

ILONA GAŁĄZKA, ROBERT KLEWICKI, KATARZYNA GRZELAK

HYDROLIZA FRUKTANÓW W WARUNKACH SYMULUJĄCYCH DZIAŁANIE SOKU ŻOŁĄDKOWEGO

Streszczenie

Fruktany, podobnie jak błonnik, nie ulegają trawieniu w przewodzie pokarmowym ze względu na brak w soku żołądkowym, trzustkowym i jelitowym enzymów hydrolizujących wiązania β -(2 \rightarrow 1) glikozydowe, jednakże ulegają one częściowej hydrolizie w środowisku kwaśnym.

Celem pracy była hydroliza fruktanów w warunkach symulujących działanie soku żołądkowego. Hydrolizę prowadzono w temp. 36,6–37°C, w ciągu 30–180 min, przy pH = 2, a w przypadku mączki cykoriowej z użyciem pepsyny. Badaniom poddano handlowe preparaty fruktooligosacharydów: FOS Wako Pure, Raftilose oraz preparaty otrzymane w Politechnice Łódzkiej: preparat FOS-PŁ, inulinę krystaliczną z cykorii, mączkę cykoriową, nystozę oraz sacharozę. Do oznaczenia składu preparatów przed i po hydrolizie zastosowano chromatografię cieczową HPLC.

Stwierdzono, że stała szybkości hydrolizy fruktanów wyznaczona wg mechanizmu reakcji jednocząsteczkowej wynosi od 0,0006 do 0,0035. Najbardziej odporne na hydrolizę, prowadzoną w warunkach symulujących działanie soku żołądkowego, były: inulina krystaliczna, której po upływie 180 min pozostało 95% początkowej ilości oraz inulina zawarta w nisko przetworzonej mączce cykoriowej (93%). Najłatwiej ulegały hydrolizie preparaty zawierające β -fruktooligosacharydy homogenne (Raftilose) oraz oligomery o DP 3-4 (FOS Wako Pure, FOS-PŁ). Najwięcej cukrów metabolizowanych (do 30%) uwalniało się podczas hydrolizy preparatów (Wako Pure i FOS-PŁ) zawierających jako główne FOS kestozę, nystozę i fruktozylonystozę.

Słowa kluczowe: cykoria, fruktany, fruktooligosacharydy (FOS), inulina, hydroliza.

Wstęp

Fruktany są polimerami β -fruktofuranozy połączonej wiązaniem β -(2 \rightarrow 1) z wiązaniami α -(1 \rightarrow 2) ostatniej cząsteczki glukopiranozy. Stopień polimeryzacji (DP) może wynosić od 2 do 70. Dzielią się one na krótkołańcuchowe i długołańcuchowe. Fruktany krótkołańcuchowe są powszechnie nazywane fruktooligosacharydami (FOS) lub oligofruktozą, ich stopień polimeryzacji DP wynosi od 3 do 10. Najpowszechniej występującymi fruktooligosacharydami są: kestoza, nystoza, fruktozylonystoza [16].

Długołańcuchowe fruktany, powszechnie nazywane inuliną, mają stopień polimeryzacji DP od 10 do 70 w zależności od pochodzenia [1, 3, 9].

Omawiane związki występują w roślinach należących do *Liliaceae*, jak: cebula, czosnek, por oraz do *Compositae*: cykoria, topinambur, niektórych roślin jednoliściennych, takich jak: pszenica, żyto, jęczmień, banany [2, 11, 12, 15]. Wytwarzane są przez około 15% różnych gatunków roślin kwitnących oraz przez bakterie, głównie *Streptococcus mutans* i grzyby *Aureobasidium pullulans* i *Aspergillus niger* [14, 15].

Fruktany zaliczane są do prebiotyków, gdyż pozytywnie wpływają na mikroflorę jelita grubego, stymulując rozwój bakterii dobroczynnych, takich jak: *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Namnażanie tych bakterii hamuje rozwój mikroflory patogennej, a tym samym powstawanie kancerogenów [7, 9]. Sacharydy te ulegają w jelicie grubym fermentacji bakteryjnej, wskutek której powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe oraz następuje obniżenie pH środowiska. Obecność FOS w jelicie grubym powoduje 20-procentowy wzrost przyswajalności wapnia i magnezu [17]. Wykazują one zdolność do zmniejszania poziomu cholesterolu w osoczu krwi [4, 6]. Inulina i oligosacharoza stanowią specyficzną frakcję błonnika pokarmowego, cennego w przypadku diet niskoenergetycznych. W znacznej mierze zainteresowanie fruktanami jest związane z ideą żywności funkcjonalnej, która wywiera pozytywny wpływ na zdrowie człowieka [15].

Na rynku europejskim występują preparaty fruktanów, które są otrzymywane z korzeni cykorii (fruktany długołańcuchowe) w wyniku hydrolizy inuliny (Orafti – Raftilose P-95) oraz wytwarzane w wyniku transglikozylacji w roztworach sacharozy (Actilight, Meiologo, Nutraflora i FOS Wako Pure) [2, 8, 13]. Niezbędną dawkę FOS, w ilości 8-12 g/dobę/osobę [3], konieczną do osiągnięcia pożądanych skutków, trudno jest uzyskać przy spożywaniu produktów naturalnych. W związku z tym coraz powszechniejsza staje się potrzeba suplementowania wybranych artykułów żywnościowych preparatami fruktanów.

Fruktany nie ulegają trawieniu w przewodzie pokarmowym ze względu na brak w soku trzustkowym i jelitowym enzymów hydrolizujących wiązania β -2-1 glikozydowe, jednakże można oczekiwać, że ulegają one częściowej hydrolizie w środowisku kwaśnym.

Celem pracy była ocena stopnia hydrolizy wybranych fruktanów w warunkach symulujących działanie soku żołądkowego.

Materiał i metody badań

Badaniom poddano handlowe preparaty fruktooligosacharydów: Raftilose, FOS Wako Pure oraz preparaty otrzymane w Politechnice Łódzkiej: preparat FOS-PŁ, nystozę (otrzymane w wyniku transglikozylacji sacharozy), inulinę krystaliczną z cykorii wg [5], mączkę cykoriową oraz sacharozę.

Preparaty o stężeniu 50–200 g/1000 ml zostały poddane hydrolizie w warunkach symulujących działanie soku żołądkowego. Hydrolizę prowadzono w temp. 36,6–37,0°C

przy pH 2,0, a w przypadku mączki cykoriowej zastosowano enzym pepsynę. Czas hydrolizy był zbliżony do okresu, w jakim pokarm przebywa w żołądku i wynosił od 30 do 180 min. Preparaty po hydrolizie zobojętniano stosując anionit Amberlite. Skład preparatów przed i po hydrolizie analizowano metodą chromatografii cieczowej - HPLC.

Analizę chromatograficzną prowadzono w chromatografie firmy Knauer, z systemem sterowania danych EuroChrom 2000, z zastosowaniem detektora RI i kolumny Aminex HPX-C87. Elucję wodną prowadzono z szybkością przepływu 0,5 ml/min. Roztwory po hydrolizie i zobojętnieniu rozcieńczano wodą w stosunku 1:3 i nastrzykiwano do układu chromatograficznego. Wszystkie oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Skład oligomeryczny preparatów przed hydrolizą przedstawiono w tab. 1.

W trakcie hydrolizy kwasowej, symulującej warunki działania soku żołądkowego, stwierdzono zmiany jakościowe i ilościowe składu fruktanów w preparatach, związane z uwalnianiem reszty fruktozy od końca łańcucha fruktozylowego. W sposób graficzny przedstawiono zmiany ilościowe oligomerów w preparatach: FOS-PŁ (rys. 1) Raftilose (rys. 2), oraz w mączce z cykorii (rys. 3), które prowadziły do wzrostu udziału fruktozy oraz oligomerów o niższym DP w mieszaninie sacharydów.

W tab. 2. przedstawiono ilość fruktozy uwolnionej podczas hydrolizy. Po 180 min najwięcej fruktozy (13%) uwalniało się w trakcie hydrolizy preparatów zawierających w swoim składzie fruktany krótkołańcuchowe tj. Raftilose, którego głównymi składnikami były oligomery samej fruktozy: inulotrioza, inulotetraoza oraz w przypadku preparatu Wako Pure, który w swoim składzie nie zawiera oligomerów wyższych niż DP > 4. Podczas hydrolizy FOS-PŁ uwalniało się około 10% fruktozy po 180 min.

Najmniej fruktozy powstało w trakcie hydrolizy sacharozy, inuliny i nystozy (około 5%). W przypadku mączki cykoriowej poddanej hydrolizie ilość powstałej fruktozy po 180 min wynosiła 6% (rys. 3.).

Stałe szybkości hydrolizy (K) fruktanów wyznaczone wg mechanizmu reakcji jednocząsteczkowej wyniosły: inulina krystaliczna – 0,0006; FOS-PŁ – 0,0025; Raftilose – 0,0035; Wako Pure 0,0023; nystoza – 0,0006; sacharoza – 0,0005; mączka cykoriowa – 0,0007; mączka cykoriowa + pepsyna – 0,0009. Im wartość stałych szybkości hydrolizy jest niższa tym wolniej zachodzi proces. Najwolniej hydroliza zachodziła w przypadku sacharozy, nystozy, inuliny krystalicznej, najszybciej w preparatach zawierających fruktany krótkołańcuchowe.

Tabela 1

Skład oligomeryczny badanych preparatów FOS [%].
Oligomeric composition [%] of FOS preparations investigated.

Preparaty Preparations	IN	F	G	INB	S	FOS							
						INR	K	INT	N	INP	FN	DP6	DP7
Raftilose	-	3,8	-	3,8	-	27,4	-	29,2	-	10,4	7,9	13	4,5
Wako Pure	-	1,6	0,4	-	2,5	-	37,1	-	49	-	8,7	0,7	-
FOS-PŁ	-	1,9	3,7	-	3,7	2,1	21,7	-	48,9	-	16,5	1,6	-
Inulina Inulin	95	1	1,1	-	1,2	1,8							
Mączka cykoriowa Chicory dry pulp	79	4,7	1,5	0,4	10,8	3,6							
Nystoza Nystose	-	-	-	-	-	-	-	-	98,8	-	1,2	-	-
Sacharoza Saccharose	-	-	-	-	100	-							

Objaśnienia:

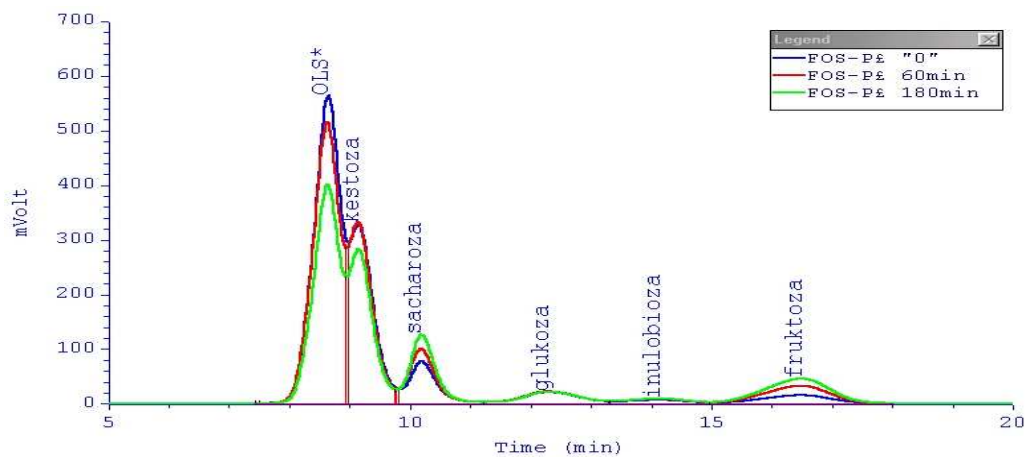
IN – inulina / inulin; F – fruktoza / fructose; G – glukoza / glucose, INB – inulobioza / inulobiose; S – sacharoza / saccharose; INR – inulotrioza / inulotriose; K – kestoza / kestose; INT – inulotetraoza / inulotetraose, N – nystoza / nystose; INP – inulopentaoza / inulopentaose, FOS – fruktooligosacharydy / fructooligosaccharides

Tabela 2

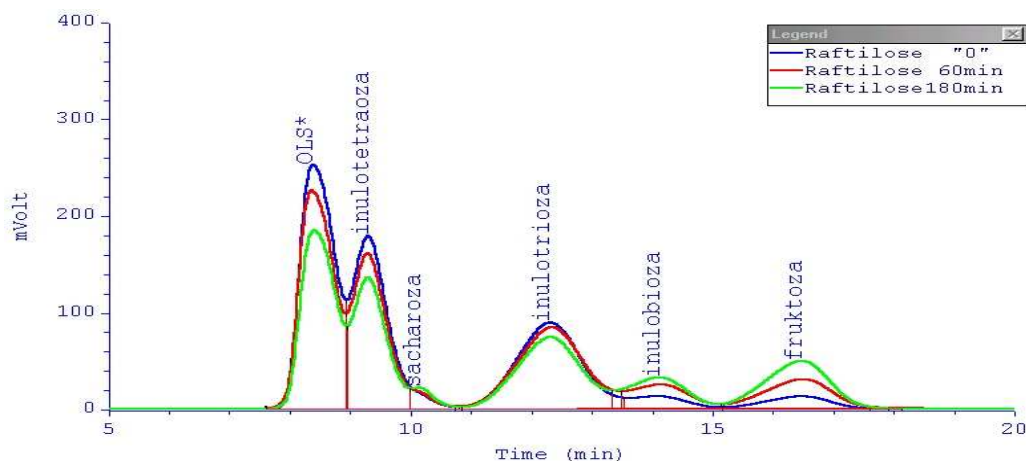
Przyrost fruktozy uwolnionej podczas hydrolizy preparatów FOS [%].

Increase [%] in the amount of fructose released while FOS preparations are hydrolysed.

Czas hydrolizy Time of hydrolysis	Preparaty handlowe Commercial preparations		Preparaty otrzymane w PŁ Preparations obtained in PŁ					
	Raftilose	Wako Pure	FOS-PŁ	Mączka cykoriowa Chicory dry pulp	Mączka cykoriowa + pepsyna Chicory dry pulp+pepsyne	Inulina Inulin	Nystoza Nystose	Sacharoza Saccharose
30	2,4	2	1,7	0,2	1,3	0,7	1,1	1,3
60	6,1	4,4	4	1,2	2,1	1,1	2,1	2
90	8,5	6,6	5,3	3,7	3,1	1,5	3,1	2,3
120	10,8	9,1	6,7	4,8	5	2,2	4,3	2,6
180	13	12,5	9,4	6,5	6,2	4,8	5,3	4,4

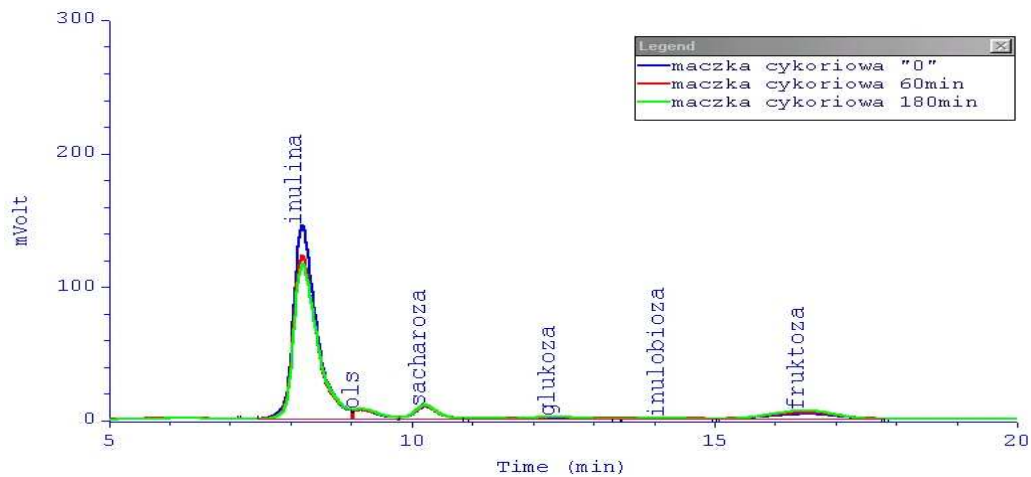
Rys. 1. Chromatogram preparatu FOS-PŁ. OLS*-DP \geq 4

Rys. 1. Chromatogram of a FOS-PŁ preparation.

Rys. 2. Chromatogram preparatu Raftilose. OLS*-DP \geq 5

Rys. 2. Chromatogram of a Raftilose preparation.

Po upływie 60 min hydrolizy ilość zachowanych fruktanów wynosiła od 86 do 98% (tab. 3). Po 180 min hydrolizy ilość fruktanów, które nie uległy hydrolizie wynosiła od 70% (Wako Pure) do 95% (inulina). Najbardziej odporne na hydrolizę prowadzoną w warunkach symulujących działanie soku żołądkowego były fruktany długołańcuchowe, w tym inulina, oraz mączki cykoriowe, które w swoim składzie zawierają również fruktooligosacharydy o DP $>$ 10. Niniejsze badania potwierdziły obserwacje poczynione przez Knudsen i Hessova [10].



Rys. 3. Chromatogram mączki cykoriowej.
 Rys. 3. Chromatogram of a chicory dry pulp.

Tabela 3

Zawartość fruktanów niezhydrolizowanych w preparatach FOS po hydrolizie [%].
 Content [%] of non-hydrolyzed fructans in FOS preparations after the hydrolysis completed.

Czas hydrolizy Time of hydrolysis [min]	Preparaty handlowe Commercial preparations		Preparaty otrzymane w PŁ Preparations obtained in PŁ					
	Raftilose	Wako Pure	FOS-PŁ	Mączka cykoriowa Chicory dry pulp	Mączka cykoriowa+ pepsyna Chicory dry pulp+pepsyne	Inulina Inulin	Nystoza Nystose	Sacharoza Saccharose
60	90,5	85,9	89,6	96,6	98,2	98,1	95,6	95,8
120	86,2	76,7	84,2	92,1	92,6	96,1	92	92,1
180	82	69,7	78,9	86,3	86,2	94,8	90,3	90

Stwierdzono, że najwięcej inulobiozy – 10%, (która ma słabsze właściwości bifodogenne) uwalniało się w trakcie hydrolizy preparatu Raftilose, zawierającego jako główne składniki oligomery samej fruktozy tj. inulotriozę i inulotetraozę (tab. 4, rys. 2.). W przypadku innych preparatów ilość uwolnionej inulobiozy nie przekraczała 1,7%.

Ilość uwolnionych cukrów metabolizowanych (fruktozy, glukozy, sacharozy) (tab. 5) w trakcie hydrolizy była różna w poszczególnych preparatach i wynosiła po 60 min od 2 do 14%, po 180 min od 10% (Nystoza) do 31% (Wako Pure). W przypadku mączek cykoriowych hydrolizowanych z i bez pepsyny nie stwierdzono różnic w ilości uwolnionych cukrów metabolizowanych (14%).

Tabela 4

Ilość uwolnionej inulobiozy w trakcie hydrolizy preparatów FOS [%].
Content of inulobiose increase during hydrolysis.

Czas hydrolizy Time of hydrolysis [min]	Preparaty handlowe Commercial preparations		Preparaty otrzymane w PŁ Preparations obtained in PŁ					
	Raftilose	Wako Pure	FOS-P	Mączka cykoriowa Chicory dry pulp	Mączka cykoriowa+ Pepsyna Chicory dry pulp+pepsyne	Inulina Inulin	Nystoza Nystose	Sacharoza Saccharose
60	6,3	1,2	1,4	0,4	0,6	0,2	0,6	0
120	7,2	1,2	1,6	1	0,8	0,8	0,9	0
180	10,4	1,4	1,7	1,4	1,6	1	1	0

Tabela 5

Ilość uwolnionych cukrów metabolizowanych w trakcie hydrolizy preparatów FOS [%].
Amount [%] of metabolized sugars released during the hydrolysis of FOS preparations.

Czas hydrolizy Time of hydrolysis [min]	Preparaty handlowe Commercial preparations		Preparaty otrzymane w PŁ Preparations obtained in PŁ					
	Raftilose	Wako Pure	FOS-PŁ	Mączka cykoriowa Chicory dry pulp	Mączka cykoriowa+ Pepsyna Chicory dry pulp+pepsyne	Inulina Inulin	Nystoza Nystose	Sacharoza Saccharose
60	4,5	14,1	10,4	3,4	1,8	2,1	4,4	100 4,2*
120	13,8	23,9	15,8	7,9	7,4	4,3	8	100 7,9*
180	18	31,3	21,1	13,7	13,8	14	9,7	100 12,8*

*Udział sumy fruktozy i glukozy / Per cent rate of fructose and glucose.

Wnioski

1. W trakcie hydrolizy kwasowej symulującej warunki działania soku żołądkowego następują zmiany jakościowe i ilościowe składu fruktanów związane z uwalnianiem reszty fruktozy od końca łańcucha fruktozylowego.
2. Najbardziej odporne na hydrolizę prowadzoną w warunkach symulujących działanie soku żołądkowego są fruktany długołańcuchowe (inulina krystaliczna),

- której po upływie 180 min pozostaje 95% początkowej ilości oraz inulina zawarta w nisko przetworzonej mączce cykoriowej (93%).
3. Najłatwiej ulegają hydrolizie preparaty zawierające β -fruktooligosacharydy homogenne oraz oligomery o DP 3-4.
 4. Najwięcej cukrów metabolizowanych (do 30%) uwalnia się podczas hydrolizy preparatów handlowych (preparat Wako Pure i FOS-PŁ) zawierających jako główne FOS: kestozę, nystozę i fruktozylonystozę.
 5. W wyniku hydrolizy fruktooligosacharydów homogennych znaczący udział w produktach hydrolizy stanowi inulobioza (10%) o działaniu probiotycznie mniej korzystnym niż FOS o DP>4.

Pracę wykonano w ramach PB2/KBN/021/P06/99 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych w latach 2001-2004.

Literatura

- [1] Bielecka M., Biedrzycka E., Majkowska A.: Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Res. Int.*, 2002, **35**, 125-131.
- [2] Bornet F.R.J., Brouns F., Tashiro Y., Duvillier V.: Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digest Liver Dis.*, 2002, **34** (Suppl.2) S111-20.
- [3] Coussument P.A.A.: Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *Am. Soc. Nutr.Sci.*, 1999, 1412S-1416S.
- [4] Farine S., Versluis C., Bonnici P. J., Heck A., Peschet J. L., Ppuigserver A., Biagini A.: Separation and identification of enzymatic sucrose hydrolysis products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chrom.*, 2001, 299-3308.
- [5] Gałązka I., Czarniecki A.: Otrzymywanie inuliny i jej koncentratów z korzeni cykorii. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2002, **3 (32) Supl.**, 46-54.
- [6] Hata Y., Hara T., Oikawa T., Yamamoto M., Hirose N., Nagashima T., Torihama N., Nakajima K., Watabe A., Yamashita M.: The effects of fructooligosaccharides against hyperlipidemics. *Geriatr. Med.*, 2002, **21**, 156-167.
- [7] Hidaka H., Eida T., Tokunaga T., Tashiro Y.: Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, 1986, **5**, 37-50.
- [8] Jong Won Yun.: Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microb Technol.*, 1996, **19**, 107-117.
- [9] Kaplan H., Hutkins R.: Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 2682-2684.
- [10] Knudsen K.E.B, Hessov I.: Recovery of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in the small intestine of man. *J. Nutr.*, 1995, **74**, 101-113.
- [11] Kohlmünzer S.: *Farmakognozja*. Wyd. Lek PZWL. Warszawa 2003.
- [12] Linden G., Lorient D.: *New ingredients in food processing*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 1999, p. 224.
- [13] Roberfroid M.B.: Caloric value of inulin and oligofructose. *J. Nutr.*, 1999, **129**, **3**, 1436S.
- [14] Ritsema T., Smeekens S.: Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, **6**, 223-230.
- [15] Skowronek M., Fiedurek J.: Inulina i inulinazy, właściwości, zastosowania, perspektywy. *Przem. Spoż.*, 2003, **3**, 23.

- [16] Spiegel J.E., Rose R., Karabell P., Vasilios H. Frankos, Donald F. Schmitt.: Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technol.*, 1994, January, 85-89.
- [17] Van den Heuvel E.G., Muys T., van Dokkum W., Schaafsma G.: Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Functional properties of non-digestible carbohydrates*. INRA. Nantes 1998, p. 138.

HYDROLYSIS OF FRUCTANS UNDER THE CONDITIONS SIMULATING THE EFFECT OF GASTRIC JUICE

S u m m a r y

Fructans, just like cellulose, are not digested in the gastrointestinal tract. The reason is that there are no enzymes in the gastric, pancreatic and intestinal juices, which hydrolyze the β -2,1 glycoside bonds. However, they are partially hydrolyzed under the acidic conditions.

The objective of this study was the hydrolysis of fructans under the conditions, which simulate the effects of gastric juice. The 30 to 180 minute lasting hydrolysis was conducted at a temperature ranging between 36.6 and 37.0°C, at pH equalling 2. In the case when chicory meal was used, pepsin was also applied. The commercial preparations of FOS (FOS Wako Pure, Raftilose) were applied for the hydrolysis, as well as preparations supplied by the Łódź University of Technology, i.e.: FOS-PŁ, crystalline inulin from chicory, chicory dry pulp, nystose, and sucrose. The composition of the preparations before and after the hydrolysis was determined using a HPLC method.

It was stated that the kinetic constant of the hydrolysis of fructan, determined according to the mechanism of a one-molecule reaction, ranged from 0.0006 to 0.0035. The following inulin types showed the highest resistance towards the hydrolysis: crystalline inulin and inulin contained in the chicory meal. After a 180 minute period of the hydrolysis, the amount of crystalline inulin was 95%, and of the inulin contained in the not much processed chicory meal: 93%. Preparations containing homogenous β -fructooligosaccharides (Raftilose) and oligomers with DP equalling 3 to 4 (FOS Wako Pure, FOS-PŁ) hydrolyzed the best. The highest amounts (up to 30%) of hydrolyzed saccharides were released during the hydrolysis of the preparations Wako Pure and FOS-PŁ; in these preparations, the key FOS components were: kestose, nystose, and fructosyl-nystose).

Key words: chicory, fructans, fructooligosaccharides (FOS), inulin, hydrolysis 