

УДК 631.547:581.19:633.521

С. И. ВАКУЛА<sup>1</sup>, Л. В. КОРЕНЬ<sup>1</sup>,  
Л. М. ШОСТАК<sup>2</sup>, В. В. ТИТОК<sup>1</sup>

## ТЕРМОГРАВИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ СЕМЯН ЛЬНА КУЛЬТУРНОГО (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

<sup>2</sup>Белорусский государственный технологический университет

(Поступила в редакцию 03.11.2008)

Экспериментально обоснована возможность использования термогравиметрического анализа в систематике, биохимии и физиологии льна культурного. Установлены оптимальные условия анализа валового содержания белка и масла во фракции семядолей с зародышем из семян льна. Сравнение данных о содержании биологически активных компонентов в семенах льна, полученных аналитическими методами Кьельдаля и Сокслета, с результатами физико-химической оценки состава семян подтверждает целесообразность использования термогравиметрического анализа. Выявлена достоверная корреляция величины энергии активации с содержанием насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в масле семян льна. Выявлено, что классификация сортов льна культурного на основании данных термогравиметрического анализа высокоэффективна и соответствует систематическому положению исследуемых образцов.

### Введение

Популярность льна на рынке функциональных продуктов питания обусловлена его профилактическими и протекторными свойствами к ряду заболеваний сердечно-сосудистой и пищеварительной систем, гормонозависимым формам рака [1]. Лен столетиями использовался в качестве естественного лекарственного средства, цельные семена и продукты их переработки широко применяются для производства функциональных диетических продуктов и пищевых добавок. Физиологические эффекты льняного семени обусловлены высоким содержанием биологически активных соединений — масла,  $\alpha$ -линоленовой кислоты, лигнанов, растворимых полисахаридов и диетического белка (аминокислотный индекс ~69 [2]).

Получение информации о химическом составе биологических объектов — важный, наиболее трудоемкий этап современных исследований, предпосылка

создания новых технологий переработки и практического использования материалов растительного и животного происхождения. Важную группу методов исследования веществ составляют термоаналитические методы, в основе которых лежит изучение свойства образца при изменении температуры в заданных условиях [3]. Благодаря высокой чувствительности и объективности методы термического анализа получили широкое распространение в научных исследованиях и производственной практике. Эти методы позволяют получать ценную информацию о строении, составе и свойствах твердых тел и жидкостей различной природы, о физических и химических процессах, протекающих в них при нагревании и охлаждении [4; 5]. Применительно к биологии преимущество термогравиметрического анализа заключается в использовании минимальных навесок исследуемого материала и, следовательно, в возможностях анализа индивидуальных образцов — целостного организма, органа или ткани [6].

Динамическая термогравиметрия (ТГ) — метод термического анализа, регистрирующий изменение массы образца в зависимости от изменяемой по заданному закону температуры (например, с постоянной скоростью). Экспериментально получаемая кривая зависимости массы от температуры (термогравиметрическая кривая) характеризует термостабильность и свойства образца на начальных и промежуточных стадиях анализа, а также состав остатка. В случае фазовых переходов на кривой появляются пики или изломы. Большинство переходов сопровождается эндотермическими эффектами; экзотермичны лишь некоторые процессы окисления-восстановления и структурного превращения [7].

Целью нашего исследования являлось изучение возможности использования термогравиметрического анализа содержания основных запасных компонентов в семенах для скрининга и классификации изучаемых сортов и образцов льна культурного (*Linum usitatissimum* L.).

### Материал и методы

Материал исследования — 19 сортов и сортообразцов льна масличного (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum* convar. *humile*) различного генетического и географического происхождения: Mivast, Atalante (Франция); Glenelg (Австралия); Linota, SU-1-10 (США); K 5827 (Уругвай); Gold Flax, McGregor, Somme, L 6582, Flanders (Канада); Sandra (from Dr M. Pavelek); Cyan (Польша); K 2398 (Китай); Воронежский, K 5627, Небесный (Россия); ЛМ-1, ЛМ-2 (Беларусь). Дополнительно были использованы сорта: Blue Chip, Deep Pink, K-6570, Antares, Sandra, Raluca, Flanders, Natasja, Liral Prince, Liral Crown, Wiera, Raisa, Liral Dominion, Stormont Gossamer, Hera, Marina, Cascade, предоставленные Plant Gene Resources of Canada. Экспериментальный материал получен на опытных полях Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Термогравиметрический анализ семян льна масличного (навеска 3,2–5,1 мг) проводили на термоанализаторе TA-4000 (модуль ТГ-50) (Mettler Toledo STARE System, Швейцария), в интервале 25–700 °С при скорости нагревания 5 °С/мин и расходе воздуха 200 мл/мин. Кривые потери массы рассчитаны при помощи программного обеспечения STARE.

Содержание белка в семенах определяли классическим микрометодом Кельдаля [8]. Коэффициент пересчета содержания белка для семян масличных культур (подсолнечника, льна и хлопчатника) составляет 5,3 [9].

Определение содержания масла в семенах проводили экстракционным методом в аппарате Сокслета смесью гексан : изопропанол (1 : 1) в течение 18–24 ч [10].

Экстракцию и определение жирных кислот осуществляли по модифицированному методу Welch на газожидкостном хроматографе Hewlett-Packard 4890D, оснащённом пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой HP-Innowax 0,32 мм × 30 м, размер носителя 0,5 мкм. Индивидуальные жирные кислоты идентифицировали по времени их удержания при разделении стандартных смесей (Supelco Parc, USA) и оценивали в процентах от весового суммарного содержания по отношению к внутреннему стандарту [11].

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 7.0 (StatSoft, США).

### Результаты и обсуждение

Экспериментально получаемая кривая зависимости изменения массы от температуры (ТГ) позволяет судить о термостабильности и составе целостного семени льна в начальном состоянии, о термостабильности промежуточных продуктов деградации и остаточной зольности в температурном диапазоне 25–700 °С (рис. 1). Дифференциально-термогравиметрическая кривая (ДТГ) позволяет более полно определять температуры начала и окончания реакции и по ее пику судить о температуре максимальной скорости реакции горения.

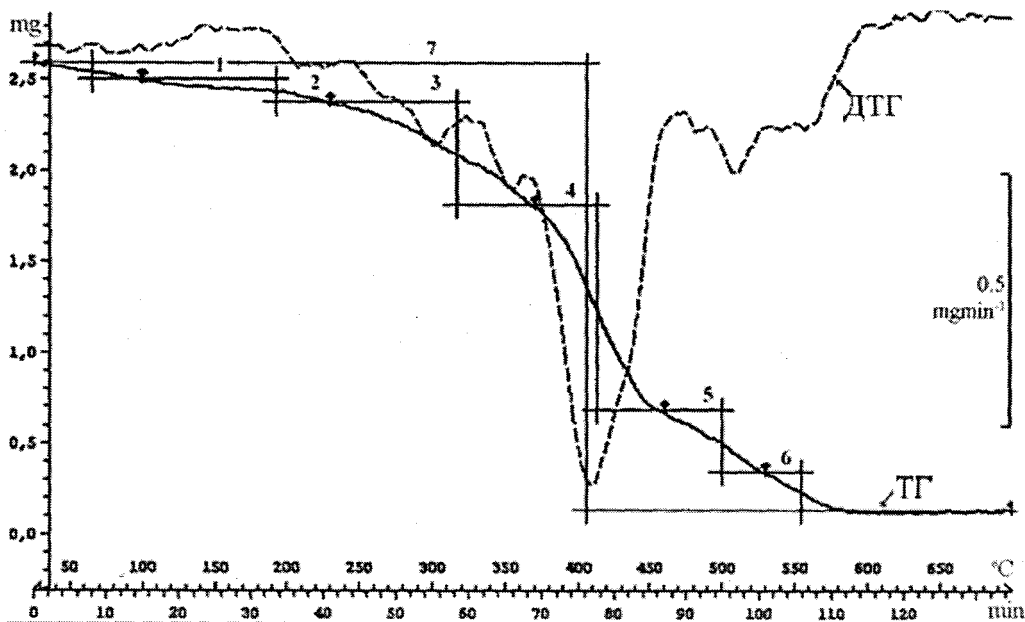


Рис. 1. Термогравиметрический анализ льняного семени сорта Atalante. «—» — кривая потери массы (ТГ); «- -» — дифференциальная кривая потери массы (ДТГ). Интервалы термодеструкции компонентов льняного семени (в °С): 1 — вода 25–100; 2 — низкомолекулярные белки 100–230; 3 — основная белковая фракция 230–370; 4 — жирные кислоты 370–460; 5 — нуклеотиды 460–530; 6 — лигнины 530–700; 7 — диапазон термодеструкции льняного семени 25–700

Анализ кривой ДТГ показал, что при сгорании цельных семян (рис. 1) на первом этапе термодеструкции из образца удаляется вода (1, 25–100 °С), затем последовательно распадаются протеины (3, 230–370 °С), жирные кислоты (4, 370–460 °С), нуклеотиды (5, 460–530 °С) и соединения лигнинового ряда (6, 530–700 °С). Оставшийся зольный остаток используется для анализа микроэлементного состава семян льна. Анализ особенностей ТГ кривой проводят по дополнительному графику — кривой ДТГ, представляющей собой график изменения кинетических параметров в процессе терморазложения исследуемых образцов [12].

Исходя из того, что потеря массы вещества при горении подчиняется уравнению кинетики первого порядка и соблюдается линейная зависимость —  $\ln 100/100 - \Delta m$  от  $T(K)$ , расчет энергии активации ( $E_a$ ) проводили по методу А. Вроидо [12], основанному на математической обработке кривой ТГ:

$$\ln (\ln 100/100 - \Delta m) = E_a/R + 1/T + C,$$

где  $\Delta m$  — потеря массы в %,  $T$  — температура в К,  $R$  — универсальная газовая постоянная,  $E_a$  —  $\text{тг } \phi - 8.31$ ,  $C$  — постоянная.

Для выбора оптимальных условий ТГ анализа семян льна были исследованы теплофизические свойства цельного льняного семени, семядолей с зародышем — интактных и обезжиренных, семенных оболочек льна. Обезжиривание семядолей проводилось многократной экстракцией гексаном. Анализ данных сжигания семядолей и семенных оболочек подтверждает представления о преобладании в семядолях жиров, а в оболочке семян полисахаридных и белковых компонентов [13]. Диапазоны горения основных белковых компонентов семядолей льна соответствуют таковым для риса, пшеницы и сои [14], что доказывает сходство биофизических параметров запасных белков семян. На рис. 2 представлены ТГ и ДТГ кривые сжигания целостных и обезжиренных семядолей. Удаление липидов приводило к изменению характера ТГ и ДТГ кривых, что свидетельствует об изменении состава компонентов, подвергнутых термодеструкции. При сжигании обезжиренных семядолей (рис. 2, А) отмечено, что относительное снижение содержания липидов приводило к снижению пика ДТГ с максимумом 410 °С, соответствующего температурам термодеструкции триацилглицеролов. Соответственно увеличился компонент с максимумом горения при 297 °С, отражающий возрастание удельной доли белковых компонентов, содержание которых в семядолях льна маслячного достигает 25 % от сырой массы семени. На ДТГ кривой цельных семядолей эндотермические изломы белковых компонентов (~230–370 °С) выражены нечетко, также слабо выражены эндотермические пики нуклеиновых кислот и лигниноподобных компонентов семян (рис. 2, Б).

Соотношение ключевых запасных компонентов семян — протеинов и жирных кислот в семядолях и оболочках семян льна различается [13]. Основную запасающую функцию выполняют семядоли, достаточно плотная семенная оболочка пронизана по всему объему полисахаридными компонентами [15] и значительно затрудняет диффузию кислорода по всему объему сгорания семени. Таким образом, представляется логичным анализировать валовое содержание компонентов не по их содержанию в целостных семенах, а во фракции

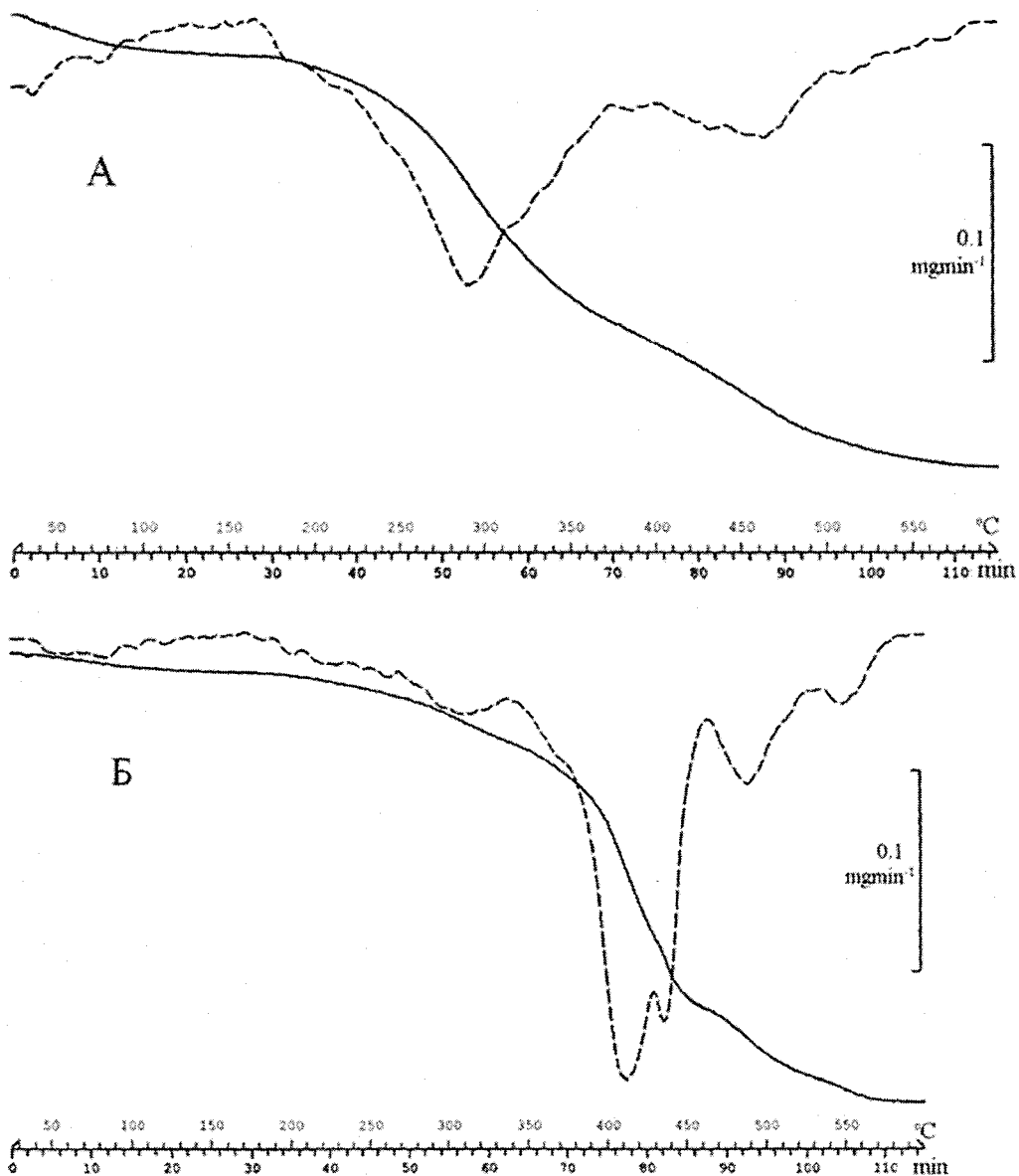


Рис. 2. Термогравиметрический анализ обезжиренных (А) и целостных (Б) семян сорта Небесный. «—» — кривая потери массы (ТГ); «- -» — дифференциальная кривая потери массы (ДТГ)

семян с зародышем. По этой же причине и анализ отдельно взятых оболочек семян льна масличного методом термогравиметрического анализа нецелесообразен. Поэтому для дальнейших исследований были использованы навески семян с зародышем.

В таблице представлены данные по содержанию белка и масла в семенах сортов льна масличного, полученные при термогравиметрическом определении

содержания основных компонентов семени льна масличного в сравнении с данными, полученными на том же растительном материале микрометодами Кьельдаля и Сокслета.

Приведенные результаты свидетельствуют о высокой степени сходимости содержания масла и белка в семенах, определенных физико-химическим и аналитическим методами, что подтверждается статистически. Коэффициент корреляции между содержанием белка, полученным методом ТГ и классическим аналитическим методом Кьельдаля, отличающимся наибольшей точностью, составил 0,80; между содержанием масла, полученным в аппарате Сокслета и ТГ методом, равен 0,71 (достоверно при  $P < 0,01$ ). Полученные результаты указывают на целесообразность использования термогравиметрического анализа для определения содержания биологически активных компонентов в семенах льна масличного.

**Т а б л и ц а.** Содержание масла и белка (%) в семенах образцов льна масличного по данным термогравиметрического анализа (ТГ) и аналитических методов Кьельдаля (К) и Сокслета (С) (приведены средние величины из трех биологических повторностей)

Сорт	Масло		Белок	
	ТГ	С	ТГ	К
К-2398	43,73	41,16	20,46	19,54
Gleneig	44,48	42,07	22,26	22,30
Linota	44,93	40,25	22,12	21,15
Л-6582	45,01	44,42	20,30	20,10
Воронежский	45,08	42,85	20,63	21,51
Gold Flax	45,25	46,00	20,13	20,49
Atalante	46,42	46,27	21,21	22,05
Flanders	46,65	45,46	21,23	20,96
Omega	46,79	45,48	21,92	21,44
SU-1-10	47,07	46,24	20,71	20,47
Mc Gregor	47,35	45,51	21,68	20,70
Somme	47,48	46,86	22,15	22,08
Sandra	47,61	44,24	22,72	22,58
ЛМ- 1	47,82	51,22	20,36	20,29
ЛМ -2	48,25	50,34	20,39	20,46
К-5827	48,96	47,31	22,70	23,01
Небесный	51,15	47,19	20,06	20,24
К-5627	51,34	49,43	21,85	20,67
Циан	52,21	47,77	20,08	20,70

Энергия, затраченная на термодеструкцию жирнокислотного компонента семени, может являться косвенной характеристикой качественного состава льняного масла. Выявлены достоверная обратная зависимость значений  $E_d$  с содержанием насыщенных жирных кислот и достоверная зависимость величин  $E_d$  с уровнем ненасыщенных жирных кислот в масле сортов льна (рис. 3, 4). Таким образом, образцы с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот в масле характеризуются более высоким значением энергии активации.

Жирнокислотный состав льняного масла определяется генотипом исследуемого образца и влиянием окружающей среды. Сравнительный анализ жирнокислотного состава масла из семян льна урожая различных лет показал, что содержание ненасыщенных жирных кислот в масле сортов 2006 г. были ниже, чем в семенах 2004 г. Среднее значение  $E_a$  сжигания триацилглицеролов в 2006 г. также ниже значений 2004 г. —  $81,89 \pm 1,32$  и  $70 \pm 1,05$  соответственно. Высокие величины  $E_a$  и содержание ненасыщенных жирных кислот характерны для сортов Циан, К-5627. Низкие величины  $E_a$  в оба года исследования отмечены у сортов Glenelg, ЛМ-1, ЛМ-2, SU-1-10, К-6570, которые наряду с невысоким общим содержанием характеризуются низким содержанием ненасыщенных жирных кислот в масле семян. Графическое сравнение исследуемых параметров представлено на рис. 5.

Термогравиметрический анализ характеризуется высокой точностью, позволяет получать данные о химическом составе семени и использовать для этого микронавески для проведения анализа материала с одного растения льна, что имеет важное значение в селекционно-генетических исследованиях. Результаты ТГ можно использовать не только для анализа состава се-

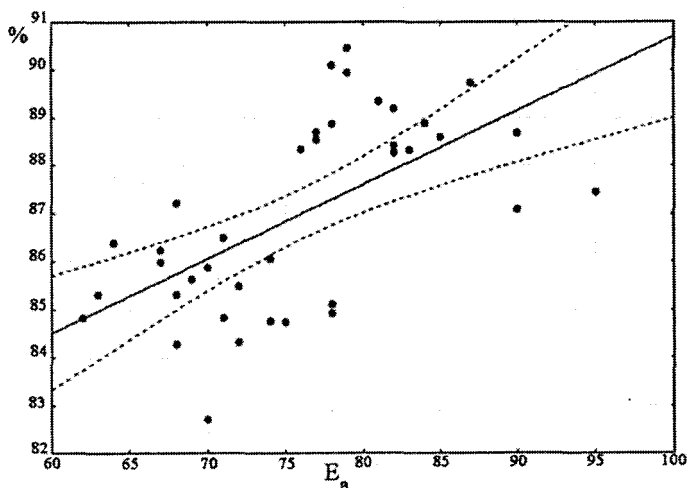


Рис. 3. Высокодостоверная корреляция ( $0,61; p = 0,0004$ ), обнаруженная между значениями энергии активации ( $E_a$ ) и содержанием ненасыщенных жирных ( $NS\%$ ) кислот 19 сортов льна урожаев 2004 и 2006 гг. Зависимость можно приблизительно описать линейным уравнением  $NS = 75,244 + 0,155E_a$ . Границы доверительного интервала соответствуют  $p = 0,05$

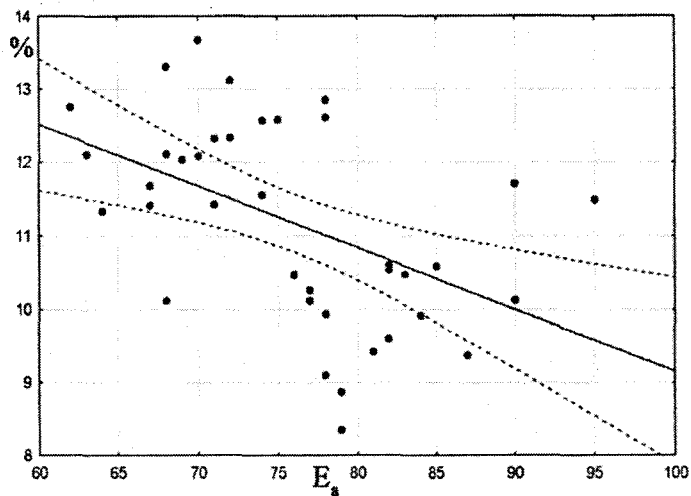


Рис. 4. Высокодостоверная корреляция ( $r = -0,49; p = 0,002$ ), обнаруженная между значениями энергии активации ( $E_a$ ) и содержанием насыщенных жирных ( $N\%$ ) кислот 19 сортов льна урожаев 2004 и 2006 гг. Зависимость можно приблизительно описать линейным уравнением  $N = 17,559 - 0,084 E_a$ . Границы доверительного интервала соответствуют  $p = 0,05$

для этого микронавески для проведения анализа материала с одного растения льна, что имеет важное значение в селекционно-генетических исследованиях. Результаты ТГ можно использовать не только для анализа состава се-

мян, но и для классификации образцов льна по комплексу определяемых признаков.

Для классификации был применен кластерный анализ на основе алгоритма объединения (древовидная кластеризация). К основным систематическим признакам семян льна относятся их размер, содержание и состав масла [16]. Зольность косвенно связана с размером семени. Опосредованными ТГ характеристиками жирнокислотного компонента являются  $E_a$  и массовая доля фрак-

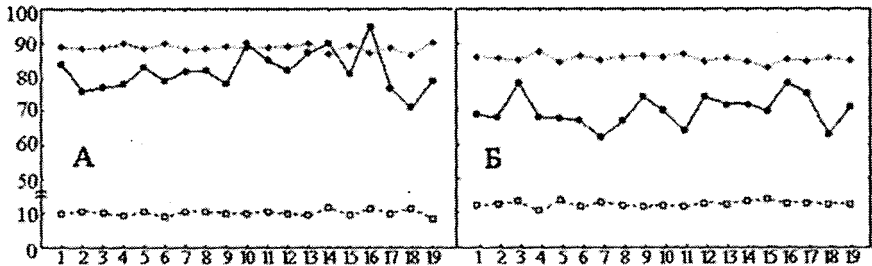


Рис. 5. Энергия активации ( $E_a$ ) и состав жирнокислотного компонента семян 19 сортов льна масличного: 1 — Atalante, 2 — Glenelg, 3 — Gold Flax, 4 — Linota, 5 — McGregor, 6 — Omega, 7 — Sandra, 8 — Somme, 9 — Воронежский, 10 — К-5627, 11 — К-5827, 12 — ЛМ-1, 13 — ЛМ-2, 14 — Небесный, 15 — SU-1-10, 16 — Циан, 17 — Л-6582, 18 — К-6570, 19 — Flanders в различные годы анализа. А — 2004 г.; Б — 2006 г.  $\blacklozenge$  — % ненасыщенных жирных кислот;  $\square$  — % насыщенных жирных кислот;  $\bullet$  — энергия активации ( $E_a$ ).

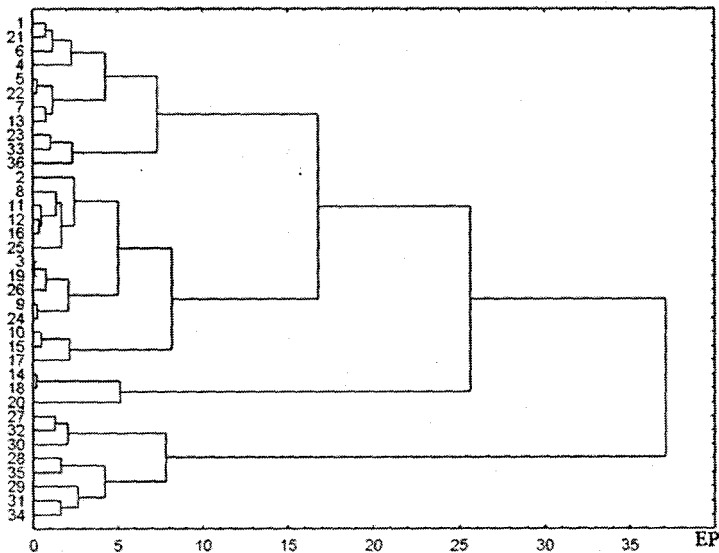


Рис. 6. Кластерный анализ сортов льна культурного: 1 — Antares, 2 — Atalante, 3 — Blue Chip, 4 — Glenelg, 5 — Gold Flax, 6 — Deep Pink, 7 — Linota, 8 — McGregor, 9 — Omega, 10 — Raluca, 11 — Sandra, 12 — Somme, 13 — Воронежский, 14 — К-5627, 15 — К-5827, 16 — ЛМ-1, 17 — ЛМ-2, 18 — Небесный, 19 — SU-1-10, 20 — Циан, 21 — К-2398, 22 — Л-6582, 23 — К-6570, 24 — Flanders, 25 — Mivast, 26 — Flanders, 27 — Natasja, 28 — Wiera, 29 — Liral Dominion, 30 — Liral Crown, 31 — Stormont Gossamer, 32 — Liral Prince, 33 — Cascade, 34 — Hera, 35 — Raisa, 36 — Marina. EP — Евклидово расстояние



ции, сгорающей при 370—460 °С (температура деструкции липидов). По данным этих трех характеристик (зольность, содержание масла, энергия активации) была построена дендрограмма кластеризации (рис. 6). В работе использованы 36 сортов, из которых 26 — кудряши (лен масличный), 2 — промежуточные формы (лен-межеумок) и 8 — лен-долгунец.

Мелкосемянные, низкомасличные долгунцы (Natasja, Liral Prince, Liral Crown, Wiera, Raisa, Liral Dominion, Stormont Gossamer, Hera) образуют кластер, удаленный на 37,1 евклидовой единицы от сложного кластера, образованного 28 масличными формами. Большой кластер образован 2 подкластерами, из которых наиболее информативен малый, состоящий из 3 сортов подкластер, характеризующийся максимальным содержанием масла и крупным размером семян (Циан, Небесный и К-5627). Размер большого кластера составляет 24 единицы, крайние сорта Циан и Marina относятся к масличным и промежуточным формам соответственно. Сорта Cascade и Marina, относящиеся к межеумкам, удалены от кластера долгунцов на 13,1 единицы. Полученные результаты, по нашему мнению, свидетельствуют, что использование данных термогравиметрического анализа для классификации льна культурного по признакам семян высокоэффективно и соответствует систематическому положению исследуемых образцов.

### Заключение

Применение термогравиметрического анализа химического состава семян льна позволяет одновременно получить данные о содержании всех основных запасных веществ семени: белка, масла, нуклеиновых кислот, лигнинов, а также оценить содержание влаги и зольных элементов. Оптимальными условиями проведения опыта является сжигание семядолей с зародышами без оболочек в температурном диапазоне 25—700 °С. Высокая эффективность и достоверность анализа подтверждается сравнением результатов ТГ с данными, полученными аналитическими методами (микрометоды Кьельдаля и Сокслета). Использование результатов термогравиметрии для классификации изучаемых образцов позволяет дифференцировать долгунцовые и масличные формы льна культурного. Кластерная диаграмма, построенная по признакам термогравиметрического анализа, соответствует систематическому положению исследуемых образцов.

Таким образом, инструментальный метод термогравиметрического анализа позволяет дифференцировать исследуемые образцы в соответствии со стандартными технологическими характеристиками качества семян льна культурного. Величина энергии активации процесса термодеструкции масла отражает содержание жирных кислот у исследуемых образцов и позволяет судить о наличии примесей. Термогравиметрический анализ, по нашему мнению, может служить надежным и воспроизводимым методом оценки содержания биологически активных компонентов, позволяет количественно охарактеризовать особенности термической дегградации масла и белка в семенах льна. Использование термических методов в биологии позволяет не только получить ценную информацию о составе и свойствах изучаемых объектов, но и эффективно

проводить их классификацию и анализировать возможности практического использования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б06-045).

### Литература

1. M a z z a G., O o m a h D. // Flaxseed in Human Nutrition. Champaign IL. 1995. P. 56—81.
2. O o m a h B. D. // J. Sci. Food Agric. 2001. Vol. 81, № 8. P. 889—894.
3. М а й о р о в а А. Ф. // Соросовский образовательный журн. 1998. № 10. С. 50—54.
4. У э н д л а н д т У. // Термические методы анализа. М., 1978. С. 145—212.
5. П и л о я н О. Г. Введение в теорию термического анализа. М., 1964. — 218 с.
6. Л е о н т ъ е в В. Н. и др. // Материалы, технологии, инструменты. 2005. Т. 10, № 4. С. 109—115.
7. Ш е с т а к Я. Теория термического анализа. М., 1987. — 328 с.
8. П е т р о в К. П. // Методы биохимии растительных продуктов. Киев, 1978. С. 224.
9. D a u n J. K., D e s l e r s q D. R. // Proceedings of the 55th Meeting of the Flax Institute of the United States. Fargo North Dakota. 1994. P. 192—200.
10. AOAC Official Methods of Analysis. 14th ed. Arlington. VA. 1984. P. 507.
11. W e l c h R. W. // J. Sci. Food Agr. 1977. Vol. 28, № 4. P. 635—638.
12. П р о к о п ч у к Н. Р. Кинетический принцип прогнозирования зависимости механических свойств волокон и пленок от их химического строения и состава: Автореф. ... д-ра хим. наук. Киев, 1989. — 34 с.
13. Х и б х е н о в Л. В., С п е р а н с к и й В. В. Практикум по анатомии пищевого сырья: Учеб. пособие. Улан-Уде, 2007. — 72 с.
14. M a g o s h i J., B e c k e r M. A., N a k a m u r a S. // J. Therm. Anal. Calor. 2002. Vol. 70, № 6. P. 833—839.
15. W a n n e r b e r g e r K., N y l a n d e r T., N y m a n M. // Acta Agric. Scand. 1991. Vol. 41. P. 311—319.
16. D i e d e r i c h s e n A., R a n e y J. P. // Plant Breeding. 2006. Vol. 125. P. 372—377.

S. I. VAKULA, L. V. KOREN, L. M. SHOSTAK, V. V. TITOK

#### THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS OF FLAXSEED (*LINUM USITATISSIMUM* L.) BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS

#### Summary

Possibilities and application of differential thermogravimetric analysis (TG) in flax biology studies were analyzed. TG analysis is a very effective and informative method of components study in biology. TG optimal conditions of flaxseed analysis were experimentally established (test of cotyledon-embryo fraction). Comparison of data of Kjeldal and Soxlet with TG results corroborates validity of thermal analysis in estimating flaxseed composition. Significant correlation between EA values and contents of the saturated/unsaturated fatty acids was revealed. Flax cultivar classification based on TG data was revealed as highly effective and corresponding to systematic position of investigated samples.