

УДК 575.222.7:581.1

Н. Матвєєва, канд. біол. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук,
О. Кваско, інж.

БІОСИНТЕЗ ПРЕБІОТИКА ІНУЛІНУ В РОСЛИНАХ ЦИКОРІЮ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Визначено умови культивування *in vitro* цикорію *Cichorium intybus* L., які сприяють впливають як концентрація збільшенню маси коренів і підвищенню концентрації в них інуліну. Показано, що на ріст кореневої системи цикорію та вміст інуліну впливають як концентрація мікроелементів, так і присутність індолілмасляної кислоти. Зменшення концентрації мікроелементів і додавання ІМК приводило до значного збільшення питомого вмісту інуліну в коренях цикорію (до 92 мг/г сухої маси), що у 5 разів перевищує вміст інуліну при культивуванні рослин на середовищі MS.

The *in vitro* conditions which results in increase of roots weight and concentration of inulin in *Cichorium intybus* L. were investigated. On the MS medium with the reduced concentration of macroelements and 0,5 mg/l indolilbutiric acid inulin concentration in roots were 92 mg/g (dry weight), on the MS medium – 17 mg/g.

Вступ. Інунін належить до фруктанів, основою яких є трисахарид ізокестоза. Це запасний полісахарид, що синтезується мікроорганізмами [1], а також цілим рядом рослин, в тому числі, родини Asteraceae (*Cichorium intybus*, *Helianthus tuberosus*) [2]. Молекула інуліну (C₆H₁₀O₅)_n містить залишки фруктози, з'єднані між собою β-1, 2-глюкозидними зв'язками, та термінальну молекулу глюкози [3]. Інунін є сировиною для промисловості, наприклад, для одержання фруктози, спирту, а також технологічним інгредієнтом у виробництві харчових продуктів (йогуртів, морозива).

Завдяки своїм лікарським властивостям інунін застосовується у медичній практиці. Він виконує функцію сорбенту, зв'язуючи та виводячи з організму токсичні речовини. Ця сполука є пребіотиком, тобто сприяє росту корисної кишкової мікрофлори, зокрема, лакто- і біфідобактерій [4, 5]. Фруктани, в тому числі інунін, використовують як дієтичну добавку при порушеннях вуглеводного обміну, а також як лікувальний засіб при дисбактеріозах, діабеті, серцево-судинних захворюваннях [6]. Інунін є повноцінним замінником глюкози, позитивно впливаючи на обмін речовин. Сполука має гіпоглікемізуючий ефект, знижуючи рівень цукру, суттєво знижує вміст холестерину та тригліцеридів в крові хворих на діабет [7]. Інунін може застосовуватися як допоміжний засіб при лікуванні деяких форм онкологічних захворювань [8-10]. Вживання інуліну сприяє нормалізації обміну кальцію та магнію [11], а також ліпідів [12-14]. Завдяки останній властивості інунін використовують як дієтичну харчову добавку у раціоні хворих зі збільшеною вагою.

Інунін накопичується в коренях цикорію, причому кількість його може становити 15-20% і більше сирої ваги [15]. Показано, що в культурі *in vitro* також відбувається синтез інуліну. Так, для сорту цикорію Lucknow Local визначено, що при вирощуванні *in vitro* концентрація інуліну в коренях може удвічі перевищувати концентрацію *in vivo* [16].

Оскільки відомо, що *in vitro* ріст кореневої системи цикорію регулюється складом живильного середовища та наявністю/концентрацією регуляторів росту [17], становить інтерес вивчення впливу складу середовища на синтез запасного полісахариду інуліну в рослинах цикорію та порівняння вмісту інуліну у коренях та листках.

Матеріали й методи. Як вихідний матеріал використовували насіння цикорію *C. intybus* сорту Пала росса. Насіння стерилізували протягом 1 хв. в 70%-ном етанолі, 10 хв. в 25%-ному розчині препарату "Білізна", тричі по 10 хв. промивали дистильованою водою та пророщували на агаризованому безгормональному середовищі Мура-сиге і Скуга (MS) [18] у темряві при температурі 26°C.

У 12-денних проростків відділяли корені та культивували на агаризованих середовищах MS, MS із вдвічі зменшеною концентрацією макроелементів (1/2MS) і на тих же середовищах з додаванням 0,5 мг/л індолілмасляної кислоти (MS-ІМК і 1/2 MS-ІМК).

Вміст інуліну визначали за методикою, основою на здатності кетосахарів забарвлюватися резорцином у кислому середовищі [19]. Через 45 діб корені та листки висушували при 100°C протягом 10 хв., досушували при кімнатній температурі. До 100 мг сухого матеріалу додавали 5 мл дистильованої води. Потім до 5 мл пробі додавали 5 мл 0,1% спиртового розчину резорцину та 5 мл концентрованої соляної кислоти, нагрівали на водяній бані 20 хв. Після цього розчину охолоджували та вимірювали інтенсивність забарвлення на ФЕК (КФК-2) із зеленим світлофільтром (540 нм). Концентрацію інуліну визначали за калібрувальною прямою (калібрування по фруктозі).

Результати і обговорення.

Відомо, що інунін синтезується не тільки в рослинах, що ростуть у природних умовах у ґрунті, але також і в умовах стерильної культури, як у калюсних тканинах, так і в листках та коренях рослин [16, 20]. Склад живильного середовища суттєво впливає на ріст надземної частини та кореневої системи рослин у стерильній культурі. Факторами, які впливають на цей процес, являються концентрація макро- і мікроелементів, присутність і концентрація регуляторів росту. Останні, зокрема, ауксини, можуть у значній мірі прискорювати ріст коренів у культурі *in vitro*, а також збільшувати масу кореневої системи.

Нами показано, що зменшення концентрації макроелементів удвічі (1/2MS) призводить до збільшення через 45 діб маси кореневої системи в 2,12 рази. Додавання індолілмасляної кислоти до середовища MS збільшує масу коренів в 2,15 рази. Найбільша маса кореневої системи (в 3 рази більше, ніж на середовищі MS) спостерігалася при культивуванні цикорію на середовищі зі зменшеним удвічі концентрацією макроелементів та 0,5 мг/л ІМК.

Порівнянні вмісту інуліну у коренях та листках в культурі *in vitro* показує, що на середовищі MS синтез інуліну більш активно здійснюється саме у листках (рис. 1). Зменшення концентрації макроелементів (середовище 1/2 MS) призводить до збільшення вмісту інуліну у коренях та зменшення у листках. Додавання до живильного середовища ІМК має аналогічний ефект. Найбільша концентрація інуліну в листках (у середньому 45 мг/г сухої маси) спостерігалася при рості рослин на середовищах MS та MS-0,5 ІМК, найменша (15 мг/г) – на середовищі 1/2 MS-0,5 ІМК.

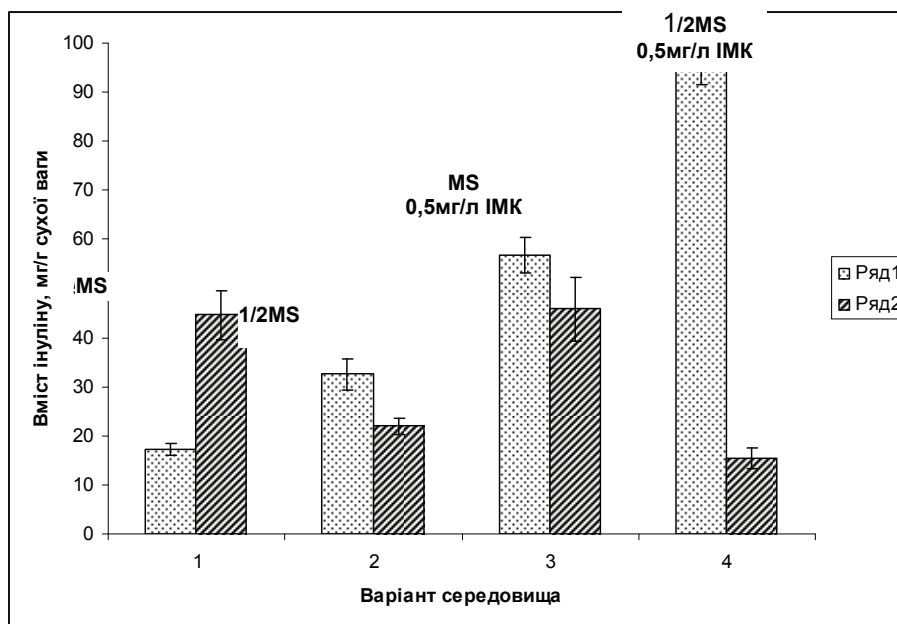


Рис. Залежність вмісту інуліну у коренях (ряд 1) та листках (ряд 2) цикорію від складу живильного середовища

У коренях максимальний вміст інуліну спостерігався при рості рослин на середовищі 1/2MS-0,5ІМК, мінімальний – на середовищі MS. Зменшення вдвічі концентрації макроелементів і додавання до середовища 0,5 мг/л ІМК сприяло значному (більш ніж в 5 разів) збільшенню накопичення інуліну в коренях цикорію, концентрація якого при оптимальному складі середовища склала 92 мг/г сухої маси коренів. Очевидно, що значне збільшення вмісту інуліну у коренях на середовищі 1/2 MS-0,5 ІМК корелює зі збільшенням маси кореневої системи. Однак, такий результат, очевидно, обумовлений не тільки більшою масою коренів, оскільки спостерігалось збільшення саме відносного змісту інуліну в перерахуванні на 1 г сухої маси коренів.

Висновки. Визначено умови культивування *in vitro* цикорію *Cichorium intybus* L., які сприяють збільшенню маси коренів і підвищенню концентрації в них інуліну. На ріст кореневої системи цикорію в культурі *in vitro* впливають як концентрація макроелементів, так і присутність індолілмасляної кислоти. На середовищі MS зі зменшеним змістом макроелементів і 0,5 мг/л ІМК маса кореневої системи в 3 рази перевищувала масу коренів, які утворювалися на середовищі MS. Концентрація інуліну у листках цикорію (до 45 мг/г) виявилася меншою, ніж у коренях. Зменшення концентрації макроелементів і додавання ІМК приводило до значного збільшення питомого вмісту інуліну в коренях цикорію. Цей показник становив 92 мг/г сухої маси коренів, що майже в 5 разів перевищує вміст інуліну, що спостерігався при культивуванні рослин на середовищі MS.

1. Van Balken J.A.M., Van Dooren J.G.M., Van den Tweel W.J.J. et al. Production of 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1-fructosyltransferase // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1991. – Vol. 35, № 2. – P. 216-221. 2. Baert J.R.A., Van Bockstaele E.J. Cultivation and breeding of root chicory for inulin production // *Industrial Crops and Products.* – 1992. – Vol.1, № 2-4. – P. 229-234. 3. Van den Ende, Michiels W., A., De Roover J., Van Laere A. Fructan biosynthetic and breakdown

enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of functional genes throughout chicory development. // *Sci. World J.* – 2002. – vol. 11 № 2. – P. 1273–1287. 4. Kelly G. Inulin-type prebiotics-a review: part 1 // *Altern. Med. Rev.* – 2008. – vol. 13, № 4. – P. 315-329. 5. Özer D., Akin S., Özer B. Effect of Inulin and Lactulose on Survival of *Lactobacillus Acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium Bifidum* BB-02 in *Acidophilus-Bifidus* Yoghurt // *Food Sci. and Technol. International.* – 2005. – vol. 11, № 1. –P. 19-24. 6. Roberfroid M.B. Introducing inulin-type fructans // *Br. J. Nutr.* – 2005. – Vol.93, № 1. – P.13-25. 7. Kaur N., Gupta A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition // *J. Biosci.* – 2002. – Vol. 27, № 7. – P. 703–714.8. Pool-Zobel B. L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data // *British J. of Nutr.* – 2005. – Vol. 93, № 1. – P. 73–90. 9. Taper H.S., Lemort C., Roberfroid M.B. Inhibition effect of dietary inulin and oligofructose on the growth of transplantable mouse tumour // *Anticancer Res.* – 1998. – Vol. 18, № 6. – P. 4123–4126. 10. Taper H.S., Roberfroid M.B. Nontoxic potentiation of cancer chemotherapy by dietary oligofructose or inulin // *Nutr. Cancer.* – 2000. – Vol. 38, № 1. – P.1–5. 11. Abrams S. A, Griffin I. J., Hawthorne K. M. et al. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2005. – Vol. 82, № 2. – P. 471-476. 12. Kok N.N., Taper H.S., Delzenne N.M. Oligofructose modulates lipid metabolism alterations induced by a fat-rich diet in rats // *J. Appl. Toxicol.* – 1998. – Vol. 18, № 1. – P. 47-53. 13. Delzenne N.M., Kok N. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism // *Am. J. Clin Nutr.* – 2001. – Vol. 73, № 1-2. – P. 456 – 458. 14. Delzenne N.M., Daubioul C., Neyrinck A. et al. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects // *Br. J. Nutr.* – 2002. – Vol. 87, № 2. – P. 255-259. 15. Figueira G. M., Park K.J., Reis Brod F. P., Honório S. L. Evaluation of desorption isotherms, drying rates and inulin concentration of chicory roots (*Cichorium intybus* L.) with and without enzymatic inactivation // *J. Food Engineer.* – 2004. – vol.63. – P. 273-380. 16. Ranjitha Kumari B.D., Velayutham P., Anitha S.A. Comparative Study on Inulin and Esculin Content of *in vitro* and *in vivo* Plants of Chicory (*Cichorium intybus* L. Cv. Lucknow Local) // *Advances in Biol. Res.* – 2007. – vol. 1, № 1-2. – P. 22-25. 17. Park E., H. Lim Establishment of an efficient *in vitro* plant regeneration system in chicory (*Cichorium intybus* L. var. *Sativus*) // *International symposium on vegetable quality of fresh and fermented vegetables.* – 2006. – № 4. – P. 115. 18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – vol.15, № 3. – P. 473–496. 19. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др.. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – С.143. 20. Baert J. R. A. The effect of sowing and harvest date and cultivar on inulin yield and composition of chicory (*Cichorium intybus* L.) roots // *Industrial Crops and Products.* – 1997. – vol 6, № 3-4. – P. 195-199.

Надійшла до редколегії 14.07.10