

BOGUSŁAW KRÓL, ROBERT KLEWICKI

## CHARAKTERYSTYKA SKŁADU WYBRANYCH KONCENTRATÓW OLIGOSACHARYDÓW O WŁAŚCIWOŚCIACH FUNKCJONALNYCH

### Streszczenie

$\beta$ -oligosacharydy (OLS):  $\beta$ -galaktozylo- i  $\beta$ -fruktozylooligosacharydy należą do prebiotyków, tj. substancji, które stymulują wzrost pożądaną flory bakteryjnej (probiotyków) i dzięki temu korzystnie wpływają na zdrowie człowieka.

W pracy przedstawiono charakterystykę składu następujących mieszanin oligosacharydów: koncentrat galakto-OLS pierwszej generacji (mieszanina bezpośrednia po transformacji laktozy), OLS drugiej generacji (po usunięciu monosacharydów), koncentrat laktulozy i koncentrat inuliny. Analizę wykonano metodą HPLC z użyciem dwóch kolumn (Aminex HPX 87 C, Lichrospher 100/NH<sub>2</sub>) i trzech układów rozdziału. Przedstawiono profile HPLC badanych koncentratów oraz zawartość odpowiednich mono-, di- i oligosacharydów.

### Wstęp

Inulina,  $\beta$ -oligosacharydy (OLS):  $\beta$ -galaktozylo- lub  $\beta$ -fruktozylooligosacharydy oraz laktuloza (4-O- $\beta$ -galaktopyranosylo-D-fruktoza) należą do prebiotyków, tj. substancji, które stymulują wzrost pożądaną flory bakteryjnej (probiotyków) w przewodzie pokarmowym i dzięki temu korzystnie wpływają na zdrowie człowieka. Zwiększenie liczebności bifidobakterii oraz bakterii kwasu mlekowego przyczynia się do hamowania wzrostu bakterii gnilnych, a w konsekwencji ograniczenia ilości wytwarzanych przez nie substancji toksycznych [1, 2, 3]. Inulina wykazuje ponadto działanie podobne do błonnika pokarmowego [4]. Inulina jest naturalnym polifruktanem występującym w roślinach z rodziny *Liliaceae* i *Compositae* w ilości 10–20% [5]. Inulinę z surowców roślinnych wyodrębnia się w postaci krystalicznej lub w postaci oczyszczonych i zagęszczonych preparatów.

OLS otrzymuje się w wyniku hydrolizy polisacharydów lub katalitycznej syntezy względnie izomeryzacji odpowiednich sacharydów [6].

Jedną z metod otrzymywania  $\beta$ -galaktooligosacharydów jest hydroliza laktozy z użyciem  $\beta$ -galaktozydazy. W stężonych roztworach laktozy  $\beta$ -galaktozydaza ujawnia właściwości transglikozylacyjne; tzn. dołącza do zawartych w roztworze sacharydów resztę galaktozy tworząc oligosacharydy [7, 8].

Oligosacharydy o różnym składzie ilościowym i jakościowym wytwarzane są w skali przemysłowej w kilku krajach (głównie w Japonii i Holandii). Łączna ich ilość szacowana jest na około 30 tys. ton rocznie [3].

Laktuloza jest disacharydem otrzymywanym z laktozy w wyniku samoistnej izomeryzacji w środowisku zasadowym. Izomeryzacja polega na zamianie reszty glukozy w cząsteczce laktozy na resztę fruktozy. Z niewielką wydajnością laktuloza powstaje w procesie transglikozylacji zachodzącej w roztworze zawierającym laktozę, fruktozę i  $\beta$ -galaktozydazę [6]. Laktuloza jest obecnie stosowana głównie jako farmaceutyk w leczeniu zaburzeń neurologicznych (encefalopatii) oraz zapobieganiu i leczeniu chorób przewodu pokarmowego, zwłaszcza zaparcia [9].

Obecnie światowa produkcja laktulozy do celów farmaceutycznych szacowana jest na 16 tys. ton rocznie. W Polsce badania nad otrzymywaniem laktulozy zostały rozpoczęte w 1968 roku [10], a w 1982 roku uruchomiono produkcję laktulozy farmaceutycznej w skali 20 ton rocznie [11]. Przewiduje się, że w niedalekiej przyszłości laktuloza stanie się dominującym oligosacharydem w zastosowaniu do produkcji żywności funkcjonalnej.

Sacharydowe preparaty prebiotyczne stanowią zwykle mieszaniny wielu składników o różnej masie cząsteczkowej, i z tego względu do ich oznaczania konieczne jest stosowanie odpowiednich metod analitycznych, do których można zaliczyć HPLC.

Celem pracy jest przedstawienie składu cukrów czterech koncentratów OLS, które otrzymano na podstawie metod opracowanych w Instytucie Chemicznej Technologii Żywności Politechniki Łódzkiej.

## Material i metody

Syntezę galaktooligosacharydów prowadzono z wykorzystaniem  $\beta$ -galaktozydazy z *Kluyveromyces fragilis* zawartej w preparacie enzymatycznym Lactozym 3000, używając 50% roztworu laktozy. Mieszanina cukrów po hydrolizie stanowi koncentrat OLS I-ej generacji. Koncentrat OLS II-ej generacji uzyskano usuwając z hydrolizatu monosacharydy na drodze niskociśnieniowej chromatografii. Prowadziło to do zwiększenia udziału oligosacharydów w suchej masie roztworu, który następnie zateżano do poziomu 55°Bx.

Laktulozę w postaci syropu zawierającego minimum 50 g/100 ml substancji czynnej otrzymano w wyniku izomeryzacji laktozy i wielostopniowej krystalizacji i rafinacji, zgodnie z opracowaną wcześniej technologią [11].

Koncentrat inuliny o zawartości 50 % s.s. otrzymano w wyniku ekstrakcji korzeni cykorii odpowiednim medium, po czym ekstrakt poddano odbiałczaniu, demineralizacji, rafinacji i zateżaniu. Badania nad optymalizacją warunków otrzymywania inuliny i jej pochodnych są w toku.

Analizie HPLC poddano następujące próbki koncentratów: koncentrat  $\beta$ -OLS I-ej generacji (55°Bx), koncentrat  $\beta$ -OLS II-ej generacji (55°Bx), koncentrat laktulozy (67g/100 ml), koncentrat inuliny (55% s.s.).

Warunki metody wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC):

1. Kolumna Aminex HPX 87 C, faza ruchoma: woda, temperatura 85°C,
2. przepływ 0.4-0.5 ml/min
3. Kolumna Lichrospher 100/NH<sub>2</sub>, faza ruchoma: acetonitryl-woda 80:20 lub 70:30, temperatura 20°C, przepływ 1.0-1.5 ml/min
4. Detektor RI
5. System integrujący Eurochrom 2000
6. Metody analityczne z użyciem w/w kolumn zostały poddane walidacji zgodnie ze sposobem postępowania opisanym w Farmakopei Amerykańskiej USP 23. Wyznaczony standardowy błąd względny dla trzech kolejno wykonanych pomiarów nie przekraczał 2%, a współczynnik rozdzielczości w przypadku laktozy i laktulozy wynosił 1,1.

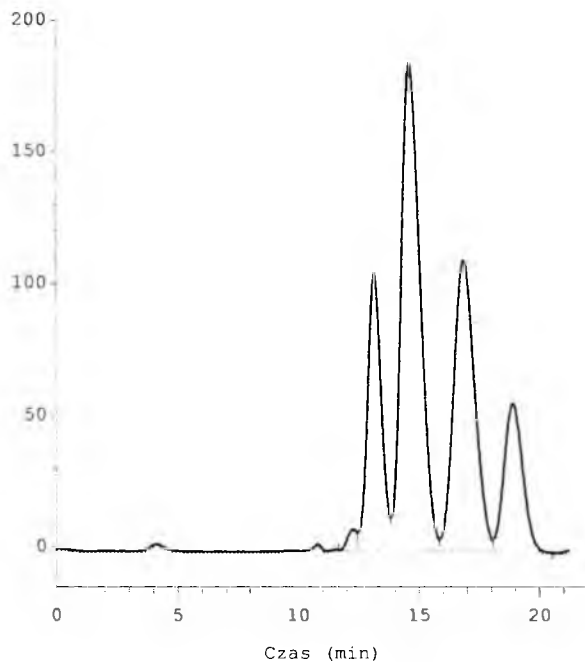
Wyniki pomiarów stanowią średnią z trzech oznaczeń.

## Wyniki i dyskusja

$\beta$ -galaktozydaza zawarta w preparacie enzymatycznym Lactozym 3000, katalizowała powstawanie głównie tri- i tetra- oligosacharydów w procesie hydrolizy prowadzonej z wykorzystaniem 50% roztworu laktozy (Rys. 1). Poddanie uzyskanej mieszaniny cukrów procesowi usuwania glukozy i galaktozy poprzez zastosowanie chromatografii preparatywnej, prowadzi do wzrostu zawartości trisacharydów w suchej substancji preparatu do 41%, zaś wszystkich aktywnych OLS do 67 % (Rys. 2).

Analiza chromatograficzna uzyskanych w powyższy sposób koncentratów wymaga zastosowania przynajmniej dwóch układów rozdzielania. Zastosowanie kolumny wapniowej Aminex HPX 87 C i wody jako fazy ruchomej umożliwia rozdział mieszaniny na glukozę i galaktozę, di-, tri-, tetra- i wyższe oligosacharydy (Rys. 1). W tych warunkach niemożliwe jest jednak rozdzielanie nie zhydrolizowanej laktozy od disacharydu galaktobiozy, która powstaje poprzez łączenie się dwóch cząsteczek galakto-

zy. Obydwa disacharydy dają na chromatogramie jeden pik (czas retencji w warunkach analizy ok. 15 minut).



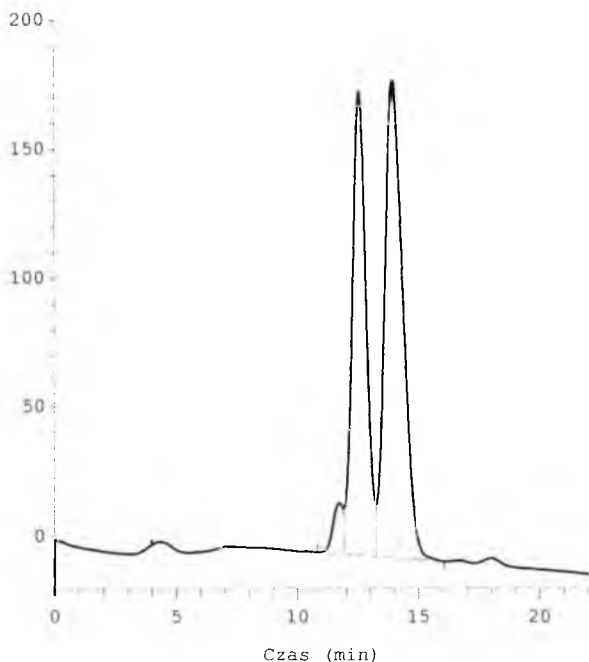
Rys. 1. Profil chromatograficzny koncentratu  $\beta$ -OLS 50%;  
Czas retencji [min]: **12.2** tetraoligosacharydy i wyższe OLS, **13.1** trioligosacharydy, **14.5** laktoza i galaktobioza, **16.7** glukoza, **18.8** galaktoza.

Fig. 1. HPLC chromatogram of the  $\beta$ -OLS 50 % concentrate;  
Retention time [min]: **12.2** tetraoligosaccharides and higher OLS, **13.1** trioligosaccharides, **14.5** lactose and galactobiose, **16.7** glucose, **18.7** galactose.

Rozdział laktozy od galaktobiozy możliwy jest w układzie z 70% acetonitrylem jako fazą ruchomą i kolumną aminową np. Lichrospher 100/ $\text{NH}_2$  (Rys. 3). W przedstawionym przypadku najniższy czas retencji posiadają monosacharydy, następnie opuszcza kolumnę laktoza i zaraz za nią galaktobioza. W dalszej kolejności wymywane są oligosacharydy, tym wolniej im wyższą posiadają masę cząsteczkową.

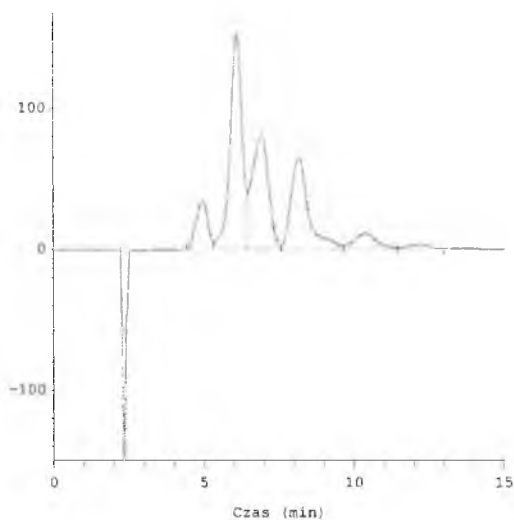
Profil HPLC koncentratu laktulozy (Rys. 4) i wyniki zawarte w Tab. 1 wykazują, że proces samoistnej izomeryzacji laktozy w środowisku zasadowym przebiega z utworzeniem produktów ubocznych, zwłaszcza galaktozy i epilaktozy (4-O- $\beta$ -galaktopiranozylo-D-mannozy). Udział galaktozy nie przekracza 15% w przeliczeniu na laktulozę, zaś udział epilaktozy wynosi 2,5% w przeliczeniu na laktulozę. Udziały w/w cukrów towarzyszących są znacznie mniejsze niż wymagania farmakopealne (USP XXIII). Można sądzić, że w zastosowaniu do celów żywieniowych wymagania

stawiane koncentratom laktulozy mogą być podobne, lecz w odniesieniu do udziału laktozy mogą być łagodniejsze tj. dopuszczać więcej niż 12% laktozy w przeliczeniu na laktulozę.



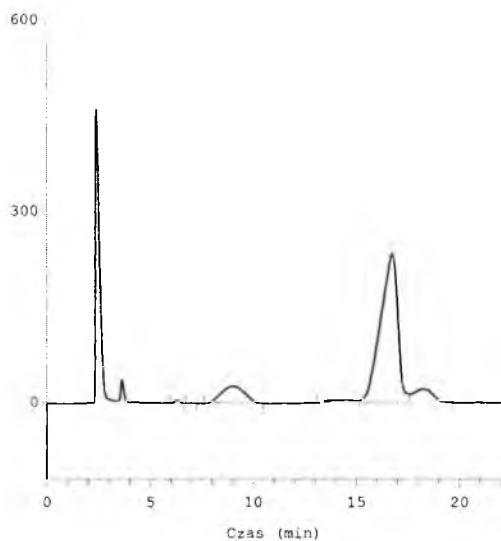
- Rys. 2. Profil chromatograficzny koncentratu  $\beta$ -OLS 55%;  
Czas retencji [min]: **11.7** tetraoligosacharydy, **12.5** trioligosacharydy, **13.9** laktoza i galaktobioza.
- Fig. 2. HPLC chromatogram of the  $\beta$ -OLS 55% concentrate;  
Retention time [min]: **11.7** tetraoligosaccharides and higher OLS, **12.5** trioligosaccharides, **13.9** lactose and galactobiose.

Profil HPLC prezentowany na rys. 5 oraz wyniki zawarte w Tab. 1 wskazują, że na drodze względnie prostego postępowania technologicznego możliwe jest uzyskanie koncentratu inuliny zawierającego w suchej masie ponad 85% inuliny, około 9%  $\beta$ -fruktozylooligosacharydów i 3% fruktozy. Koncentrat ma postać gęstego żelu i w przypadku zapewnienia odpowiednich warunków mikrobiologicznych może stanowić tani i dogodny półprodukt do wytwarzania żywności funkcjonalnej w postaci płynnej.



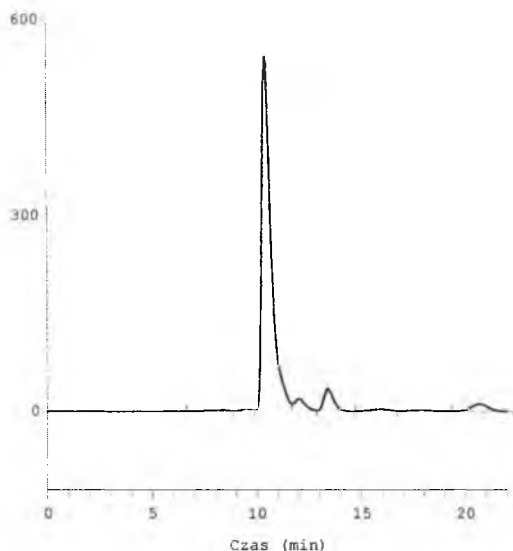
Rys. 3. Profil chromatograficzny hydrolizatu laktozy w układzie z 70 % acetonitrylem jako fazą ruchomą; Czas retencji [min]: **5.0** monosacharydy, **6.1** laktoza, **6.9** galaktobioza, **8.2** trisacharydy, **10.4** tetrasacharydy, **12.2** wyższe OLS.

Fig. 3. HPLC chromatogram of the lactose hydrolysate; mobile phase: acetonitrile-water 70:30; Retention time [min]: **5.0** monosaccharides, **6.1** lactose, **6.9** galactobiose, **8.2** trisaccharides, **10.4** tetraoligosaccharides, **12.2** higher OLS.



Rys. 4. Profil chromatograficzny koncentratu laktulozy; Czas retencji [min]: **6.3** tagatoza, **7.0** fruktoza, **9.0** galaktoza, **14.5** epilaktoza, **16.8** laktuloza, **18.3** laktoza.

Fig. 4. HPLC chromatogram of the lactulose concentrate; Retention time [min]: **6.3** tagatose, **7.0** fructose, **9.0** galactose, **14.5** epilactose, **16.8** lactulose, **18.3** lactose.



Rys. 5. Profil chromatograficzny koncentratu inuliny; Czas retencji [min]: 8.4 inulina frakcja 1, 9.5 inulina frakcja 2, 10.4 inulina frakcja 3, 12.0 OLS 1, 13.4 OLS 2, 15.9 glukoza, 20.7 fruktoza.

Fig. 5. HPLC chromatogram of the inulin concentrate; Retention time [min]: 8.4 inulin fraction 1, 9.5 inulin fraction 2, 10.4 inulin fraction 3, 12.0 OLS 1, 13.4 OLS 2, 15.9 glucose, 20.7 fructose.

Tabela 1

Zawartość sacharydów w otrzymanych koncentratów oligosacharydów, oznaczona metodą HPLC.

The amounts of saccharides in obtained concentrates, measured by HPLC.

Rodzaj koncentratu/Type of concentrate	Wymiar/Units	Składniki/Components	
Koncentrat $\beta$ -OLS 50	[% s.s.]	Laktotetraoza i	
		Wyższe OLS	1.1
		Laktotrioza	18.0
		Galaktobioza	14.2
		Laktoza	26.5
		Glukoza	27.6
Koncentrat $\beta$ -OLS 55%	[% s.s.]	Galaktoza	12.6
		Laktotetraoza i	
		Wyższe OLS	3.1
		Laktotrioza	41.1
		Galaktobioza	23.4
Koncentrat laktulozy 67%	[g/100 ml]	Laktoza	32.4
		Tagatoza	0.3
		Fruktoza	0.03
		Galaktoza	9.4
		Epilaktoza	1.6
		Laktuloza	63.4
Koncentrat inuliny 50%	[% s.s.]	Laktoza	6.0
		Inulina	85.8
		$\beta$ -fruktozylo-OLS	9.0
		Glukoza	0.8
		Fruktoza	3.3

## Podsumowanie

Do ustalenia składu oligosacharydowych preparatów prebiotycznych celowe, a nawet konieczne, jest stosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odpowiednich warunkach rozdziału.

Do oznaczania składu  $\beta$ -galaktooligosacharydów konieczne jest użycie dwóch układów chromatograficznych o odmiennych mechanizmach rozdziału.

Skład jakościowy i ilościowy otrzymanych i analizowanych koncentratów oligosacharydów jest podobny do składu preparatów wytwarzanych już w skali przemysłowej, w krajach, które w tej dziedzinie mają przewagę wynikającą z wieloletnich doświadczeń. Należy dążyć do wykorzystania możliwości wytwarzania w kraju preparatów prebiotycznych na bazie oligosacharydów.

## LITERATURA

- [1] Tomomatsu H.: Health Effects of Oligosaccharides, *Food Technol.*, **48**, 1994, 61.
- [2] Bouhnik Y., Flourie B., D'Agay-Abensour L., Pochart P., Gramet G., Durand M., Rambaud J.-C.: Administration of Transgalacto-Oligosaccharides Increases Fecal Bifidobacteria and Modifies Colonic Fermentation Metabolism in Healthy Humans, *J. Nutr.*, **127**, 1997, 444.
- [3] Van Zundert M., Hoffmann R.: Lactose derivatization, *Carbohydrates in Europe*, **25**, 1999, 28.
- [4] Berghofer E., Reiter E.: Production and Functional Properties of Jerusalem Artichoke Powder in Carbohydrates as Organic Raw Materials IV, ed. Praznik W. and Huber A., WUV-Universitätsverlag, Vienna/ Austria, 1997, 153.
- [5] Raaijmakers H.W.C., Kuzee H.C., Bolkenbaas M.E.B.: Physicochemical Modifications of Inulin: Properties and Applications in Carbohydrates as Organic Raw Materials IV, ed. Praznik W. and Huber A., WUV-Universitätsverlag, Vienna/ Austria, 1997, 139.
- [6] Crittenden R.G., Playne M.J.: Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides, *Trends Food Sci. Technol.*, **7**, 1996, 353.
- [7] Smart J.B.: Transferase Reactions of  $\beta$ -galactosidase – New Product Opportunities, *Bull. Int. Dairy Fed.*, **289**, 1993, 16.
- [8] Kołodziejczyk K., Król B., Klewicki R.: The Preparation of the  $\beta$ -galactosyl Oligosaccharides Concentrates (OLS) from Lactose, poster, Carbohydrate Bioengineering Meeting, Elsinore, Denmark, 1995.
- [9] Vendemiale G., Palasciano G., Cirelli F., Altamura M., De Vincentiis A., Altomare E.: Crystalline Lactulose in the Therapy of Hepatic Cirrhosis, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **42**, 1992, 969.
- [10] Zagrodzki S., Król B.W.: O niektórych warunkach izomeryzacji laktozy. *Rocznik Technologii i Chemii Żywności*, **15**, 1969, 190.
- [11] Król B.: Wdrożenie technologii produkcji laktulozy w Łowickich Zakładach Farmaceutycznych „Polfá” w Łyszkowicach, 1981-1982, praca nie publikowana.



## COMPOSITION OF SOME DIGOSACCHARIDE CONCENTRATES AND THEIR FUNCTIONAL PROPERTIES

### S u m m a r y

$\beta$ -oligosaccharides (OLS):  $\beta$ -galacto- and  $\beta$ -fructooligosaccharides are prebiotics. These substances stimulate the growth of beneficial to human health bacteria.

In this article the characteristics of following oligosaccharides concentrates are presented: I-generation galacto-OLS (mixture after transformation of lactose), II-generation galacto-OLS (mixture after removing monosaccharides), lactulose concentrate and inulin concentrate. Analysis was done by use of two HPLC columns (Aminex HPX 87 C, Lichrospher 100/NH<sub>2</sub>) and under three different separation conditions.

The HPLC profiles of analysed concentrates and the amounts of mono-, di- and oligosaccharides occurring in the concentrates are presented. ☒