

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XVI, 11

SECTIO C

1961

Z Katedry Mikrobiologii Ogólnej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS

Kierownik: prof. dr Jadwiga Ziemięcka

Z Katedry Fizjologii Roślin WSR w Lublinie

Kierownik: prof. dr Anna Mieczczyńska

Mariusz WARTERESIEWICZ

Hydroliza glikofruktozanów topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.)

Гидролиз глюкофруктозидов топинамбура

**Hydrolyse des glucofructosanes du topinambour
(*Helianthus tuberosus* L.)**

WSTĘP

Topinambur zwany u nas popularnie bulwą należy do rodziny złożonych (*Compositae*), podrodziny rurkowych (*Tubuliflorae*), plemienia słonecznikowych (*Heliantheae*), rodzaju *Helianthus*. Jest to bylina; na jej pędach podziemnych rozwijają się liczne guzowate kłęby z pączkami śpiącymi. Ilość kłębów pod rośliną dochodzi nawet do 50.

Kłęby stanowią wartościową paszę dla inwentarza oraz cenny surowiec w przemyśle spożywczym. W literaturze światowej znajdujemy wiele pozycji traktujących o topinamburze: o jego uprawie, hodowli, znaczeniu paszowym, pokarmowym, zastosowaniu w przemyśle cukrowniczym, w cukiernictwie, a szczególnie o przerobie bulwy na alkohol (3, 15, 33, 37).

Podstawowym składnikiem kłębów są węglowodany. Zawartość ich waha się tu w granicach od 8 do 32% w stosunku do świeżej masy, wynosząc (wg K ö n i g a) średnio 16,4% (17, 33, 35).

Węglowodany bulwy składają się z inuliny, z szeregu jej pochodnych zwanych inulidami, z pewnej ilości sacharozy, a także z wolnej fruktozy i glikozy.

Pierwsze badania chemiczne węglowodanów topinamburu przeprowadzali: w r. 1867 D u b r u n f a u t i w r. 1888 G r e e n (5). Właściwym jednak pionierem tych badań jest T a n r e t. Wyróżnił on w soku

bulwy 5 polifruktozanów szeregu inulinowego, a poza tym sacharozę i cukry redukujące (34).

Od kilkudziesięciu lat zagadnieniem inuliny i jej pochodnych, zawartych w sokach roślinnych, zajmuje się Schlubach i współprac. (26—32). W ostatnich latach Schlubach i Huchting wyodrębnili z soku bulwy szereg samoistnych inulidów, które proponują nazwać „synantrynami” (32).

Bacon i Edelman hydrolizowali enzymatycznie inulinę oraz wyciąg z bulwy. Przed hydrolizą znaleźli oni w soku pewne ilości sacharozy i wolnej fruktozy, zaś w hydrolizatach, zarówno soku topinamburu, jak i preparatów inuliny, obok fruktozy wykryli też glikozę. Przy pomocy chromatografii bibułowej stwierdzili występowanie zupełnie podobnych frakcji inulidów w enzymatycznych hydrolizatach obydwu substratów (11).

Zagadnienie cukrów topinamburu opracował bardzo szczegółowo Dedonder (7—9). Stosując chromatografię bibułową w różnych układach, potwierdził on w pełni wyniki Bacona i Edelmana.

Zagadnienie enzymów hydrolizujących polifruktozany jest opracowywane od dawna przez różnych autorów (5, 10, 11, 12). Wyróżnić można dwa enzymy katalizujące hydrolizę polifruktozanów lub glikofruktozanów. Są nimi: inwertaza drożdżowa, czyli sacharaza oraz inulaza. Pierwotnie oba te enzymy uważano za identyczne bądź też rozpad inuliny przypisywano wyłącznie sacharazie (20). Obecnie przyjmuje się już jako dowiedzione istnienie tych dwu odrębnych enzymów (14, 19, 20, 23).

Dedonder porównywał działanie sacharazy drożdżowej i inulazy z *Aspergillus niger* na różne frakcje glikofruktozanów. Z badań tych wynika, że inulaza, atakując łańcuch cukrowca, odrywa resztę fruktofuranozową położoną na przeciwległym końcu niż reszta sacharozowa. W ten sposób powstają polimery glikofruktozanów o coraz krótszym łańcuchu z równoczesnym wydzielaniem się wolnej fruktozy. Natomiast sacharaza atakuje glikofruktozan od strony sacharozy, wyzwalając naprzód fruktozę i niemal równocześnie glikozę. Sacharaza jest o wiele bardziej aktywna w stosunku do niskocząsteczkowych członów szeregu niż do bardziej spolimeryzowanych jego przedstawicieli (7). Opisany wzajemny stosunek inulazy i inwertazy drożdżowej znajduje też potwierdzenie w pracy Michlina i Achunbajewej nad enzymatyczną hydrolizą polifruktozanów koksagizu, które są bardzo zbliżone do cukrowców bulwy (18).

Znaczna większość badaczy zajmujących się topinamburem uważa zatem, że inulina jest najwyższym spolimeryzowanym członem szeregu glikofruktozanowego, zaś ekstrakt z topinamburu zawiera kilkanaście

członów tegoż szeregu. Są one prawie identyczne z szeregiem złożonym z pochodnych inuliny, uzyskanym na drodze jej kwasowej lub enzymatycznej hydrolizy. Nieco odmienne stanowisko zajmuje Quillet (24), do czego powrócę przy omawianiu wyników pracy.

BADANIA WŁASNE

Badanie warunków hydrolizy wielocukrów bulwy przeprowadzane było w ramach szerszych doświadczeń nad przydatnością tego surowca dla otrzymywania alkoholu (35).

Celem tej pracy było dokładniejsze poznanie procesu hydrolizy, czyli scukrzania, które ma podstawowe znaczenie w przemyśle fermentacyjnym. Schemat badań przedstawia się następująco:

1. Przebadanie optymalnych warunków kwasowej i enzymatycznej hydrolizy preparatu inulinowego.
2. Określenie optimum temperatury, odczynu i czasu działania enzymów własnych rośliny w procesie hydrolizy glikofruktozanów soku bulwy.
3. Porównanie przebiegu hydrolizy enzymatycznej (samoscukrzania) z hydrolizą kwasowo-cieplną z zastosowaniem chromatografii bibułowej.
4. Próba ilościowego ujęcia dynamiki hydrolizy na drodze chromatograficznej.

1. Hydroliza preparatu inulinowego

Hydroliza kwasowa. Na wstępie zbadano warunki kwasowej i enzymatycznej hydrolizy preparatu inulinowego. Preparatu dostarczył Dział Technologii Żywności PZH w Warszawie.

Hydrolizę kwasową przeprowadzono, zmieniając 3 parametry: temperaturę, kwasowość i czas w różnych zakresach. Stosowano zakwaszanie HCl w granicach 1,5 do 20° Delbrücka (1° Dbr odpowiada stężeniu kwasu 0,05 N, skala stosowana w przemysłach fermentacyjnych), temperaturę od 60 do 100° i czas od 5 do 30 min.

Hydrolizowano próbki 0,5% roztworu inuliny o obj. 50 ml, w których oznaczano na wstępie zawartość cukrów redukujących. Po ukończeniu hydrolizy oznaczano ponownie cukry redukujące metodą Bertranda. Ponieważ preparat nie był zupełnie czystą inuliną, substancje zanieczyszczające (przeważnie o charakterze białkowym) wytrącano przy pomocy odczynnika Carreza (równe obj. 30% Zn SO₄ i 15% K₄Fe(CN)₆).

Wyniki hydrolizy kwasowej przedstawia tab. 1. Najwyższa ilość cukrów redukujących (obliczonych jako fruktoza) po hydrolizie wynosiła 88% w stosunku do suchej masy preparatu. Otrzymano ją przy

Tab. 1. Hydroliza kwasowa preparatu inulinowego. Ilości substancji redukujących po hydrolizie (jako fruktoza) w ‰ s. m. preparatu.

L'hydrolyse acide d'inuline. Quantités de substances réduisantes après l'hydrolyse ‰ de matière sèche.

Czas hydrolizy w min. Le temps d'hydrolyse — min.	temp.: 60°					70°				100°
	Kwasowość w stopniach Delbrücka									
	1,5	2,0	4,0	10,0	20,0 (1N HCl)	2,0	4,0	10,0	20,0	4,0
5	36,0	78,3	77,9	78,6	85,7	80,0	86,6	84,9	82,4	85,5
10	67,5	78,0	78,7	84,0	82,8	—	87,9	—	—	86,5
15	—	—	—	82,8	77,9	—	88,0	—	—	88,0
30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	87,6

przed hydrolizą preparat zawierał 3,6‰ subst. red. (jako fruktoza).
avant l'hydrolyse l'inuline contenait 3,6‰ subst. réd. (comme fructose).

4° Dbr, w temp. 70°, w czasie 15 min. Zwiększanie kwasowości i przedłużanie czasu hydrolizy nie dawały podwyższenia tego wyniku. Nawet czas 10 min. przy wyżej wymienionych pozostałych dwu parametrach wydaje się już wystarczający, gdyż różnice między wynikami z 10 i 15 minutowej próby leżą w granicach błędu oznaczenia.

Przy wszystkich oznaczeniach cukrów w niniejszej pracy stosowano określone w ten sposób warunki hydrolizy.

Hydroliza enzymatyczna. Z kolei przeprowadzono próbę scukrzenia preparatu inulinowego na drodze enzymatycznej, działając nań sokiem z kłębów topinamburu. Użyto soku o pH = 5,8, w którym cukry wyższe były już całkowicie rozłożone do form redukujących przez samoscukrzanie w temp. 30° w ciągu 8 dni. Do roztworu inuliny dodawano sok w ilości 5, 10 i 20 ‰ w stosunku do objętości roztworu; pH roztworu wynosiło 6,1. Roztwór zabezpieczano przed fermentacją 2 ‰ dodatkiem toluenu. Próby inkubowano w temp. 28°, oznaczając przyrost ilości cukrów redukujących w roztworze inuliny po 2 i po 8 dniach. Stąd wyliczano, jaki odsetek cukrowców nie redukujących uległ hydrolizie w danym czasie (tab. 2, kolumna 7 i 10). Użyty do scukrzenia sok zawierał 12,0 ‰ cukr. red., zaś sam roztwór inuliny ogółem 7,0 ‰ cukrów, w tym 0,3 ‰ w formie redukującej.

Stopień wzrostu zawartości cukrów redukujących jest miarą hydrolytycznej aktywności soku topinamburu. Aktywność ta okazała się

Tab. 2. Hydroliza enzymatyczna preparatu inulinowego działaniem soku z topinamburu.

L'hydrolyse enzymatique d'inuline par l'extrait du topinambour.

Dodatek soku do roztworu Addition de l'extrait dans la solution % viol.	Początk. zaw. cukrów. po dodaniu soku Quantité de gluc. après l'addition de l'extrait: %			Po 2 dniach après 2 jours			Po 8 dniach après 8 jours		
	Ogółem gén.	Reduk. réd.	Niered. non-réd.	Cukry red. gluc. réd.	Uległo hydrol. hydrolysé		Cukry red. gluc. réd.	Uległo hydrol. hydrolysé	
					% w soku dans le jus	w stos. do c. nier. par rap- port aux gluc. non-réd.		% w soku dans le jus	w stos. do c. nier. par rap- port aux gluc. non-réd.
	1	2	3	4 (2-3)	5	6 (5-3)	7	8	9 (8-3)
I. 20	8,00	2,86	5,14	3,02	0,16	2,2	3,90	1,04	14,5
				3,14	0,28	3,9	3,84	0,98	13,7
średnia méd.				3,08	0,22	3,1	3,87	1,01	14,1
II. 10	7,50	1,40	6,10	1,88	0,48	6,8	2,86	1,46	20,6
				1,80	0,40	5,6	3,12	1,72	24,2
średnia méd.				1,84	0,44	6,2	2,99	1,59	22,4
III. 5	7,35	0,80	6,55	1,26	0,46	7,0	1,36	0,56	8,6
				1,26	0,46	7,0	1,32	0,52	8,0
średnia méd.				1,26	0,46	7,0	1,34	0,54	8,3

niezbyt wielka, jednak najwyższy wynik dał nie 20%, lecz 10% dodatek soku, przy czym hydrolizie do form redukujących uległo nieco ponad 20% cukrowców wyższych. Scukrzenie takie jest zbyt słabe, aby mogło być brane pod uwagę dla celów praktycznych.

2. Scukrzanie wielocukrów soku inulazą własną

Celem zbadania dynamiki procesu hydrolizy węglowodanów, zachodzącej pod wpływem inulazy własnej w soku bulwy, przeprowadzono szereg prób w różnych warunkach, zmieniając parametry temperatury, odczynu i czasu działania.

Zawartość ogólna cukrów soku bulwy wahała się od 8,6 do 17%, w tym cukrów redukujących od 0,6 do 2,25%. Dla zahamowania działalności fermentacyjnej mikroflory, która uniemożliwiłaby obserwację działania inulazy, do wszystkich próbek dodawano 2% toluenu.

W określonych odstępach czasu inkubacji oznaczano ilość cukrów redukujących w próbie. Znajdowane w każdym etapie hydrolizy ilości cukrów redukujących przeliczano w stosunku procentowym do ogólnej ilości cukrów soku. Na podstawie otrzymanych tą drogą liczb sporządzono poza tym wykresy. Hydrolizę uważano za ukończoną, gdy ilość cukrów redukujących zrównywała się z ogólną ilością cukrów oznaczoną po kwasowej hydrolizie (4° Dbr, 100°C, 15 min.). Wszystkie oznaczenia cukrów dokonywane były metodą Bertranda, białka i inne niecukry strącano odczynnikiem Carreza.

Wobec wysokich strat w cukrach powstałych w czasie doświadczenia wyniki mogą mieć jedynie znaczenie orientacyjne dla określenia opty-

Tab. 3. Enzymatyczna hydroliza soku bulwy pod działaniem inulazy własnej.
Szerszy zakres temperatur.
L'hydrolyse enzymatique d'extrait du topinambour par l'inulase propre.
Limites plus vastes de la température.

L. p.	Temp. °C	Czas trwania hydrolizy (dni) le temps d'hydrolyse (jours)									
		1/2	1	2	3	4	5	11	14	22	30
1.	2—4	—	1,005	1,075	—	—	—	2,46	4,24	7,62	9,70
2.	22—24 a)	—	2,87	5,72	7,71	8,90	9,81	10,64	10,60	11,22	11,04
	b)	—	2,84	5,82	7,81	8,90	9,88	10,46	10,76	11,36	10,92
3.	38—40 a)	2,45	4,07	5,13	5,62	—	6,60	8,26	8,96	9,90	9,70
	b)	2,47	3,88	4,45	4,83	—	5,18	7,26	7,40	8,18	8,09
4.	54—56 a)	1,60	1,79	1,93	2,13	—	2,18	—	—	—	—
	b)	1,51	1,61	1,68	1,87	—	2,01	—	—	—	—

Uwagi: Wartości cukrów redukujących w soku we wszystkich tabelach podano w ‰ (jako fruktoza).

Les valeurs des glucides réduisants dans le jus on a donné dans tous les tableaux en ‰ (comme fructose).

Próba z temp 2—4° została po 11 dniach doświadczenia przeniesiona do temp. pokojowej.

L'extrait de la temp. 2° après 11 jours fut transporté dans la temp. 20°. pH soku na początku doświadczenia = 6,0, ogólna ilość cukrów (po hydrolizie kwasowej) — 15,2‰, w tym cukru red. — 0,59‰.

pH du jus au commencement de l'expérience = 6,0 quantité générale de glucides (comme fructose) — 15,2‰, incl. gluc. réd. — 0,59‰.

Ogólne ilości cukrów w próbach po ukończeniu hydrolizy enzymatycznej. Quantités de glucides après la période d'hydrolyse enzymatique.

1. — 12,3‰ (strata — la perte: 19‰),
2. — 11,7‰ (strata — la perte: 22,8‰),
3. — 10,0‰ (strata — la perte: 34,0‰).

malnych warunków scukrzania w zakresie temperatury i odczynu, nie mogą natomiast służyć jako materiał do oznaczeń ilościowych.

Doświadczenia nad samoscukrzaniem soku rozpoczęto od ustalenia temperatury optymalnej dla enzymatycznego rozkładu wielocukrów. W próbach tych pH soku było naturalne i wynosiło ok. 6,0. Początkowo zastosowano szerszy zakres temperatur: 1) 2 do 4°, 2) 22 do 24°, 3) 38 do 40°, 4) 54 do 56°.

Tab. 4. Enzymatyczna hydroliza soku bulwy. Węższy zakres temperatur.
L'hydrolyse enzymatique d'extrait du topinambour. Limites plus étroites de la température.

L. p.	Temp. °C	Czas trwania hydrolizy (dni) le temps d'hydrolyse (jours)						
		15 godz. heures	1	2	3	4	6	
1.	25	a)	2,01	4,66	7,80	9,34	11,16	11,00
		b)	2,32	4,73	7,62	10,34	11,50	11,30
2.	30	a)	3,15	5,74	8,96	10,86	11,71	11,64
		b)	3,15	5,29	8,64	10,14	10,92	11,54

Uwagi: początkowe pH soku — 5,9

pH initial du jus

ogólna zawartość cukrów — 16,95%

quant. gén. de glucides

w tym cukrów red. — 0,90%

incl. gl. réd.

zawartość ogólna cukrów po ukończeniu hydrolizy — 12,0%

contenu général de gluc. après l'hydrolyse

strata cukrów w stosunku do pocz. zawart. — 29%

la perte de gluc. par rapport à la quant. init.

Z wyników podanych w tab. 3 należy wnioskować, że optimum temperatury powinno leżeć w granicach między 24 a 38°.

Wykonano zatem dwie dodatkowe próby w 25 i 30°. Jak widać z tab 4, nieco korzystniejsza dla hydrolizy była temp. 30°. Po upływie 6 dni nastąpiło w tych warunkach praktycznie całkowite scukrzanie.

Po ustaleniu optimum temperatury przystąpiono do zbadania wpływu pH na aktywność inulazy. W temp. 30° nastawiono 5 prób po 2 powtórzenia w szerszych granicach pH. Odczyny wynosiły: 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 i 8,0 (tab. 5).

Po stwierdzeniu, że optimum leży w pobliżu odczynu pH = 6,0 wykonano jeszcze dwie serie prób z węższymi zakresami pH = od 6,0 do 7,0 oraz od 5,2 do 6,3, z odstępami co 0,2 lub 0,3 pH, po pięć prób z powtórzeniami w obu seriach.

Tab. 5. Enzymatyczna hydroliza soku bulwy pod działaniem inulazy własnej w temp. 30°. Szerszy zakres odczynu.

L'hydrolyse enzymatique d'extrait du topinambour par l'inulase propre. Limites plus vastes de l'acidité.

L. p.	pH	Czas trwania hydrolizy (dni) le temps d'hydrolyse (jours)							Cukry og. po hydrol. gluc. après l'hydrolyse %	Strata cukrów la perte de gluc. %
		1/2	1	2	5	9	15			
1.	4,0	a)	1,00	1,17	1,33	1,67	2,20	3,73	13,9	10,0
		b)	0,97	1,19	1,32	1,85	2,62	4,97		
2.	5,0	a)	1,59	2,02	2,71	3,84	5,15	7,84	10,5	32,0
		b)	1,58	1,91	2,74	4,33	6,02	8,63	10,9	29,2
3.	6,0	a)	1,81	3,08	5,21	9,32	8,68	9,52	9,55	38,0
		b)	1,84	3,10	5,26	8,36	9,16	9,85	9,85	36,0
4.	7,0	a)	1,73	2,95	5,19	7,60	8,38	8,43	8,60	44,0
		b)	1,96	3,23	5,64	6,90	8,20	8,90	8,95	41,8
5.	8,0	a)	1,18	1,79	3,72	6,71	7,20	8,81	9,20	40,2
		b)	1,16	1,77	3,55	6,53	8,00	8,35	9,30	39,6

początkowa zawartość cukrów ogółem — 15,4%

contenu général initial de gluc.

w tym cukrów redukujących — 0,90%

incl. gluc. réd.

Tab. 6. Enzymatyczna hydroliza soku bulwy w temp. 30°, zakres pH 6,0—7,0.

L'hydrolyse enzymatique d'extrait en temp. 30°. Limites du pH 6,0—7,0.

L. p.	pH	Czas trwania hydrolizy (dni) le temps d'hydrolyse (jours)							Cukry og. po hydrol. gluc. après l'hydrolyse %	Strata cukrów la perte de gluc. %
		1	2	3	5	8	12			
1.	6,0	a)	4,37	6,28	6,85	8,30	9,80	9,75	9,85	34,0
		b)	4,49	6,12	9,91	8,21	9,90	9,85		
2.	6,3	a)	4,00	5,42	6,05	7,31	9,40	9,71	9,75	34,6
		b)	4,38	5,49	5,80	7,48	9,50	9,80		
3.	6,5	a)	4,20	5,82	6,40	7,65	9,28	9,84	9,90	33,7
		b)	4,30	6,03	6,45	7,57	9,51	9,95		
4.	6,7	a)	3,92	5,55	5,93	7,15	8,86	9,25	9,60	35,6
		b)	4,12	5,40	6,18	7,05	9,00	9,55		
5.	7,0	a)	4,00	5,40	5,76	6,80	8,29	8,71	9,55	36,0
		b)	3,85	5,29	5,70	6,96	8,50	8,85		

początkowa zawartość cukrów ogółem — 14,9%

contenu général initial de gluc.

w tym cukrów redukujących — 2,25%

incl. gluc. réd.

Tab. 7. Enzymatyczna hydroliza soku bulwy w temp. 30°. Zakres pH 5,2—6,3.
L'hydrolyse enzymatique d'extrait en temp. 30°. Limites du pH 5,2—6,3.

L. p.	pH	Czas trwania hydrolizy (dni) le temps d'hydrolyse (jours)					Cukry og. po hydrol. gluc. après l'hydrolyse %	Strata cukrów la perte de gluc. %	
		18 godz. heures	2,5	5	8	12			
1.	5,2	a)	2,35	4,45	6,02	6,80	6,75	6,80	20,9
		b)	2,20	4,32	5,90	6,75	6,70	6,70	22,2
2.	5,5	a)	2,57	4,90	6,02	7,06	6,95	7,06	17,8
		b)	2,19	5,03	6,03	6,89	6,89	6,89	19,8
3.	5,75	a)	2,73	4,95	6,24	6,94	6,94	6,95	19,2
		b)	2,54	4,40	5,70	6,46	6,55	6,68	22,5
4.	6,0	a)	2,55	4,82	6,15	6,96	6,83	6,96	19,0
		b)	2,63	4,89	6,23	6,82	6,89	6,90	19,8
5.	6,3		2,30	4,78	5,33	5,91	6,28	6,30	26,8

początkowa zawartość cukrów ogółem — 8,6%

contenu général initial de gluc.

w tym cukrów redukujących — 1,59%

incl. gluc. réd.

W serii pierwszej najlepsze scukrzenie dało pH = 6,0 (tab. 6), w drugiej trudno stwierdzić różnicę w granicach pH od 5,5 do 6,0 (tab. 7). Na podstawie tych wyników powiedzieć można, że optimum pH waha się w granicach od 5,5 do 6,0. Całkowite scukrzenie następowało praktycznie po 8—10 dniach. Największe straty w ogólnej ilości cukrów uwidaczniały się w próbach o pH = 7,0, najmniejsze przy pH = 4,0 (tab. 5). Z punktu widzenia mikrobiologicznego jest to zupełnie zrozumiałe.

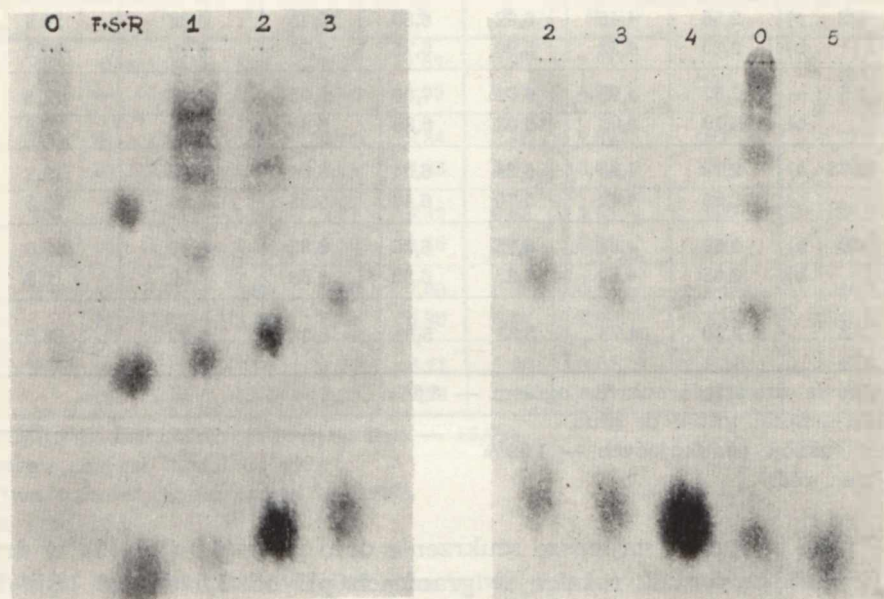
3. Analiza chromatograficzna cukrowców podczas hydrolizy

Ponieważ określanie stopnia hydrolizy przez oznaczenie zawartości cukrów redukujących daje jedynie ogólny obraz, dlatego w celu bardziej wnikliwego zbadania przebiegu procesu rozpadu wyższych cukrów posłużono się metodą analizy chromatograficznej bibułowej.

Celem zbadania przebiegu hydrolizy cukrowców soku pod działaniem inulazy własnej nastawiono próby soku o pH = 6,0 w temp. 30° (zgodnie z wynikami badań określających optymalne warunki hydrolizy) i przez 6 dni oznaczano w tych próbach zawartość cukrów redukujących. Poza próbami z samoscukrzaniem soku przeprowadzono też dla porównania

kwasową hydrolizę soku, zakwaszając go do $\text{pH} = 1,4$ (0,37 N kwasowości).

Szereg próbek o objętości 30 ml zakwaszono 3 ml 4 N H_2SO_4 i umieszczano je w ultratermostacie Höpplera w temp. 70° . Wyjmowano po 2 próbówki po 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 i 60 min. Natychmiast po wyjęciu próbki zobojętniano ługiem sodowym i odbiałczano 10%



Fot. 1. Chromatogramy z hydrolizy kwasowej ekstraktu cukrów, rozwijanie 48 godz.; liczby oznaczają czas hydrolizy danej próbki: 1 — 1 min., 2 — 5 min., 3 — 10 min., 4 — 30 min., 5 — 40 min., 6 — 60 min. F — fruktoza, S — sacharoza, R — rafinoza

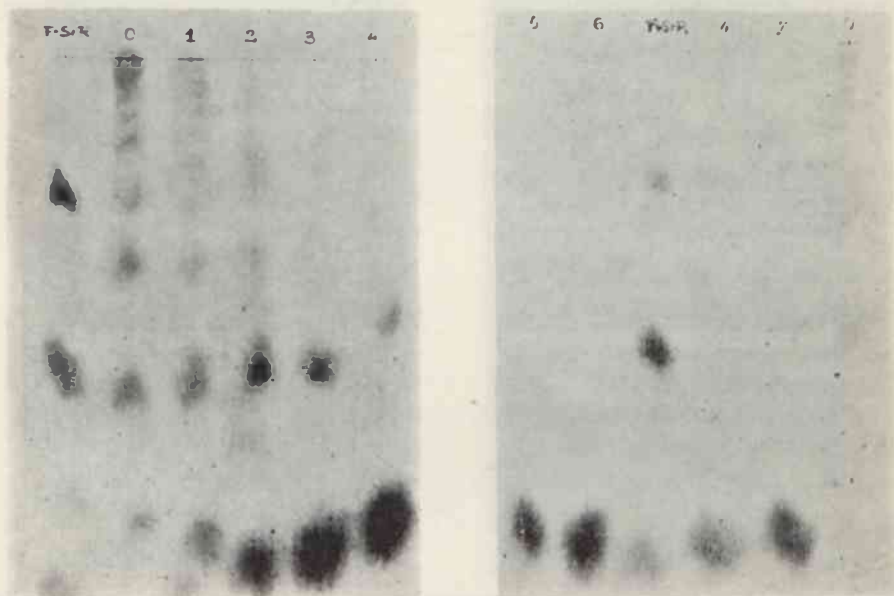
Chromatogrammes d'hydrolyse acide, développement de 48 heures; les chiffres indiquent le temps d'hydrolyse: 1 — 1 min., 2 — 5 min., 3 — 10 min., 4 — 30 min., 5 — 40 min., 6 — 60 min., F — fructose, S — saccharose, F — raffinose

octanem ołowiawym, zaś nadmiar octanu strącano siarkowodorem (8). Równolegle też przeprowadzono wytrącanie nasyconym siarczanem sodu; nie stwierdzono ujemnego wpływu tego odczynnika na rozwijanie chromatogramów na bibule.

Spośród bardzo wielu spotykanych w literaturze metod bibułowej chromatografii węglowodanów, w tym też o charakterze fruktozanowym, wybrano technikę opartą w zasadzie na doświadczeniach *Patridge'a* (21,22).

Użyto bibuły Wattman nr 1. Oczyszczony w wyżej opisany sposób wyciąg cukrowy bulwy nakraplano po 2 μl na linię startową przy pomo-

cy pipetki pasteurowskiej. Jako wzorce наносono 5% roztwory fruktozy, sacharozy i rafinozy, wprowadzając w ten sposób po 0,1 mg odpowiednich cukrów na bibułę. Chromatogram rozwijano jednokierunkowo metodą zstępującą, przepływową, w układzie butanol, kwas octowy, woda (4:1:5). Do wywoływania używano rezorcynowego odczynnika Forsytha (13). Po spryskaniu wywoływaczem ogrzewano bibułę przez

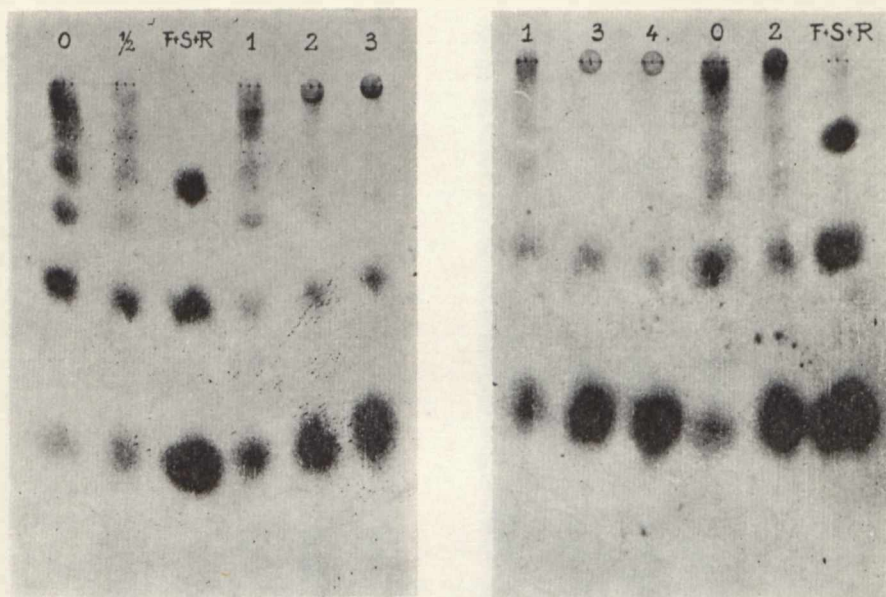


Fot. 2. Chromatogramy z hydrolizy kwasowej, rozwijanie 60 godz.: oznaczenia jak na fot. 1.

Chromatogrammes d'hydrolyse acide, développement de 60 h.: les indications comme sur la fot. 1.

5 min. w temp. od 80 do 90°. Chromatogramy wykonywano w dwu potwórzaniach. Ustalono dwojaki czas dla rozwijania chromatogramów: 1) 2 do 3 dni, 2) 5 do 6 dni. W pierwszym wypadku na bibule pozostawały wszystkie frakcje cukrowców łącznie z fruktozą, w drugim fruktoza ulegała już wymywaniu z bibuły, a jako najbardziej skrajna frakcja pozostawała na chromatogramie sacharoza. W tym drugim wypadku uzyskiwano wyraźniejszy rozdział wyższych frakcji inulidów. Po otrzymaniu chromatogramów z dostatecznie rozdzielonymi frakcjami cukrowców dokonano próby ilościowego oznaczenia poszczególnych glikofruktozanów. W tym celu наносono na bibułę po 2 próbki badanego roztworu w poszczególnych stadiach hydrolizy i rozwijano je obok siebie przez dwa wyżej wymienione okresy czasu. Po rozwinięciu wyci-

nano pasek z jednego powtórzenia, zaś powtórzenie sąsiadujące wywoływano. Następnie przykładano wycięte nie wywołane paski do wywołanych powtórzeń i wg tych ostatnich wycinano z bibuły fragmenty pasków zawierające odpowiednie frakcje cukrowców. Skrawki te poddawano eluowaniu. W szerokich probówkach wygotowywano pocięte drobno skrawki w ok. 4 ml wody z dodatkiem 1 ml 1 N HCl, następnie odlewano



Fot. 3. Chromatogramy z hydrolizy enzymatycznej, rozwinięcie 55 godz.; liczby oznaczają wprost czas hydrolizy w dobach

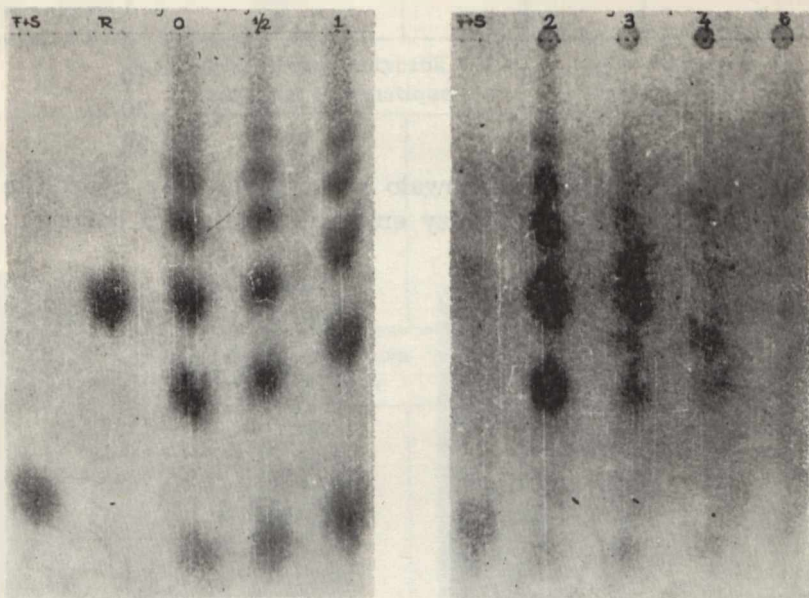
Chromatogrammes d'hydrolyse enzymatique, développement de 55 h; les chiffres indiquent directement le temps d'hydrolyse en journées

wyciąg do kalibrowanej probówki, a bibułę ekstrahowano jeszcze dwukrotnie wodą po 30 min., dodając do końcowego gotowania 1 ml wywoływacza rezorcynowego (21). Połączony eluat doprowadzono do objętości 5 ml (odparowywaniem lub dodatkiem wody) i oznaczano w nim intensywność różowo-pomarańczowego zabarwienia powstającego na skutek reakcji Selivanoffa. Oznaczeń gęstości optycznej dokonywano na fotometrze Pulfricha, przy użyciu najkorzystniejszego filtra ciemnoniebieskiego, S 47 o dł. fali $\lambda = 465 \mu\text{m}$.

Na chromatogramach hydrolizy enzymatycznej oznaczenia numeryczne poszczególnych próbek z różnych stadiów hydrolizy odpowiadają wprost czasowi hydrolizy w dobach, zaś przy hydrolizie kwasowej oznaczenia okresów czasu hydrolizy były następujące: 1 min. — nr 1; 5 min.

— nr 2; 10 min. — nr 3; 20 min. — nr 4; 30 min. — nr 5; 40 min. — nr 6; 60 min. — nr 7

Celem ilościowego oznaczenia cukrów w poszczególnych frakcjach (po hydrolizie do fruktozy) sporządzono wzorcowe krzywe ekstynkcji. Użyto w tym celu roztworów fruktozy o zawartościach 0,05, 0,1 oraz 0,2 mg w 5 ml roztworu. Krzywe ekstynkcji wykreślone na podstawie



Fot. 4. Chromatogramy z hydrolizy enzymatycznej, rozwijanie 72 godz.; oznaczenia jak na fot. 3.

Chromatogrammes d'hydrolyse enzymatique, développement de 72 h.; les indications comme sur la fot. 3.

szeregu powtórzeń były bardzo zbliżone do linii prostych, a wartości zgodnie z podawanymi w literaturze (4, 13, 16). Średnia ekstynkcja dla 0,05 mg fruktozy rozpuszczonej w 5 ml wody, w kuwecie o grubości $d = 5$ mm wynosiła 0,21, zaś dla 0,1 mg — 0,42 (przy filtrze S 47).

Od otrzymanych odczytów odejmowano poprawkę z ślepej próby, do której używano paska czystej bibuły o znanej powierzchni.

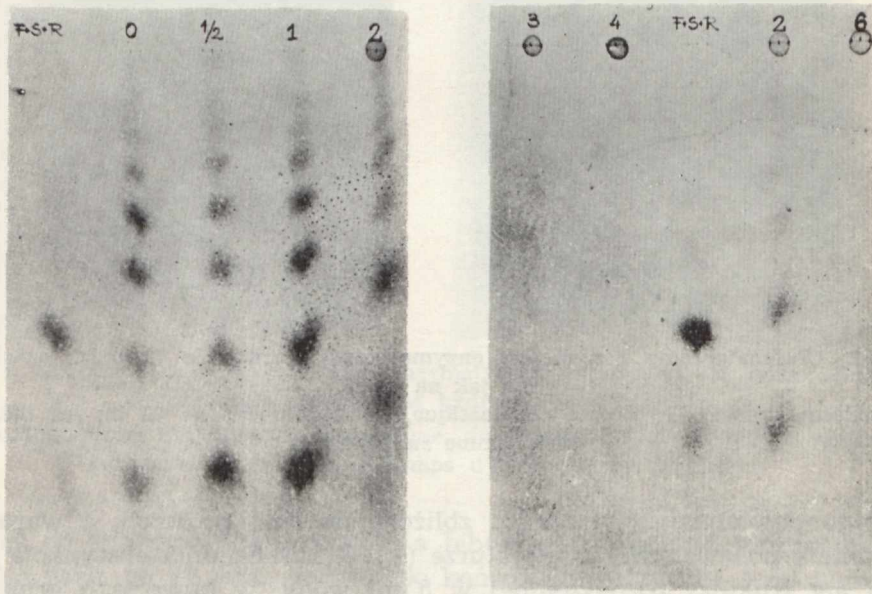
Na podstawie wyników z przeprowadzonych badań można było porównać dynamikę samoscukrzania z hydrolizą kwasową (tab. 8).

Hydroliza enzymatyczna soku prowadzona przy naturalnym $\text{pH} = 6,7$, w temp. 28° pod względem wzrostu zawartości cukrów redukujących przebiegała podobnie, jak w próbach poprzednich. Całkowity rozpad cukrów wyższych do prostych następował po 6 dniach. Strata w ogólnej ilości cukrów wyniosła w tym czasie 31 % wartości początkowej. Porów-

nując przebieg samoscukrzania z hydrolizą kwasową przy $\text{pH} = 1,4$ można określić, jakie okresy czasu hydrolizy enzymatycznej i kwasowej odpowiadały sobie wzajemnie:

	Hydroliza enzymatyczna dni	Hydroliza kwasowa ($\text{pH} = 1,4$) min.
1.	1	1
2.	2	5
3.	3	10
4.	4	20
5.	6	30

Całkowite scukrzenie następowało praktycznie przy hydrolizie kwasowej po 30 lub 40 min., zaś przy enzymatycznej po 6 dniach.



Fot. 5. Chromatogramy z hydrolizy enzymatycznej, rozwijanie 5-cio dobowe; oznaczenia jak na fot. 3.

Chromatogrammes d'hydrolyse enzymatique, développement de 5 journées; les indications comme sur la fot. 3.

Przy pomocy rozdziału chromatograficznego zdołano wyodrębnić na bibule 9 frakcji cukrowców. Przy 2-dobowym rozwijaniu pozostawały jeszcze na bibule plamy fruktozy, co pozwalało mierzyć ich odległość od linii startowej, a następnie wyrażać w stosunku do tej odległości współczynniki R_{f_r} dla wszystkich innych frakcji. Powyżej pozycji odpowia-

Tab. 8. Porównanie przebiegu hydrolizy enzymatycznej soku, pod działaniem inulazy własnej z hydrolizą kwasową.

La comparaison de l'hydrolyse enzymatique par l'inulase propre du jus avec l'hydrolyse acide par H_2SO_4

Czas hydrolizy dni Le temps d'hydrolyse — jours	Ogólna zawartość cukrów Contenu gén. de gluc. %	Cukry red. Glucides réd. %	Scukrzenie gl. hydrolisés %
A. Hydroliza enzymatyczna L'hydrolyse enzymatique		pH = 6,0 temp. = 30°	
0	13,6	0,50	3,7
1/2 (14 g.)	13,6	1,18	8,7
1	13,6	2,03	14,9
2	10,8	4,70	43,5
3	10,8	7,60	70,5
4	10,5	9,20	87,5
6	9,3	9,20	98,9
B. Hydroliza kwasowa L'hydrolyse acide		pH = 1,4 temp. = 70°	
minut.			
0	13,85	1,18	8,5
1	13,85	1,95	14,1
5	13,85	6,36	45,9
10	13,85	9,41	67,9
20	13,85	11,85	85,6
20	13,85	13,10	94,6
40	13,85	13,40	96,8
60	13,85	13,50	97,5

Uwaga: Straty w ogólnej zaw. cukrów w czasie hydrolizy enz. w stosunku do początkowej zawartości — 31,5%.

La perte pendant l'hydrolyse enzymatique par rapport au contenu initial — 31,5%.

dającej w przybliżeniu rafinozie, na chromatogramach 2-dobowych można było wyraźnie odróżnić tylko 3 frakcje, zaś poniżej plamę „2”, „1”, czyli sacharozę i fruktozę (fot. 1—3). Przy 5-dobowym rozwijaniu, szczególnie próbek z hydrolizy enzymatycznej wyodrębniono największą ilość frakcji: poza fruktozą i sacharozą 7 wyższych frakcji glikofruktozanów (fot. 5, 5 a).

Na podstawie pomiarów z 89 pasków chromatogramów sporządzonych dla enzymatycznej i kwasowej hydrolizy soku wyliczono średnie wartości R_f dla poszczególnych frakcji. Przedstawiają one przesunięcie od linii startowej wyrażone w %/0% przesunięcia fruktozy. Na chromatogramach z obu rodzajów hydrolizy rozwijanych przez 3 lub 5 dni z powodu braku plam fruktozy trzeba było wyliczyć te współczynniki poprzez

odległości plam sacharozy, zaś na chromatogramie z hydrolizy enzymatycznej rozwijanym przez 5 dni nawet pośrednio poprzez plamy rafinozy, gdyż i sacharozy w tym wypadku nie zdołano już uchwycić (fot. 5).

Zestawienie wyników tych pomiarów przedstawia tab. 9. Ostatnia najwyższa frakcja cukrowców pozostawała przy linii startowej toteż jej R_{fr} oznaczono jako 0.

Tab. 9. Współczynniki przesunięcia poszczególnych glikofruktozanów topinamburu w stosunku do przesunięcia fruktozy.

Układ: butanol /kw. oct./ woda

4 : 1 : 5

Les coefficients du déplacement de glucofructosanes particuliers — par rapport au fructose.

Solvent: butanol /ac. acétique/ eau

4 : 1 : 5

Frakcja cukru Fraction Nr.	Ilość oznaczeń Quantité de mesurages	R_{fr} śr. — méd.
Fruktoza	64	100,0
1 (sachar.)	64	59,5 (Dla rafinozy z 17 oznaczeń
2	69	35,8 — 26,5)
3	66	25,7 (Pour raffinose, de 17 mesurages —
4	47	18,0 26,5)
5	24	13,4
6	36	10,1
7	11	6,2
8	6	3,4

Przy hydrolizie enzymatycznej już po 2 dniach plamy wyższych frakcji stają się słabo widoczne, zaś po 3 dniach prawie znikają. Przy hydrolizie kwasowej wyższe frakcje już po 5 min. hydrolizy dają plamy blade, znikające prawie zupełnie po 10 min. (fot. 1, 2).

Obserwacje z jakościowej analizy chromatograficznej znalazły potwierdzenie w oznaczeniach ilościowych. Wyniki badań hydrolizy kwasowej przeprowadzonej w dwu powtórzeniach dla dwu okresów czasu rozwijania chromatogramów (tj. 2 dni oraz 5 do 6 dni) zestawiono w tab. 10 i 10 a. Podano w nich ilości fruktozy w poszczególnych frakcjach glikofruktozanów po ich wymyciu z bibuły i przeprowadzeniu hydrolizy wg podanej wyżej metodyki. Obok tych cyfr podany jest %, jaki każda frakcja stanowi w stosunku do ogólnej zawartości cukrów (w przeliczeniu na fruktozę). Glikoza nie była oznaczana i nie została uwzględniona w tym obliczeniu. U góry tabel podano dla porównania zawartość cukrów redukujących, oznaczonych metodą Bertranda w poszczególnych fazach hydrolizy kwasowej.

Tab. 10. Hydroliza kwasowa (pH = 1,4). Hydrolyse acide. Analiza chromatograficzna ilościowa (powtórzenie 1).
Analyse chromatographique quantitative 1.
Ilości fruktozy zawarte w poszczególnych frakcjach glikofruktozanów.
Quantités du fructose contenues dans des fractions particulières des glucofructosanes.

Oznaczenie na chromatogramach symb. sur les chromatogr.	Czas trwania hydrolizy w minutach le temps de l'hydrolyse en minutes									
	0		1		5		10		20	
	µg	% frukt.	µg	% frukt.	µg	% frukt.	µg	% frukt.	µg	% frukt.
cukry redukujące % glucides réd. %	0		0	1.						
					2.		3.		4.	5.
frakcja Nr fraction Nr	8,5		14,1		46,0		67,9		85,6	94,6
rozwijanie 2 dniowe — développement de 2 journées										
5 — 8	140	50,8	110	39,0	53	17,7	32	11,2	0	0
4	25	9,0	40	14,2	15	5,0	12	4,2	0	0
3	32	11,6	35	12,4	29	10,0	10	3,5	0	0
2	40	14,5	30	10,6	22	7,3	15	5,3	35	13,2
1 (sacharoza)	24	8,7	35	12,4	50	16,7	35	12,3	30	11,3
fruktoza	15	5,4	32	11,4	130	43,4	180	63,5	200	75,5
suma — en somme	276	100,0	282	100,0	315	100,0	284	100,0	265	100,0
rozwijanie 6 dobowe — développement de 6 journées										
8	80	28,6	78	25,6	20	6,7	0	0	0	0
7	40	14,3	22	7,2	10	3,4	0	0	0	0
6	20	7,1	10	3,3	6	2,0	30	8,8	0	0
5	25	8,9	10	3,3	24	8,1	10	2,9	0	0
4	15	5,4	25	8,2	10	3,4	17	5,0	0	0
3	25	8,9	60	19,7	20	6,8	5	1,5	0	0
2	40	14,3	35	11,5	25	8,4	22	6,5	0	0
1 (sacharoza)	20	7,1	38	12,5	42	14,2	40	11,8	60	22,0
suma bez fruktozy en somme — sans fructose	240	94,6	278	88,6	157	56,6	124	36,5	60	22,0
									15	5,9
									15	5,9

Tab. 10a. Hydroliza kwasowa (pH = 1,4). Hydrolyse acide.
 Analiza chromatograficzna ilościowa (powtórzenie) 2. Analyse chromatographique quantitative 2.
 Ilości fruktozy zawarte w poszczególnych frakcjach glikofruktozanów
 Quantités du fructose contenues dans les fractions particulières des glucofructosanes.

Oznaczenie na chromatogramach symb. sur les chromatogr.		Czas trwania hydrolizy w minutach le temps de l'hydrolyse en minutes											
		0		1		5		10		20		30	
cukry redukujące % glucides réd. %		0		1.		2.		3.		4.		5.	
frakcja Nr fraction Nr		8,5		14,1		46,0		67,9		85,6		94,6	
		µg	% frukt.	µg	% frukt.	µg	% frukt.	µg	% frukt.	µg	% frukt.	µg	% frukt.
rozwijanie 2 dniowe — développement de 2 journées													
5 — 8		105	46,4	92	36,1	32	12,1	25	9,8	0	0	0	0
4		30	13,4	52	9,8	15	5,7	15	5,9	5	2,2	0	0
3		26	11,5	32	12,5	28	10,5	12	4,7	0	0	0	0
2		32	14,2	30	11,8	15	5,7	18	7,1	15	6,5	0	0
1 (sacharoza)		18	8,0	34	13,3	45	17,0	30	11,8	26	11,2	0	0
fruktoza		15	6,6	42	16,5	130	49,0	155	60,7	185	80,1	205	100,0
suma — en somme		226	100,0	255	100,0	265	100,0	255	100,0	231	100,0	205	100,0
rozwijanie 6 dniowe — développement de 6 journées													
8		65	24,3	50	20,9	14	4,8	5	2,1	0	0	0	0
7		52	19,4	15	6,3	5	1,7	0	0	0	0	0	0
6		15	5,6	10	4,2	8	2,8	2	0,9	2	1,2	0	0
5		15	5,6	12	5,0	10	3,5	12	5,1	0	0	0	0
4		22	8,2	30	12,6	4	1,4	20	8,5	0	0	0	0
3		28	10,5	25	10,5	32	11,0	10	4,3	0	0	0	0
2		38	14,2	28	11,8	20	6,9	18	7,7	10	6,0	0	0
1 (sacharoza)		15	5,6	29	12,2	55	18,9	25	10,7	21	12,7	10	5,0
suma bez fruktozy en somme — sans fructose		250	93,4	199	83,5	148	51,0	92	39,3	33	19,0	10	5,0

Na chromatogramach rozwijanych przez 5 dni celem procentowego obliczenia zawartości poszczególnych frakcji ilości wolnej fruktozy przyjmowano z odpowiednich oznaczeń rozwijania 2-dobowego. Oczywiście nie jest to zupełnie ściśle, lecz w inny sposób trudno by było przedstawić wzajemny stosunek frakcji i zmiany zachodzące w tym stosunku w miarę postępowania hydrolizy.

DYSKUSJA

Zestawiając wyniki niniejszej pracy z osiągnięciami innych badaczy należy stwierdzić dość daleko idącą zgodność.

Analiza chromatograficzna wielocukrów dała wyniki zbliżone do badań Dedondera (8, 9), Contiego (6) oraz Bacona i Edelmanna (1, 12).

Niżej podano współczynniki R_{fr} , czyli przesunięcie danej frakcji glikofruktozanu na bibule w stosunku do drogi przebytej przez fruktozę, uzyskane przez tych autorów w układzie chromatograficznym: butanol, kwas octowy, woda w zestawieniu ze średnimi wynikami badań własnych.

Frakcja glikofruktozanu	a u t o r z y			
	Dedonder r. 1952 (8)	Edelman i Bacon r. 1951 (12)	Conti r. 1953 (6)	Badania własne
Fruktoza	1,000	1,000	1,000	1,000
1 (sacharoza)	0,585	0,585	0,62	0,595
2	0,342	0,360	0,35	0,358
3	0,231	0,255	0,23	0,257
4	—	0,174	0,15	0,180
5	—	—	—	0,134
6	—	—	—	0,101
7	—	—	—	0,062
8	—	—	—	0,034

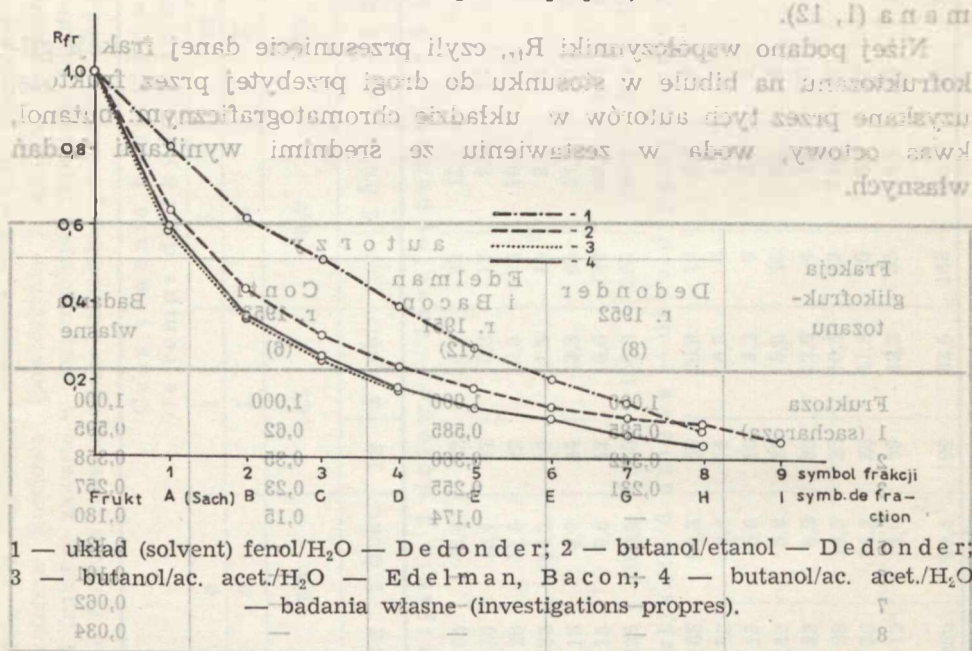
Jeżeli się sporządzi wykresy przedstawiające zależność R_{fr} od wielkości cząstki glikofruktozanu w różnych układach chromatograficznych, to widać charakterystyczną regularność krzywych, które przebiegają na kształt połowy hiperboli, zbliżając się asymptotycznie do osi odciętych.

Na podstawie danych liczbowych i pomiarów ze zdjęć chromatogramów wymienionych autorów oraz własnych danych sporządzono wykres (wykres 1). Widzimy z niego, że wyniki badań własnych pokrywają się całkowicie z danymi uzyskanymi przez Edelmanna i Bacona (11). Autorzy ci wyodrębnili jednak tylko 5 frakcji, z których ostatnia pozostawała na chromatogramie przy linii startowej (2).

Nasuwać się mogą natomiast pewne wątpliwości co do słuszności dokonanej przez Bacona i Edelmanna identyfikacji frakcji „2” o współczynniku $R_{fr} = 0,36$ jako trójcukru (1). Leżąca bowiem w najbliższym jej sąsiedztwie od góry frakcja „3” o $R_{fr} = 0,257$, niewiele różniącym się od współczynnika R_{fr} dla rafinozy = 0,265, powinna być

Wykres 1. Zmienność chromatograficznych współczynników R_{fr} w zależności od stopnia polimeryzacji glikofruktozanów soku topinamburu w różnych układach chromatograficznych (na podstawie danych i zdjęć z prac: Dedonder, Edelmanna i Bacona oraz badań własnych).

La variabilité des coefficients chromatographiques en dépendance du degré de polymérisation de glucofructosanes d'extrait de topinambour, pour les divers solvants (selon des données et reproductions de: Dedonder, Edelman et les investigations propres).



uważana za trójcukier o jednej reszcie glikozowej i dwu resztach fruktozydowych. Nie ma natomiast podstaw do przypuszczania, że „3” jest rafinozą, gdyż dotychczas nie stwierdzono nigdy w hydrolizatach inulinowych galaktozy, która musiałaby się uwalniać przy hydrolizie rafinozy. Pozostawałoby do rozważenia, czy frakcja „3” nie jest trójfruktozą. Takiemu pogładowi przeczą znów wyniki badań Quilleta (24). Stosując do rozdziału cukrowców soku topinamburu dwukierunkową chromatografię bibułową, dochodzi on do wniosku, że w skład inuliny wchodzi dwa równoległe szeregi polisacharydów: glikofruktozanowy i polifruktozanowy. Według tego autora niewielka ilość glikozy uzyski-

wana po hydrolizie inuliny (2 do 3%) dowodzi, że szereg polifruktozanowy, nie zawierający wcale reszt glikozowych, jest w składzie inuliny reprezentowany znacznie obficie od szeregu glikofruktozanowego. Stwierdza on dalej, że w układzie butanolowym, cukry szeregu fruktozanowego wędrują wolniej od swych analogów z szeregu glikofruktozanowego. Gdyby więc frakcja „3” była trójfruktozą, prawdopodobnie leżałaby nieco powyżej plamy kontrolnej rafinozy, dlatego że miałyby R_{fr} nieco niższy od tej ostatniej. Wobec tego pozostaje jedynie możliwość, że frakcja „2” jest dwufruktozą, która wg stwierdzeń Quilleta powinna mieć R_{fr} niższy od sacharozy. Dla ostatecznego rozstrzygnięcia tej kwestii konieczne by było przebadanie eluatu chromatograficznego klasycznymi metodami chemicznymi.

Co do badań nad wyżej wymienianymi glikofruktozanami, Dedonder poza glikozą, fruktozą i sacharozą znalazł 14 frakcji tychże. Badania na kolumnie celulozowej wykazały, że każdy następny człon szeregu różnił się od poprzedniego o jedną resztę fruktozydową (9).

Rozważając małą efektywność hydrolityczną soku z topinamburu w stosunku do preparatu inulinowego, nasuwa się przypuszczenie, że sama tylko zawartość cukrów redukujących w hydrolizacie nie jest jeszcze wystarczającym miernikiem stopnia rozpadu wielocukrów, można bowiem przypuszczać, że pod działaniem enzymów następuje poza odrywaniem się cząstek cukrów prostych także i rozpadanie się dłuższych łańcuchów na krótsze, co w zasadzie może nie przejawiać się zwiększaniem siły redukującej roztworów. Oczywiście stosowanie zagęszczonych preparatów enzymatycznych daje hydrolizę o wiele skuteczniejszą, jak to wynika m. in. z prac Edelmana i Bacona (10).

Orientacyjne badania ilościowe przebiegu hydrolizy kwasowej cukrowców soku topinamburu przez zastosowanie chromatografii bibułowej w znacznej mierze pokrywają się z wynikami Bacona i Edelmana (11).

Jak widać z tab. 10, zawartości cukrów redukujących oznaczone metodą Bertranda są na ogół nieco wyższe od ilości fruktozy otrzymanych z eluatów chromatograficznych w odpowiadających sobie wzajemnie stadiach hydrolizy. Świadczyć to by mogło, iż w hydrolizatach oprócz fruktozy znajdują się też pewne ilości innych cukrów prostych (np. glikozy), a ewentualnie i o tym, że wyższe glikofruktozany posiadają być może minimalne zdolności redukcyjne poprzez grupy skrajne na końcach łańcuchów przeciwstawnych położeniu reszty sacharozowej.

Wyniki chromatograficznej analizy ilościowej trzeba jednak traktować z dużą ostrożnością. Obciążone są one znacznymi błędami wynikającymi przeważnie z samego charakteru metody chromatografii bibułowej, która jest kapryśna i zależna od każdorazowych warunków badania.

OGÓLNE WNIOSKI

Na wstępie stwierdzono, że optymalnymi warunkami dla hydrolizy kwasowej 5% preparatu inulinowego jest temp. od 70 do 100°, oraz kwasowość 0,2 N przez 10 do 15 min. (tab. 1).

Hydroliza przez dodatek soku z bulwy dała niewielki efekt: przy 10% dodatku soku po 8 dniach działania scukrzeniu uległo średnio 22,4% cukrów wyższych preparatu (tab. 2).

Ustalając optymalne warunki hydrolizy kwasowej i enzymatycznej własną inulazą glikofruktozanów topinamburu, stwierdzono, że przy samoscukrzaniu własną inulazą soku, optymalnymi okazały się temp. ok. 30° oraz pH w granicach od 5,5 do 6,0. Całkowita hydroliza zachodziła w tych warunkach w czasie od 6 do 9 dni, w zależności od początkowej zawartości cukrów redukujących i układu cukrów wyższych (tab. 3—7).

Zalecana przez dawniejszych badaczy temp. scukrzania od 55 do 56° (17, 25, 36) okazała się mało efektywna (tab. 3).

Z drugiej strony jednak scukrzanie w temp. 30° jest mało przydatne dla praktyki przemysłowej, gdyż następuje wówczas bardzo silny rozwój mikroflory i związane z nim straty w zawartości cukrów.

Analiza chromatograficzna glikofruktozanów soku topinamburu i ich hydrolizatów, z zastosowaniem układu: butanol [kwas octowy] woda, dała pewne rozszerzenie wyników Bacona i Edelmána oraz Dedondera. W soku nie hydrolizowanym stwierdzono również obecność wolnej fruktozy. Obliczono współczynniki R_f , także i dla wyższych frakcji glikofruktozanów: od „5” (0,134) do „8” (0,034) w stosowanym układzie, uzupełniając w ten sposób dotychczasowe dane w tym zakresie.

Zakwestionowano dokonaną przez Bacona i Edelmána identyfikację frakcji „2” jako glikozo-dwu-fruktozydu, wyrażając przypuszczenie, że jest ona raczej dwufruktozą.

PIŚMIENNICTWO

1. Bacon J., Edelman J.: The Action of Invertase Preparations. Arch. Bioch., 28, 1950.
2. Bacon J., Edelman J.: The Carbohydrates of the Jerusalem Artishoke and other *Compositae*. Bioch. J., 48, 1951.
3. Baillargé E.: Le topinambour, ses usages, sa culture. Flammarion, Paris 1942.
4. Chefurka W. S.: Some Observations on the Determination of Fructose by Selivanoff Reaction. Analyst, 80, 1955.
5. Colin H.: Mémoire sur les plantes à l'inuline. Rev. Gén. Bot. 31, 1919 (wg Dedonder, Année Biol. 27, 1951).

6. Conti F.: Die Inulide der Topinambur. Ztschr. f. Lebensmittel-Unters. u. Forsch., 96, 1953.
7. Dedonder R.: Les glucides du topinambour, V Hydrolyse par des enzymes de levure et *Sterigmatocystis nigra*. C. R. Ac. Sci., 232, 1951.
8. Dedonder R.: Les glucides du topinambour. Mise en évidence d'une série de glucofructosanes dans les tubercules du topinambour. Bull. Soc. Chim. Biol., 34, 1952.
9. Dedonder R.: Les glucides du topinambour. Contribution à l'étude des glucides par la méthode des hydrolyses ménagées. Bull. Soc. Chim. Biol., 34, 1952.
10. Edelman J., Bacon J.: The Action of an Enzyme Preparation from *Helianthus tuberosus* L. on Carbohydrates Present in Tubers. Bioch. J., 45, XIX (Proc.), 1949
11. Edelman J., Bacon J.: The Action of an Enzyme Preparation from *Helianthus tuberosus* L. on Carbohydrates Present in Tubers. P. II. Bioch. J., 49, 1951.
12. Edelman J., Bacon J.: Transfructosidation in Extracts of the Tubers of *Helianthus tuberosus* L. Bioch. J., 49, 1951.
13. Forsyth W.: Colour Reagents for the Paper Chromatography of Sugars. Nature, 161, nr 4085, 1948.
14. Frankenburg W.: Advances in Enzymology. Vol. VI. New York 1946.
15. Griesbeck A.: Anbau und Verwertung von Topinambur. AID Schriftenreihe, H. 40, 1952.
16. Kulka R.: Colorimetric Estimation of Ketopentoses and Ketoheksoses. Bioch. J., 63, 1956.
17. Lampe B., Deplanque R.: Verarbeitung von Topinambur zur Alkohol. Ztschr. f. Spiritusindustrie, 58, 1935.
18. Michlin D., Achunbajewa B.: Fruktozany korniej koksagiza. Biochimia, 21, 1956.
19. Myrbäck K., Summer J.: The Enzymes. Vol. I, P. I, N. York 1952.
20. Nord F., Weidenhagen R.: Handbuch der Enzymologie, Leipzig 1940.
21. Patridge S.: Application of the Paper Partition Chromatography to the Qualitative Analysis of Reducing Sugars. Nature, 158, 1946.
22. Patridge S.: Anilin Hydrogen Phtalate as a Spraying Reagent for Chromatography of Sugars. Nature, 164, 1949.
23. Pigman W.: Specificity, Classification and Mechanism of Action of Glycosidases. Adv. in Enzymology, 4. 1944.
24. Quillet M.: Séparation des glucofructosanes et des fructosanes par la chromatographie bidimensionnelle. Comparaison de l'extrait fructosidique naturel du tubercule de topinambour et de l'hydrolysate d'inuline par l'acide dilué. C. R. Ac. Sci., 244, nr 16, 1957.
25. Rüdiger M.: Verarbeitung von Topinambur auf Spiritus. Ztschr. f. Spiritusindustrie, 43, 1920 i 44, 1921.
26. Schlubach H., Florsheim W.: Untersuchungen über natürliche Polylävane. II. Hoppe-Seylers Ztschr. f. Physiol. Chemie, 198, 1931.
21. Schlubach H., Elsner H.: Untersuchungen über Fruktose-anhydride. IX Thermischer Abbau des Inulins zu einem Fruktose-anhydrid. Liebigs Ann., 497, 1932.
28. Schlubach H., Knoop H.: Die Kohlenhydrate der Topinambur, I, Liebigs Ann. 504, 1933.

29. Schlubach H., Knoop H.: Die Kohlenhydrate der Topinambur, II, Liebigs A., 504, 1933.
30. Schlubach H., Sinh O. K.: Phlein — the Ring-structure of Polyfructosans. Liebigs Ann., 544, 1940.
31. Schlubach H., Sinh O. K.: Die Grupe der natürlichen Polyfruktosane. Liebigs Ann., 544, 1940.
32. Schlubach H., Huchting Ilse: Pyrosin. Liebigs Ann., 577, 1952.
33. Schneider F., Conti F.: Methoden zur Untersuchung von Topinamburknollen. Zucker-Beihefte, 3, nr 3, 1957.
34. Tanret C.: Les sucres du topinambour. Bull. Soc. Chim. Biol., 9, 1893 (wg Dedonder, Anno Biol. S. 3, 27, 1951).
35. Warteresiewicz M.: Produkcja spirytusu z krajowych odmian bulwy czyli topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.). (maszynopis), Lublin 1960.
36. Windisch K.: Die Verrarbeitung von Topinamburkollen in der Brennerei. Ztschr. f. Spiritusindustrie, 30, 1907 i 43, 1920.
37. Zubrilin A., Miszustin E., Marczenko W.: Kiszonki. PWRiL, Warszawa 1955.

РЕЗЮМЕ

Робота является частью исследований над пригодностью топинамбура для спиртного производства. Автор поставил себе цель — изучить условия кислотного и ферментативного гидролиза глюкофруктозидов сока клубней при использовании собственной инулазы, т. е. не вводя грибной инулазы.

Сначала были изучены условия кислотного а также ферментативного гидролиза 5%-го инулинового препарата. Оптимальными для кислотного гидролиза оказались: температура 70° до 100° и кислотность 0,2 N в течение 10 до 15 минут. Действие топинамбурного сока на инулиновый препарат оказало небольшой гидролитический эффект: после прибавления 10%-го раствора сока через 8 дней гидролизу подвергалось в среднем 22,4% от общего количества высших сахаров, т.е. такое количество перешло в восстанавливающие формы.

При исследовании этого сока из топинамбура при применении к гидролизу H_2SO_4 произошло полное разложение полисахаридов на моносахара при pH — 1,40 и температуре 70° в течение 30 минут.

При автолизе сахаров собственной инулазой оптимальные условия определялись величиной pH в пределах 5,5 до 6,0 и температурой ок. 30°. Полный гидролиз происходил тогда после 6—9 суток в зависимости от исходного содержания восстанавливающих сахаров и соотношения высших сахаров с различной степенью полимеризации. Рекомендуемая более ранними исследователями температура гидролиза 55° до 56° оказалась мало действенной.

Осахаривание при температуре 30° всё же имеет малое технологическое значение, происходит при этом очень сильное развитие микрофлоры, вызывающее значительные потери в содержании сахаров.

Хроматографический анализ сахаров клубней является до некоторой степени дополнением к данным Бейкона, Эдельмана и Дедонде (Bacon, Edelman, Dedonder). В негидролизованном соке найдена свободная фруктоза.

Расчитаны коэффициенты R_f , также и для высших фракций глюкофруктозидов от „5” до „8” (0,034) при применяемой системе: бутанол (уксусная кислота) вода.

Автор подверг сомнению фракцию „2” определяемой Бейконом и Эдельманом как трисахарид (глюкодифруктозид) и предполагается что это скорее дифруктоза.

R É S U M É

Les investigations constituent une partie des recherches sur l'utilité du topinambour pour la production de l'alcool. L'auteur avait en vue la détermination des conditions favorables pour l'hydrolyse acide et enzymatique des glucofructosanes du jus par l'inulase propre, sans addition d'inulase fongiale.

Dès le début des experiments on examina les conditions de l'hydrolyse acide et enzymatique par l'inulase du jus du topinambour d'une préparation d'inuline.

On constata, que les conditions optimales pour l'hydrolyse acide sont: la température de 70—100° et l'acidité de 0,2 N, pendant 10—15 minutes.

L'hydrolyse de la préparation d'inuline sous l'influence du jus du topinambour se poursuivait peu efficacement: l'addition du jus, en quantité de 10% à la solution d'inuline 5%, effectua dans 8 jours l'hydrolyse de 22,4% (moyen) des glucides polymérisés jusqu'aux formes simples (réductives).

En examinant le jus du topinambour même, utilisant H_2SO_4 , on a obtenu une hydrolyse complète des glucofructosanes en pH = 1,40, temp. 70° après 30 minutes.

Pour l'hydrolyse des glucides du jus avec l'inulase propre on a établi des conditions optimales suivantes: pH = 5,5—6,0, temp. — ca 30°. Une hydrolyse complète fut accomplie alors pendant 6—9 jours, selon la teneur initiale des glucides réductives et les relations entre des glucofructosanes de divers degrés de polymérisation.

La température de 55—56°, recommandée par des investigateurs d'autrefois, se montra peu efficace. Toutefois la saccharification en temp.

de 30° est inconvenable pour les buts industriels à cause du développement rapide de la flore microbienne ce qui entraîne de hautes pertes des glucides.

L'analyse chromatographique des glucides du topinambour a donné certains compléments aux travaux de Bacon et Edelman et de Dedonder. On a constaté aussi la présence du fructose libre dans l'extrait non-hydrolysé. On a déterminé les coefficients R_f (envers le fructose) hors des fractions inférieures aussi pour les fractions plus polymérisées: depuis „5” (0,134) jusqu'à „8” (0,034), dans le solvant utilisé — butanol /acide acét./ eau.

On a mis en question l'identification par Bacon et Edelman de la fraction „2” comme gluco-di-fructoside en exprimant une supposition qu'elle constitue plutôt un difructose.