել է մինչև փոշու վիճակի և օգտագործվել է որպես ինուլինի պատրաստուկ: Այս ձևով այն կարելի է պահել երկար ժամանակ: Ինուլինի պատրաստուկի ստացումը և մաքրումը իրականացվել է հաշվի առնելով գրականության մեջ եղած տվյալները (Парк и др., 2003):

Նստվածքը ենթարկվել է լիոֆիլիզացման 35-45°C ջերմաստիճանում և օգտագործվել որպես ինուլազ ֆերմենտի պատրաստուկ:

2.3. Ինուլինի քանակական որոշումը: Ինուլինի քանակական որոշումը իրականացվել է ըստ Պետրովի (Петров, 1965):

250 մլ տարողությամբ կոլբայի մեջ լցվել է 5գ մանրացված, չորացված բուսական հումք, կատարվել է լուծամզում 80-82% էթիլ սպիրտում (3 անգամ): Այնուհետև լուծամզվածքի վրա լցվել է 200մլ ջուր և 2 ժամ պահվել եռացող ջրային բաղնիքում: Լուծամզվածքը սառեցվել և տեղափոխվել է 250մլ տարողությամբ չափիչ կոլբայի մեջ, որից հետո ավելացվել է թորած ջուր մինչև նշանակետը: Նմուշը լավ խառնվել է և ֆիլտրվել: Ֆիլտրատից 100 մլ տեղափոխվել է հետադարձ սառնարանով փորձանոթի մեջ, որի վրա ավելացվել է 5մլ 10% աղաթթու և տաքացվել եռացող ջրային բաղնիքում: Կատարվել է թթվային հիդրոլիզ 1 ժամ տևողությամբ: Հիդրոլիզի ավարտից հետո խառնուրդը սառեցվել է և չեզոքացվել 10% ալկալու լուծույթով՝ մինչև թույլ թթվային ռեակցիա (рН 4.5): Խառնուրդի պարունակությունը տեղափոխվել է 200 մլ չափիչ կոլբայի մեջ: Ստացված կոլոիդային նյութը նստեցվել է քացախաթթվային կապարով և ավելացվել է ջուր մինչև նիշը: Նստվածքը ֆիլտրվել է և ֆիլտրատի 10 կամ 20 մլ նմուշում որոշվել է շաքարի քանակությունը Կուլտովֆի կոլորիմետրիկ եղանակով:

Ինուլինի քանակությունը (X%) հետազոտվող փորձանմուշում որոշվել է ըստ բերված բանաձևի՝

$$X = \frac{VV_2 a \times 100 \times 0.9}{CV_1 V_3}$$

որտեղ V- լուծամզվածքի սկզբնական ծավալն է (մլ)

V₁- թթվային հիդրոլիզի մասնակցած լուծամզվածքի ծավալն է (մլ):

V₂- քացախաթթվային կապարով կոլոիդային նյութի նստեցումից հետո հիդրոլիզատի ծավալը (մլ)

V₃- շաքարի որոշման համար վերցրած փորձանմուշի ծավալը

C - հետազոտվող նյութի կշիռը (գ-ով)

a - շաքարի քանակությունը

0.9 - ֆրուկտոզի վերահաշվման գործակիցը ինուլինում:

2.4. Ֆրուկտոզի քանակության որոշումը կոլորիմետրիկ եղանակով:

Ֆրուկտոզի քանակը որոշվել է ռեզորցինային մեթոդով (Резяпкии и др. 2009):

2.5. Ինուլինազի ակտիվության որոշումը:

Ինուլինազի ակտիվությունը որոշվել է ագետասային բուֆերում (10մլ, рН 5.5), որը պարունակում է 0.5% ինուլին և 1 մլ ֆերմենտի լուծույթ: Ինկուբացիան իրականացվել է 45°C պայմաններում 30 րոպե: Ակտիվությունը որոշվել է ըստ վերջնական պրոդուկտի՝ ֆրուկտոզի քանակի ռեզորցինային մեթոդով (Резяпкии и др. 2009):

2.6. Սպիտակուցի քանակի որոշումը:

Սպիտակուցի որոշումը կատարվել է Լոուրիի և հեդինակների մեթոդով (Lowry et al., 1951): Սպիտակուցի քանակական որոշման համար որպես

ստանդարտ կոր օգտագործվել է շիճուկային ալբումինի լուծույթների հիման վրա կառուցված կորը:

2.7. Ֆերմենտային պատրաստուկի հեղ-ֆիլտրացիա:

Հեղ-ֆիլտրացիան իրականացվել է Sephadex G-150-ով լցված աշտարակի (2x80 սմ) վրա ավելացնելով 4 մլ ֆերմենտային պատրաստուկ: Հավասարակշռումը և էյուցիան կատարվել են թորած ջրով: Էյուցիոն ծավալը կազմել է 5 մլ, արագությունը 30 մլ/ժամ: Ֆրակցիաները հավաքելուց հետո սպիտակուցի կլանումը չափվել է 280 նմ ալիքի երկարության պայմաններում, և յուրաքանչյուրի մեջ որոշվել է ինուլազի ակտիվությունը ռեզորցինային մեթոդով ըստ Սելիվանովի ռեակցիայի (Резяпкии и др. 2009): Ինուլինազի ստացման մեր կողմից մշակված մեթոդիկան մանրամասն նկարագրված է փորձարարական արդյունքների գլխում:

2.8. Ինուլինազի Km-ի որոշումը:

Km-ի արժեքի որոշումը սուբստրատի նկատմամբ կատարվել է գրաֆիկական եղանակով ըստ Լայնուիվերի և Բերկի (Диксон, Уэбб, 1965):

2.9. Ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածի որոշումը:

Ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածը որոշվել է հեղ-ֆիլտրացման եղանակով, սեֆադեքս G-200 աշտարակի վրա հայտնի մոլեկուլային զանգվածներով սպիտակուցների համար կառուցված էյուցիոն գրաֆիկի հիման վրա:

Փորձարարական տվյալները ենթարկվել են վիճակագրական մշակման Մտյուդենտ-Ֆիշերի եղանակով (Вознесенский, 1969):

Գ.ՈՒՒՅ 3

ՓՈՐՉԱՐԱՐԱԿԱՆ ՄԱՍ

ՉԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ՔՆԱՄԱՐՆԵՐԸ

3.1. Ինուլինի պարունակությունը մի շարք բույսերում:

Օլիգո- և պոլիֆրուկտանները հանդիսանում են ածխաջրերի հիմնական պաշարային ձևերը բարդածաղկավորներին պատկանող մի շարք բույսերում: Նրանցից ամենահայտնիներն են գետնախնձորը, գետրզինան, եղերդակը, խատուտիկը, լոշտակը:

Մեր կողմից ուսումնասիրվել են Սյունիքի մարզում տարածված այն բույսերը, որոնք ըստ գրականության մեջ եղած տվյալների պարունակում են ինուլին (Մատուրյան, Գևորգյան, 2007): Հետազոտություններն իրականացվել են Գորիսի պետական համալսարանի կենսաբանության ամբիոնում, 2005-2012թթ. ընթացքում: Ստացված արդյունքները բերված են աղյուսակ 1-ում.

Բերված տվյալները ցույց են տալիս, որ ինուլինի քանակությունը հետազոտվող բույսերում խիստ տարբեր է: Այսպես, եթե կոստուկի արմատներում այն հասնում է 24%, ըստ նրա թաց քաշի, ապա եղերդակի մոտ՝ 18%, իսկ գետնախնձորի մոտ՝ 20%: Ամենացածր ցուցանիշը, ըստ մեր հետազոտությունների ստացվել է ծնեբեկի մոտ, որը կազմում է 14%:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ հետազոտվող բույսերում տարբեր են գլյուկոզի և ֆրուկտոզի քանակները: Ֆրուկտոզի ամենաբարձր ցուցանիշներ հայտնաբերվել են կռատուկի, եղերդակի, անտառային և դաշտային խատուտիկի տարբերակներում:

Աղյուսակ 1

Ինուլինի, պարզ շաքարների քանակությունը տարբեր բույսերի արմատներում, արմատապալարներում և արմատապտուղներում (n=6, p<0.05)

Բույսեր	Ինուլին, %	Ֆրուկտոզ+գլյուկոզ քանակը, %
Կռատուկ	24	7
Եղերդակ	18	9
Գետնախնձոր	20	14
Խատուտիկ անտառային	16	11
Խատուտիկ դաշտային	18	10
Ծնեբեկ	14	6
Գեորգինա	16	8

Մեր կողմից ստացված արդյունքները համեմատելով գրականության մեջ եղած տվյալների հետ, կարող ենք նշել, որ դրանք համահունչ են մի շարք հեղինակների կողմից ստացված տվյալների հետ (Roberfroïd, 2002, 2005, Холявка, 2010):

Ցույց է տրվել, որ ինուլինի քանակը գետնախնձորի սպիտակ սորտում ավելի բարձր է, ինչից ելնելով մեր հետազոտ հետազոտությունների համար որպես օբյեկտ ընտրվել է սպիտակ սորտը:

Գետնախնձորի պալարներում հայտնաբերվել են նաև հանքային էլեմենտների որոշակի քանակներ:

3.2. Գետնախնձորի պալարներում ինուլինի, գլյուկոզի, ֆրուկտոզի քանակական փոփոխությունները կախված նրանց պահպանման պայմաններից:

Գետնախնձորի պալարները հավաքվել են հոկտեմբերի վերջին կամ նոյեմբերի սկզբին: Պալարները պահպանվել են դաշտում 3 մ երկարությամբ, 1.5-2 մ լայնությամբ և 2-3մ բարձրությամբ դեզերի ձևով, ինչպես նաև նկուղներում (0-+3°C): Նշված ջերմաստիճանային պայմաններում ինուլինի կորուստը հասնում է նվազագույնի: Պահպանման ժամանակ նկատվում է ինուլինի քանակի որոշակի անկում, որը բացատրվում է շնչառության գործընթացներում նրա ծախսով, երբ ինուլինիդրոլազի ազդեցությամբ ինուլինը ճեղքվում է պարզ շաքարների:

Պետք է նշել, որ Գորիսի տաք կլիման նպաստում է պալարներում ինուլինի արագ փոխարկմանը հատկապես նրանց դաշտերում պահպանման ժամանակ: Ինուլինի քանակի փոփոխման դինամիկան նկուղում պահպանման ժամանակ հետազոտելու նպատակով փորձարարական աշխատանքները կատարվել են հոկտեմբերի 20-ից մինչև փետրվարի վերջը (նկ. 1): Ինչպես վկայում են ստացված արդյունքները, ինուլինի քանակությունը պալարներում սկսած նոյեմբեր ամսի վերջերից աստիճանաբար նվազում է մինչև փետրվարի վերջը, հասնելով 10%-ի, որը, հավանաբար, կապված է գետնախնձորի

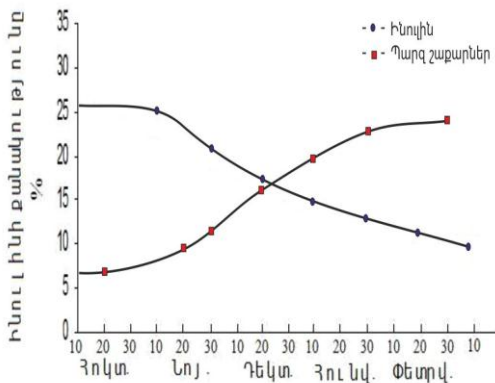
հյուսվածքներում ինտենսիվ ընթացող նյութափոխանակության պրոցեսների հետ: Այսպես, եթե նոյեմբերի սկզբից նյութափոխանակության պրոցեսների վրա ծախսը կազմել է 53.7%, ապա դեկտեմբերից մինչև փետրվար նյութափոխանակության վրա ինուլինի ծախսը կազմել է ընդամենը 25.7%, այսինքն դեկտեմբերից մինչև փետրվարի վերջը նյութափոխանակության վրա ինուլինի ծախսը ավելի քան 2 անգամ բարձր է:

Նշենք, որ գետնախնձորի (*Helianthus tuberosus*) պալարների վերաբերյալ նման ուսումնասիրություններն ունեն նաև կարևոր կիրառական նշանակություն, քանի որ դրանք օգտագործվում են ինուլին ստանալու համար, որն այնուհետև ինչպես նշեցինք սկզբում, հումք է հանդիսանում տարբեր այլ արգասիքների արտադրության համար (Roberfroid, 1998):

Ուսումնասիրվել է նաև գետնախնձորի պալարներում ֆրուկտոզի և գլյուկոզի քանակական փոփոխությունների դինամիկան ըստ ամիսների: Ստացված արդյունքները բերված են նկ.2-ում:

Ամփոփելով ստացված արդյունքները պետք է նշել, որ ինուլինի, ֆրուկտոզի և գլյուկոզի քանակության տատանումները հավանաբար պայմանավորված են նյութափոխանակության պրոցեսների, ինչպես նաև ինուլազի ակտիվության ինտենսիվության փոփոխություններով և դրանում էական դեր են խաղում ջերմաստիճանային պայմանները:

Նկատի ունենալով մեր կողմից հայտնաբերված ինուլինի զգալի քանակներ պարունակող բույսերը, հատկապես գետնախնձորի սպիտակ սորտը, նպատակահարմար ենք գտել մշակել նաև ինուլինի անջատման պարզեցված եղանակը կիրառական նպատակներով:



Նկ. 1. Ինուլինի և պարզ շաքարների քանակի փոփոխման դինամիկան գետնախնձորի պալարներում նրանց պահպանման ընդացքում:

Ինուլինի էքստրակցիան առանձին հետազոտողների կողմից իրականացվել է Էթանոլի 25% լուծույթի միջոցով:

Սակայն նկատի ունենալով ինուլինի բարձր լուծելիությունը ջրում՝ այն օգտագործվում է որպես հիմնական էքստազենտ: Մեր հետազոտություններում օգտագործվել է թորած ջուրը, որի pH-ը եղել է 6.5-7.0: Չնայած ավելի թթվային պայմաններում pH 4.5-5.5 ինուլինի լուծելիությունը ջրում բարձրանում է, սակայն 70°C պայմաններում տեղի է ունենում ինուլինի մասնակի հիդրոլիզ և բացի այդ թթվային միջավայրը նպաստում է պոլիֆենոլօքսիդազ ֆերմենտի ակտիվության բարձրացմանը, որի հետևանքով առաջանում են գունավորված միացություններ և դժվարանում է մաքուր ինուլինի ստացման գործընթացը:

Գետնախնձորի սպիտակ սորտի պալարներից ինուլինի մաքսիմում կորզման նպատակով ուսումնասիրվել են հետևյալ գործոնների ազդեցությունը.

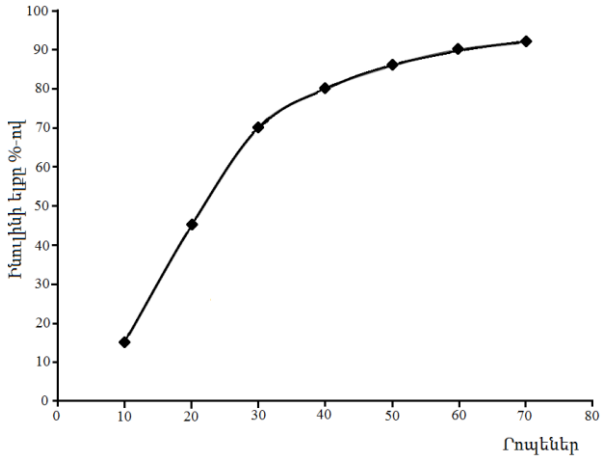
- Ջերմաստիճանի առավել բարենպաստ պայմանները, որոնք ապահովում են ինուլինի դիֆուզիան և լուծելիությունը ջրում:
- Էքստրակցիայի՝ լուծամզման տևողությունը օպտիմալ ջերմաստիճանի պայմաններում:
- Հումքի մանրացման օպտիմալ արժեքներն ինուլինի լիարժեք էքստրակցիայի համար:
- Ջրի և կենսազանգվածի հարաբերությունը՝ հիդրոմոդուլի օպտիմալ արժեքները:

Ջերմաստիճանի ազդեցության ուսումնասիրություններն ինուլինի լուծամզման վրա մինչև 1 մմ մանրացված պալարների ցույց են տվել, որ ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց զգալիորեն բարձրանում է ինուլինի ելքը հասնելով իր մաքսիմումին 60-70°C պայմաններում (նկ. 2): Նշենք, որ գործընթացն իրականացվել է մշտական խառնման պայմաններում:

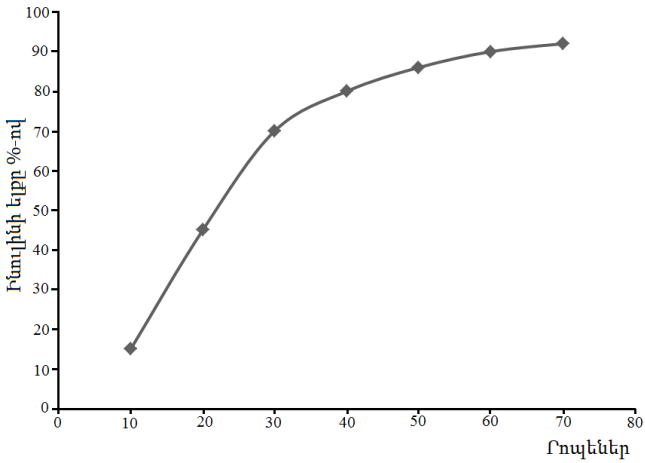
Այնուհետև, ուսումնասիրվել են լուծամզման տևողության ազդեցությունը ինուլինի ելքի վրա օպտիմալ ջերմաստիճաններում: Հետազոտություններից պարզվել է, որ 35-40 րոպեների ընթացքում կենսազանգվածում ինուլինի պարունակության 80-85%-ը էքստրակցվում է, իսկ 60 րոպեի ընթացքում էքստրակցվում է 90-95%-ը (նկ. 3):

Հայտնի է, որ որևէ միացության էքստրակցիայի ավելի մեծ արդյունավետությունը պայմանավորված է էքստրակցող լուծույթի քանակի և կենսազանգվածի հարաբերությամբ՝ հիդրոմոդուլով: Մեր կողմից իրականացված հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ պալարների մանրեցված զանգվածից ինուլինի ստացումն աստիճանաբար աճում է հիդրոմոդուլի բարձրացմանը զուգընթաց և հասնում է իր առավելագույն աստիճանին 2.0-ի դեպքում: Վերջինիս հետագա բարձրացումը էական ազդեցություն չի թողնում էքստրակցիայի գործընթացի վրա (նկ. 4):

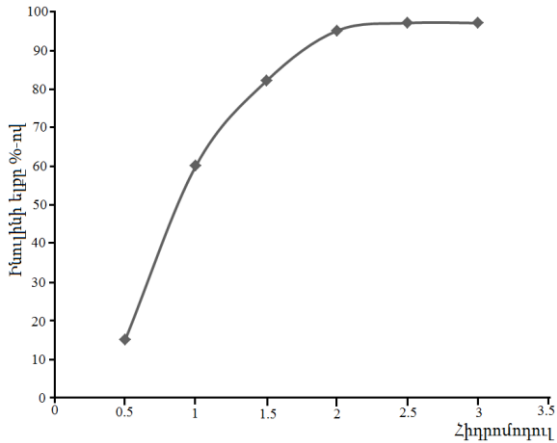
Պալարներից ինուլինի կորզման կարևորագույն գործոններից է նաև նրանց մանրացման աստիճանը: Ցույց է տրվել որ ինուլինի առավելագույն ելքը ստացվում է պալարների 0.5-1 մմ մանրացման պայմաններում: Կենսազանգվածի առավել մանր մասնիկների դեպքում դժվարանում է ինուլինի դիֆուզիան միջավայրի մածուցիկության բարձրացման հետևանքով և որի պատճառով պահանջվում է հիդրոմոդուլի բարձրացում: Վերջինս իր հերթին ցանկալի չէ հետագա գործընթացների առումով, ինչպես նաև տնտեսապես:



Չկ. 2. Չերմաստիճանի ազդեցությունը ինուլինի ելքի վրա:

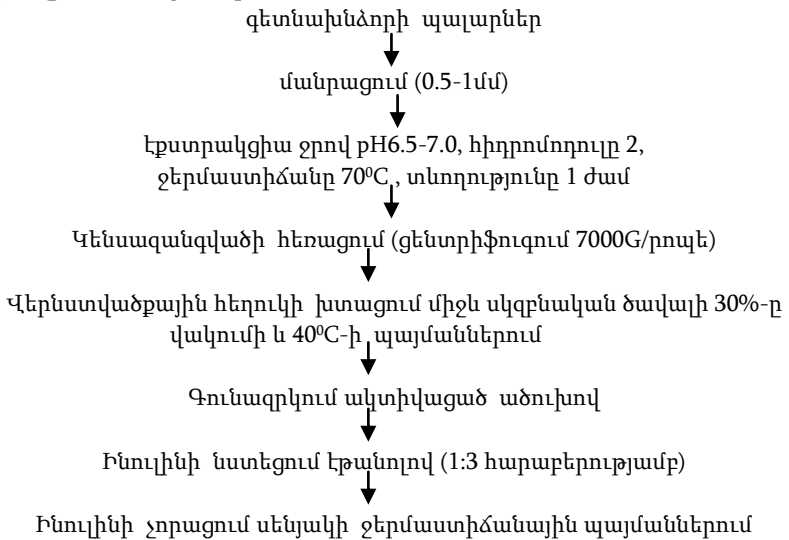


Չկ. 3. Էքստրակցիայի տևողության ազդեցությունը ինուլինի ելքի վրա:



Նկ. 4. Հիդրոնոդուլի ազդեցությունը ինուլինի ելքի վրա:

Այսպիսով, իրականացված հետազոտությունների հիման վրա մշակվել է ինուլինի անջատման եղանակ



Իրականացված հետազոտությունների արդյունքում հայտնաբերվել է ինուլինի և պարզ շաքարների բարձր պարունակությամբ գետնախնձորի նոր սորտ, որը հեռանկարային է կենսաէթանոլի, ֆրուկտոզի, ֆրուկտոզ-գլուկոզային օշարակի և այլ վերոհիշյալ արգասիքների ստացման համար:

3.3. Ինուլինազ ֆերմենտի անջատումը խատուտիկից (*Taraxacum officinale* Wigg) և նրա ֆիզիկաքիմիական և կինետիկական հատկությունները:

Ինուլինազների նկատմամբ աճող հետաքրքրությունը պայմանավորված է նրանց կարևոր նշանակությամբ ինուլինի առաջնային կենսաձևափոխման համար:

Հայտնի է, որ ինուլազ (EC 3.2.1.7 – 2,1-β – D-ֆրուկտան – ֆրուկտանոհիդրոլազ) ֆերմենտը շատ տարածված է բորբոսասանկերի, խմորասնկերի, միկոթորգանիզմների տարբեր խմբերի ներկայացուցիչների մոտ: Այդ օբյեկտներից է մեծամասամբ անջատվել, մաքրվել և բնութագրվել ֆերմենտը: Նկարագրված են ֆերմենտի 2 մոլեկուլային ձևեր (Vandame and Derycke, 1983; Viswanathan and Kulkarni, 1995):

Սակայն գրեթե ուսումնասիրված չեն բուսական ծագում ունեցող ինուլազները (Park and Yun, 2006):

Մեր կողմից առաջին անգամ հետազոտություններ են իրականացվել խատուտիկի (*Taraxacum officinale* Wigg) ինուլազի առանձնահատկությունների ուսումնասիրման նպատակով:

3.3.1. Ինուլազ ֆերմենտի անջատումը և մաքրումը:

Ֆերմենտի անջատման և ուսումնասիրման համար կեղևի հեռացումից հետո խատուտիկի արմատները մանրացվել են հումդենիզատորում և այնուհետև ֆերմենտը էքստրակցվել է թորած ջրով 1:2 հարաբերությամբ: Հումդենատը ցենտրիֆուգվել է 7000 g/10 րոպե 2-4°C ջերմաստիճանի պայմաններում կենսազանգվածի հեռացման նպատակով:

Այնուհետև վերնստվածքային լուծույթից կլանվել են թթվային բնույթի սպիտակուցները այդ թվում ինուլազը DEAE-ToyoPerl 650 M ադսորբենտի միջոցով: Ինուլազը վերադսորբացվել է 1 M KCl-ի լուծույթով: Ֆերմենտի հետագա մաքրումն իրականացվել է աշտարակային (2 x 80 սմ) հել ֆիլտրացիայի եղանակով, սկզբում Sephadex G-150-ի միջոցով, այնուհետև ինուլազ պարունակող ֆրակցիաները միացվել և խտացվել են դարձյալ DEAE-ToyoPerl 650 M ադսորբենտի փոքր աշտարակի (5x3 սմ) միջոցով: Էլյուցիան իրականացվել է 8մլ 1 M KCl-ի լուծույթով: Այնուհետև ֆերմենտը մաքրվել է աշտարակային (2 x 60 սմ) հել ֆիլտրացիայի եղանակով, Sephadex G-200-ի միջոցով: Համաձայն ստացված տվյալների ինուլազ ֆերմենտի ակտիվությունը հայտնաբերված է 9-17 ֆրակցիաներում նկ5:

Նշենք, որ պոլիակրիլամիդային հել էլեկտրոֆորեզի տվյալներ (նկ. 5) ցույց են տվել, որ վերոհիշյալ եղանակն ապահովում է ֆերմենտի հումդեն պատրաստուկի ստացումը:

Խատուտիկի արմատներից ինուլազի անջատման մեթոդիկան համառոտ ներկայացված է ներքոհիշյալ սխեմայում.

Արմատների մանրացում հոմոգենիզատորում և ֆերմենտի տարրալուծում ջրում (1:2) հարաբերությամբ

↓
 Կենսազանգվածի հեռացում ցենտրիֆուգման (7000g/10 րոպե) միջոցով

↓
 Վերնստվածքային լուծույթից ֆերմենտի նախնական կլանում DEAE-ToyoPer1 650 M ադսորբենտի 5x3սմ աշտարակի միջոցով

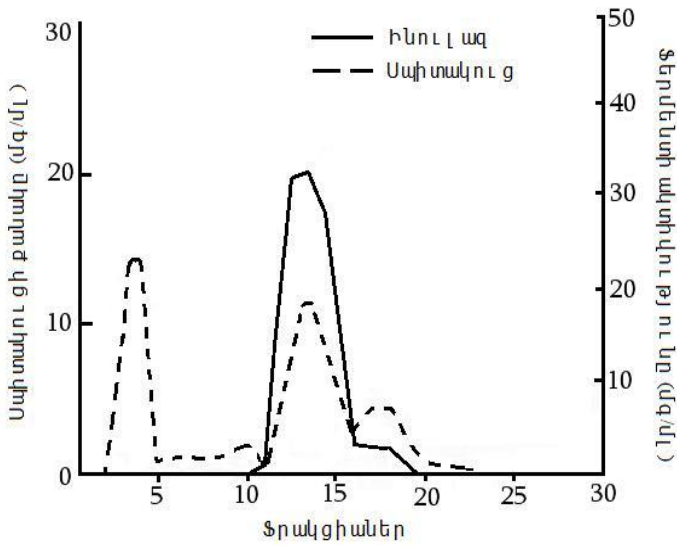
↓
 Ֆերմենտի վերադարձրեցիա 1M KCL-ի լուծույթով

↓
 Ֆերմենտի մաքրում SephadexG-150 աշտարակային (2 x 80 սմ) հել ֆիլտրացիայի եղանակով

↓
 Ինուլազ պարունակող ֆրակցիաների խտացում

↓
 Ֆերմենտի մաքրում SephadexG-200-ի աշտարակային (2 x 80 սմ) հել ֆիլտրացիայի եղանակով

↓
 Պոլիակրիլամիդային հել էլեկտրոֆորեզ



Նկ. 5. Ինուլինազի հել քրոմատոգրաֆիան Sephadex G -200-ի միջոցով:



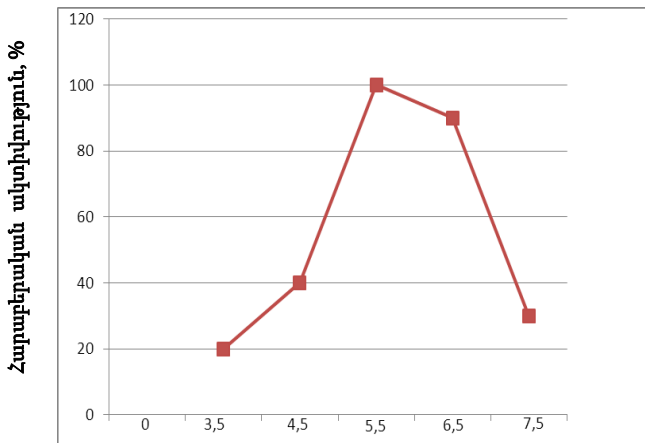
Նկ. 6. Ինուլինազի հել էլեկտրոֆորեզ:

Նշենք, որ մեր կողմից մշակված մեթոդիկան հնարավորություն է ընձեռում կոատուկից ֆերմենտի հոմոգեն պատրաստուկի ստացման համար (նկ. 5):

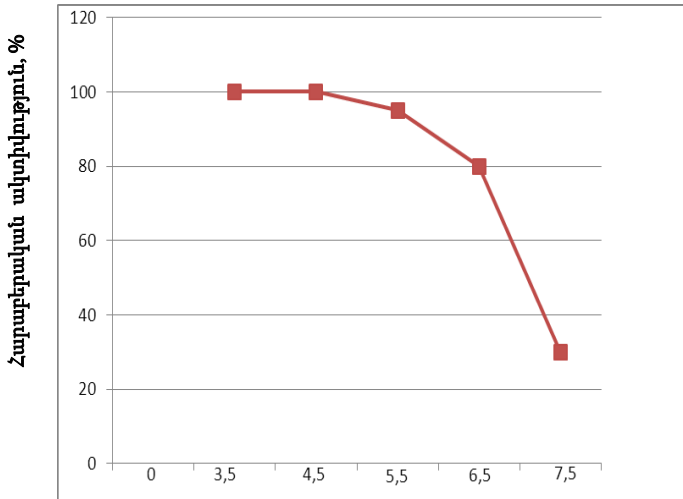
3.3.2. Միջավայրի pH-ի ազդեցությունը խատուտիկի արմատների ինուլազի ակտիվության վրա:

Ուսումնասիրվել է անջատված ինուլազի ակտիվության կախվածությունը միջավայրի pH-ից:

Ինչպես երևում է նկ. 7-ից, ինուլազի առավելագույն ակտիվությունը հայտնաբերվում է pH 5.8-6.2:



Նկ. 7. Միջավայրի pH-ի ազդեցությունը ինուլազի ակտիվության վրա:



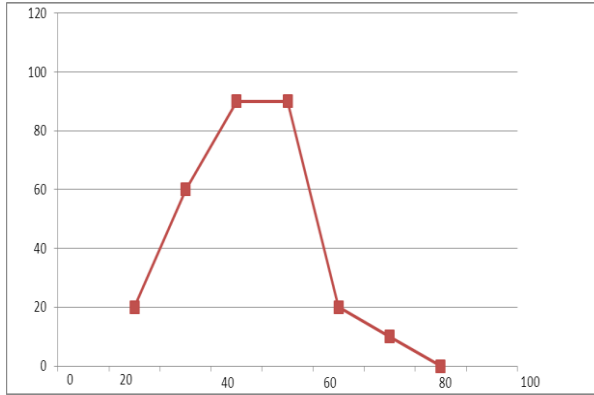
Նկ. 8. Ինուլազի pH կայունությունը:

Ուսումնասիրվել է նաև ինուլինազի pH-կայունությունը: Ցույց է տրվել, որ վերոհիշյալ ֆերմենտը կայուն է մինչև pH-ի 7.5-8.0-ի սահմաններում (նկ. 8):

3.3.3. Խստուտիկի ինուլազի ակտիվության կախվածությունը ջերմաստիճանից:

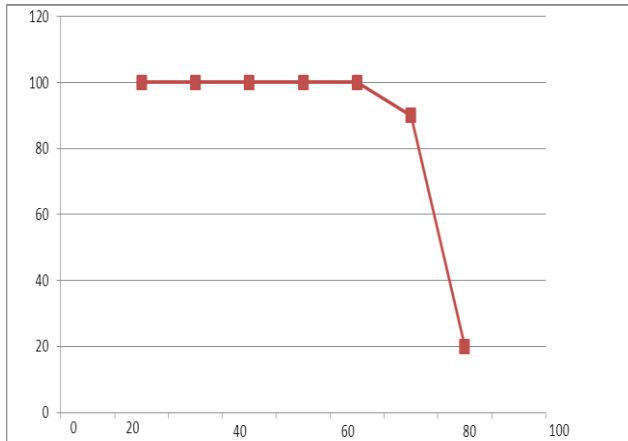
Փորձերի հաջորդ փուլում մեր կողմից ուսումնասիրվել է ջերմաստիճանի ազդեցությունը խստուտիկի արմատներից ստացված ինուլազի ակտիվության վրա: Ստացված արդյունքները ներկայացված են նկ-8 ում, որտեղից երևում է, որ խստուտիկի արմատներից անջատված ինուլազի օպտիմալ ակտիվությունը դրսևորվել է 45°C-ում: Ստացված տվյալների վերլուծությունը վկայում է այն մասին, որ մեր կողմից հետազոտված բուսական ինուլազը օժտված է որոշակի ջերմակայունությամբ: Մինչև 60°C ջերմաստիճանի բարձրացումը չի բերել ֆերմենտի կտրուկ ինակտիվացմանը: Ելնելով մեր ստացված արդյունքներից կարելի է ասել, որ բուսական հումքից ստացված հետազոտվող ֆերմենտը իր առավելագույն կայունությունը դրսևորել է pH=5.8-6.2 տիրույթում և 45°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Հարաբերական ակտիվություն, %



Նկ. 9. Ջերմաստիճանի ազդեցությունը ինուլազի ակտիվության վրա:

Հարաբերական ակտիվություն, %



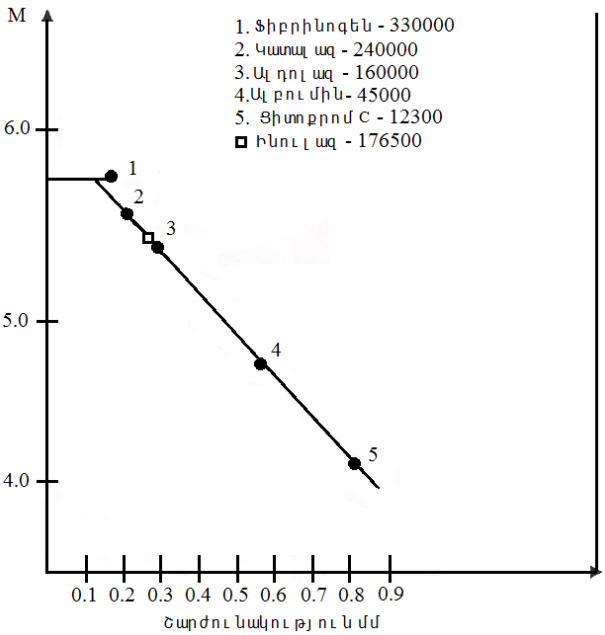
Նկ. 10. Ինուլազի ջերմակայունությունը:

3.3.4. Խատուտիկի ինուլազի մոլեկուլային զանգվածը:

Ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածը որոշվել է հել-ֆիլտրացիոն եղանակով (սեֆադեքս G-200): Որպես մարկերային սպիտակուցներ օգտագործվել են հայտնի մոլեկուլային զանգվածներով հետևյալ սպիտակուցները՝ ֆիբրինոգեն (330 000 Դա), կատալազ (240 000 Դա), ալդոլազ (160 000 Դա), ալբումին (45 000 Դա), և ցիտոքրոմ C (12 300 Դա): Արդյունքները ներկայացված են նկ. 11-ում:

Հել-ֆիլտրացիան կատարվել է Sephadex G -200-ով լցված աշտարակով (2 x 80 սմ): Հավասարակշռումը և էլյուցիան կատարվել են թորած ջրով, արագությունը՝ 30 մլ/ժամ:

Համաձայն ստացված տվյալների խատուտիկի արմատներից ստացված ինուինազ ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածը կազմում է 176500 Դա:

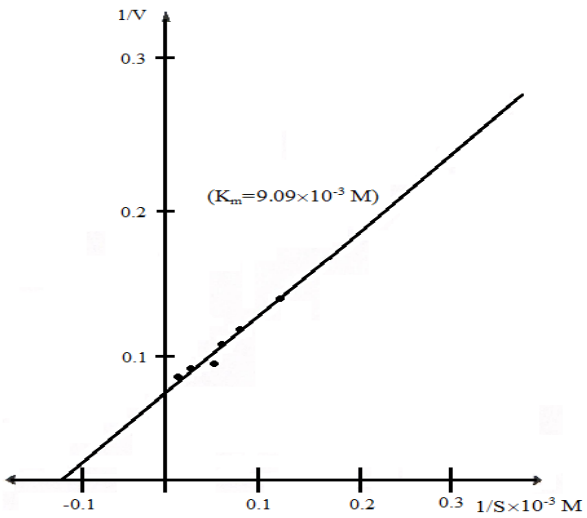


Նկ. 11. Ինուլինազ ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածի որոշումը:

3.3.5 Խատուտիկի ինուլազի Միքաելիսի հաստատունի որոշումը:

Ուսումնասիրվել է սուբստրատի խտության ազդեցությունը հետազոտվող ֆերմենտի ակտիվության վրա: Հետազոտությունները կատարվել են Լայնուիվեր-Բերկի գրաֆիկական եղանակով (Диксон, Уэбб, 1966), որի համաձայն որոշվել են K_m -ի արժեքները (նկ12):

Համաձայն ստացված արդյունքների խատուտիկի ինուլազ ֆերմենտի համար Միքաելիսի հաստատունը սուբստրատի նկատմամբ կազմում է $9.09 \cdot 10^{-3}$ M: Հիմնվելով մեր կողմից պարզաբանված կինետիկական պարամետրերի վրա, կարելի է նշել, որ խատուտիկի արմատների ինուլազ ֆերմենտն ունի բավականին բարձր խնամակցություն ինուլինի նկատմամբ:



Նկ. 12. Լայնուիվեր-Բերկի կորը խատուտիկի ինուլազ ֆերմենտի համար:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. ՀՀ Սյունիքի մարզի բնակլիմայական պայմաններում աճող բարդաձաղկավորների ընտանիքին պատկանող բույսերի ուսումնասիրությունների արդյունքում հայտնաբերվել են մի շարք տեսակներ կռատուկ, խատուտիկ, գետնախնձոր, գեորգինա և այլն, որոնք պարունակում են ինուլինի զգալի քանակներ (20-24%) և կարող են հանդիսանալ ինուլին պարունակող նոր հեռանկարային բույսեր:
2. Մշակվել է պարզեցված, արդյունավետ եղանակ պալարներից ինուլինի անջատման համար, որը կարող է կիրառվել գործնականում ինուլինի ստացման համար:
3. Գետնախնձորի պալարներում ինուլինի սինթեզի և ձևափոխումների դինամիկայի հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ ինուլինի առավելագույն քանակը պալարներում հայտնաբերվում է նոյեմբերի առաջին տասնամյակում, որից հետո նկատվում է ինուլինի քանակի աստիճանաբար նվազում: Ուստի կիրառական նպատակների համար առավել արդյունավետ է օգտագործել պալարնրը ոչ ուշ նոյեմբեր ամսից:
4. Առաջին անգամ խատուտիկի արմատներից անջատվել է ինուլազ ֆերմենտը, կիրառելով մեր կողմից մշակված մեթոդը, որը ներառում է արսոբցիոն քրոմատոգրաֆիայի, հել-ֆիլտրացիայի և այլ ժամանակակից մոտեցումներ:
5. Խատուտիկի արմատներից անջատված ինուլազի ֆիզիկաքիմիական և կենսաբանական առանձնահատկությունների մոլեկուլի զանգված (176 կԴա), կատալիտիկ ակտիվության օպտիմալ պարմաններ (pH6.2 և 45°C) և այլ ուսումնասիրությունների արդյունքներից կարելի է եզրահանգել, որ հետազոտվող բուսական ինուլազն իր որոշ առանձնահատկություններով տարբերվում է հայտնի խմորասնկային և բակտերիաների համապատասխան ֆերմենտներից:

Ատենախոսության թեմայով հրապարակված աշխատանքների ցանկ

1. Բաղդասարյան Գ.Ե. Ինուլինի ստացման տեխնոլոգիական գործընթացների մաթեմատիկական մոդելավորումը: Труды междунар. Науч. Конф. “Образование, наука и экономика в вузах и школах. Интеграция в международное образовательное пространство”, 2014, Цахкадзор, Армения, 24-29 марта, с. 147-151.
2. Բաղդասարյան Գ.Ե., Բաղդասարյան Ե.Գ., Թելունց Ա.Գ. Ինուլինի ստացումը տարբեր բույսերից: Գալ.պետ.համալսարանի միջազգային գիտաժողով: Երևան, Իրավունք, 2012, հ.14, էջ 87-91:
3. Baghdasaryan G.Y., Baghdasaryan Y.G. Inulin content in different plants and obtaining endoinulase enzyme from dandelion. *Biolog. J. of Armenia*, 4(66), 2014, p. 80-84.
4. Baghdasaryan G.Y. New mode of endoinulase (EC 3.2.1.7) purification. *Proceedings of YSU*, N3, 2014, p. 58-61.
5. Baghdasaryan G.Y. Study of some properties of endoinulase enzyme of dapple. *Biolog. J. of Armenia*, 1(67), 2015, p. 40-44.

БАГДАСАРЯН ГРИГОР ЕРВАНДОВИЧ

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТА ИНУЛАЗЫ ИЗ КОРНЕЙ ОДУВАНЧИКА *Taraxacum officinale Wigg* И ЕГО НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова. Инулин, одуванчик, эндоинулаза, pH и температурный оптимумы, кислотный гидролиз, ферментативный гидролиз

Известно, что растительный полисахарид инулин, содержащий 97% фруктозы и 3% глюкозы является весьма ценным соединением для лечения и предотвращения различных заболеваний, таких как диабет, кариес, различные заболевания желудочно-кишечного тракта, а также исходным сырьем для получения фруктозы, фруктозо-глюкозного сиропа, циклофруктанов, этанола, олигофруктанов и других соединений. В настоящее время показано распространение инулина в основном среди представителей семейства сложноцветных и других растений. В практике инулин выделяется в основном из клубней артишока (*Heliantus tuberosus*) и цикория.

В мире ежегодно производится около 100 тысяч тонн инулина и одновременно нарастает потребность в нем. Очевидно, что поиск новых, богатых инулином видов растений является весьма актуальной задачей.

Биоконверсия инулина и производство указанных соединений осуществляется с помощью фермента инулиназы. Продуцентами инулиназы в основном являются микроорганизмы: микроскопические грибы, дрожжи и бактерии. Из многих микроорганизмов выделены и изучены физико-химические свойства инулазы. Наиболее активные ферменты, в частности из дрожжей, применяются в производстве этанола, фруктозо-глюкозного сиропа. Однако растения, как источник инулазы, почти не исследованы. Выявление растений, содержащих инулазу и исследование ее свойств интересно не только для выяснения фундаментальных аспектов энзимологии, но и перспективного их использования в практике.

Нами проводились исследования по выявлению новых, инулин содержащих видов растений, широко произрастающих в Сьюникской области. Были обнаружены ряд растений, содержащих инулин в различных количествах. Наибольшее количество инулина (25-27%) обнаружено у лопуха и двух сортов топинамбура. Изучена динамика изменения количества инулина в клубнях белого сорта топинамбура в процессе вегетации и после вегетационного периода, а также при хранении в полевых условиях и специальных помещениях с пониженной температурой (+1-3⁰C). Показано, что максимальное количество инулина в клубнях обнаруживается в конце октября и в ноябре. С конца ноября начинается постепенное снижение количества инулина и в начале марта оно составляет 5-7%. Одновременно увеличивается содержание простых сахаров: фруктозы и глюкозы, что связано с процессами дыхания и частичным гидролизом инулина. С целью разработки несложного метода выделения инулина были исследованы влияние температуры, степень измельчения клубней и гидромодуль. Показано, что наибольший выход инулина (95-97%) имеет место при 70⁰C, pH 6,5-7,0; измельчение до 0,5-1 мм и гидромодуле 2,0. Разработана методика выделения инулина, суть которого сводится к экстракции инулина в

указанных условиях, дальнейшее обесцвечивание активированным углем, концентрирование раствора до 30% от начального объема, осаждение этанолом (1:2) и высушивание при комнатной температуре. Впервые проводились исследования по выделению и изучению свойств инулазы из одуванчика. Разработана методика выделения гомогенного препарата инулазы, с применением адсорбционной и гель хроматографии. Изучены физико-химические, биологические и кинетические свойства фермента, влияние температуры, температурной устойчивости, pH и pH-устойчивости, показали, что оптимальными являются pH -6,2; t- 45 °С. С повышением температуры и pH, фермент теряет активность. Фермент устойчив до 60 °С и pH-7,5-8,0. Молекулярная масса составляет 176 кдал. Обладает высокой степенью сродства с инулином. Исследования показали, что по ряду показателей растительная инулаза заметно отличается от таковых микробного происхождения. Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены новые перспективные растения, содержащие значительные количества инулина и инулазу.

BAGHDASARYAN GRIGOR

OBTAINING OF INULASE ENZYME FROM *Taraxacum officinale* Wigg DANDELION ROOTS AND SOME OF ITS PHYSICAL-CHEMICAL AND KINETIC PROPERTIES

SUMMARY

Key words: Inulin, dandelion, endoinulase, pH and temperature optimums, acidic hydrolysis, enzymatic hydrolysis

It is known that plant polysaccharide inulin, consisting of 97% fructose and 3% glucose is highly valuable compound for both healing and preventing of different diseases such as diabetes, caries, various disorders of gastrointestinal tract, as well as it may serve as a raw material for receiving of fructose, fructose-glucose syrup, cyclofructanes, ethanol, oligofructanes etc. Nowadays it has been shown spread of inulin mainly among representatives of families of Compositae and other herbs. In practice inulin is mainly released from artichokes (*Helianthus tuberosus*) and chicory.

An almost 100 thousands tone of inulin is annually produced all over the world and simultaneously its necessity enhances. It is obvious that search of new, inulin-rich species of plants is quite actual topic.

Bioconversion of inulin and production of the mentioned compounds are realized via inulase enzyme. Microorganisms are the main inulase producing objects: microscopic fungi, yeasts and bacteria. Inulase is released from many microorganisms and their physico-chemical properties are studied. More active enzymes, particularly obtained from yeasts, are applied in production of ethanol and fructose-glucose syrup. Moreover, plants as a source of inulase are scarcely studied. Revelation of plants containing inulase and study of their properties are interesting not only for finding out of enzymology aspects but also for their perspective application in practice.

We have carried out studies on revelation of new, inulin-containing species of plants, widely germinating in Syunik region. Number of plants were revealed containing inulin in different quantities. The highest quantity (25-27%) was revealed in burdock and two sorts of artichokes. Dynamics of inulin quantity change in white sort of artichoke tubers was studied during vegetation period and after it, as well as at preservation in field conditions and special chambers with low temperature (+1-3°C). It was shown that the maximal quantity of inulin in tubers was revealed on the end of October and November. From the end of November a gradual decreasing of inulin amount starts and in the beginning of March it composes 5-7%. Simultaneously the content of simple sugars enhances: fructose and glucose, which is connected to breathing processes and partial hydrolysis of inulin. To treat non-complicate method to release inulin, temperature effect, tuber grinding degree and hydro-module were studied. It was shown that the highest yield of inulin (95-97%) takes place at 70°C, pH 6.5-7.0, grinding up to 0.5-1 mm and hydro-module of 2.0. The method of inulin releasing was treated which refers to inulin extraction in the mentioned conditions, further decolorization by activated carbon, concentration of solution by 30% compared to initial volume, sedimentation by ethanol (1:2) and draining at room temperature. The study on both releasing from dandelion and inulase properties was carried out at the first time. The method of homogeneous preparation of inulin releasing was worked out applying absorption and gel- chromatography. Physical-chemical, biological and kinetic properties, as well as temperature effect, temperature stability, pH and pH-stability of enzyme were investigated.

It was shown that the optimal pH value is 6.2; $t=45^{\circ}\text{C}$. With increasing of temperature and pH the enzyme loses its activity. The enzyme is stable until 60°C and at pH 7.5-8.0; molecular mass is equal to 176 kcal; it possesses high degree of affinity to inulin. The studies showed that by number of criteria inulase significantly differs from those of microbial origin. Thus, as a result of carried studies new perspective plants are revealed containing relevant quantities of inulin and inulase.