

BOGUSŁAW KRÓL, ROBERT KLEWICKI

**WYTWARZANIE KONCENTRATÓW
FRUKTOOLIGOSACHARYDÓW (FOS) O ZRÓŻNICOWANYM
SKŁADZIE OLIGOMERYCZNYM Z WYKORZYSTANIEM
ENZYMATYCZNEJ BIKONWERSJI SACHAROZY**

Streszczenie

Opisano warunki prowadzenia biokonwersji sacharozy z użyciem komercyjnych preparatów enzymatycznych Fructozyme i Novoferm, zawierających fruktozylotransferazę (FT) do wytwarzania trzech typów syropów FOS i dwóch proszkowych preparatów o zawartości fruktanów odpowiednio 50–60% s.s. i $\geq 90\%$ s.s.

Wykazano, że przy aktywności FT 1–2,5 U/g sacharozy proces transglikozylacji reszty fruktozy przebiega w trzech fazach. W pierwszej blisko 80% utworzonych oligomerów stanowi kestoza, w drugiej kestoza ulega transglikozylacji z utworzeniem ponad 50% udziału nystozy w sumie FOS, a w trzeciej ustala się równowagę pomiędzy kestożą, nystozą i fruktozylonystozą w proporcji 2 : 4 : 3.

Stwierdzono, że roztwory bogate w nystozę, po usunięciu glukozy na drodze enzymatycznego utleniania mogą być wysuszone metodą rozpyłową w warunkach otrzymywania mleka w proszku. Wykazano, że z syropów nystozowych o zawartości s.s. powyżej 72% (m/m) nystoza krystalizuje z niewielką domieszką kestozy w postaci niehigroskopijnej, drobnokrystalicznej substancji.

Słowa kluczowe: fruktooligosacharydy, fruktozydaza, fruktozylotransferaza, transglikozylacja.

Wstęp

Fruktooligosacharydy (FOS) są krótkołańcuchowymi fruktanami zbudowanymi z 2–10 reszt fruktofuranozowych połączonych wiązaniem $\beta(2\rightarrow1)$. FOS występują jako oligosacharydy homogenne, złożone wyłącznie z fruktozy, oraz jako oligosacharydy heterogenne zbudowane z jednej cząsteczki sacharozy i 1–8 reszt fruktozy przyłączonych wg wzoru: $1^F(1-\beta-D\text{-fruktofuranozylo})_n\text{-sacharoza}$, w którym $n = 1\div 8$ [14, 21]. W przyrodzie oraz w produktach otrzymanych w wyniku biokonwersji fruktanów lub sacharozy występują mieszaniny fruktooligosacharydów o stopniu polimeryzacji (DP) od 3 do 7 [20, 21]. Do fruktooligosacharydów zalicza się

również inulobiozę o DP = 2, której transport w przewodzie pokarmowym jest podobny do oligomerów o DP \geq 3 [1].

FOS, obok inuliny i sacharozy, jako węglowodany zapasowe występują w wielu roślinach. Powstawanie FOS w roślinach akumulujących inulinę jest związane z działaniem dwóch enzymów: sacharozo-sacharozo 1-fruktozylotransferazy E.C.2.4.1.99 i fruktano:fruktano 1-fruktozylotransferazy E.C.2.4.1.100 [20, 22].

Tworzenie FOS z sacharozy odbywa się przy udziale enzymów transfruktozylacyjnych, a w szczególności fruktozylotransferazy E.C.2.4.1.9 [13] oraz β -D-fruktofuranazy E.C.3.2.1.26 z niektórych źródeł biologicznych w ściśle określonym pH [19]. Fruktozylotransferazy występują w różnych anatomicznych częściach roślin z rodziny *Compositae* (*Asteraceae*) i *Liliaceae*, takich jak: cykorja, mniszek, cebula, czosnek [34]. Aktywność transfruktozylacyjną wykazuje również wiele mikroorganizmów np.: *Aspergillus niger* [12], *Aspergillus japonicus*, *Aureobasidium pullulans* [15], *Pichia pastoris* [7, 13].

Mechanizmy transglikozylacji sacharozy i fruktanów oraz innych sacharydów są zróżnicowane i zależą od pochodzenia enzymu, pH, stężenia substratu itp. Proces transglikozylacji sacharozy przy udziale fruktozylotransferazy z pleśni *Aspergillus niger* [34] i z bakterii *Bacillus macerans* EG – 6 [5] przebiega zgodnie ze schematem: $GF_n + GF_n \rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}$ dla $n < 4$, a w części według równania $GF_n + GF \rightarrow GF_{n+1} + G$. W związku z tym głównymi produktami transglikozylacji sacharozy są: 1-kestoza, nystoza i fruktozylonystoza [5]. Udział wymienionych sacharydów w mieszaninie reakcyjnej zależy od pochodzenia enzymu i jego aktywności, występowania innych enzymów w środowisku oraz pH, dawki i czasu działania. Dzięki postępom enzymologii jest możliwe wytwarzanie fruktozylotransferaz o dużej aktywności w postaci immobilizowanej i preparatów ciekłych do stosowania w procesach biokonwersji sacharozy [11, 13, 28, 29, 30, 34].

Maksymalny udział FOS w mieszaninie po biokonwersji nie przekracza 60–62% w przeliczeniu na s.s. roztworu. Resztę do 100% stanowią: sacharoza, glukoza i fruktoza. Występowanie ww. cukrów w mieszaninie FOS nie stanowi istotnego ograniczenia w zastosowaniu syropów oligofruktozy jako składnika żywności i ciekłych suplementów diet [34]. Do otrzymania koncentratów FOS pozbawionych sacharozy i cukrów prostych oraz występujących w postaci proszków lub granulatów stosuje się zwykle procesy niskociśnieniowej chromatografii przemysłowej [4, 29, 33, 34]. Po chromatograficznym rozdzielaniu i dehydratacji otrzymuje się preparaty proszkowe typu Actilight 950, Meioligo i Nutraflora, które zawierają $95 \pm 2\%$ FOS, w tym stosunek kestozy do nystozy i F-nystozy wynosi zwykle: 4 : 5 : 1.

Preparaty FOS w postaci proszków są dogodniejsze do stosowania niż syropy. Preparaty proszkowe mogą mieć zastosowanie jako środki niskokaloryczne i wypełniacze do intensywnych środków słodzących [8, 32]. Znane są również złożone preparaty FOS w postaci toników [6] i granulatów [32]. Wiele doświadczeń dotyczących biologicznej oceny FOS (w szczególności wpływu na funkcje jelita grubego) wskazuje na potrzebę optymalnego doboru składu oligomerycznego

fruktooligosacharydów [4]. FOS mają dobrze udokumentowane właściwości prebiotyczne [2, 25, 26, 27].

Celem badań było opracowanie warunków wytwarzania koncentratów FOS o pożądanym i przewidywalnym składzie oligomerycznym z sukcesywnym zastosowaniem procesów: transglukozyzacji reszty fruktozylowej na sacharozę i oligomery $DP \geq 3$, enzymatycznego utleniania glukozy, krystalizacji soli kwasu glukonowego oraz odsalania roztworu macierzystego.

Materiał i metody badań

Do procesu transglukozyzacji użyto dwóch handlowych preparatów z *Aspergillus niger*, z których jeden jest przeznaczony do produkcji syropów fruktozylowych z inuliny, a drugi jest stosowany do przemysłowej produkcji pitnych soków owocowych. Obydwa preparaty zawierały mieszaninę fruktozylotransferazy (FT) i β -fruktofuranosyldazy (FD) w różnych proporcjach. Do utleniania glukozy zastosowano handlowy preparat zawierający mieszaninę oksydazy glukozowej EC 1.1.3.4 i katalazy EC 1.11.1.6.

W badaniach użyto następujących substancji i preparatów enzymatycznych:

- Cukier biały kategorii I wg PN [24] w zbuforowanych wodnych roztworach o stężeniu 20–70% (m/m) i ustalonym pH w zakresie 4,5–7,5.
- Preparaty enzymatyczne: Fructozyme i Novoferm firmy Novo Nordisk A/S oraz Gammazym 9000L o aktywności: oksydaza 9000 U/ml, katalaza 2400 U/ml.
- Sole do sporządzania buforów: fosforan dipotasowy cz.d.a firmy POCH i mleczan sodu firmy Polfarmex S.A.
- Substancje pomocnicze do enzymatycznego utleniania glukozy i odsalania: nadtlenuk wodoru wg PN [23], węglan wapnia wg FP IV, wodorotlenek sodowy i 35% kwas solny cz.d.a. firmy POCh S.A.
- Eluenty do HPLC: woda i acetonitryl o czystości chromatograficznej firmy T. Baker.

W każdym zastosowanym preparacie enzymatycznym oznaczano aktywność fruktozylotransferazy (FT) i fruktofuranosyldazy (FD) w ustalonych warunkach biokonwersji. W celu oznaczenia aktywności FT i FD w probówkach ze szlifem poj. 15 ml umieszczano dwukrotnie po 1 μ l Fructozyme, 10 μ l Novoferm lub Gammazym 9000L, następnie do każdej probówki dodawano po 10 ml 50% roztworu sacharozy w 0,05 mol/l roztworu mleczanu sodu o pH 6,8. Równolegle wykonano próbki odniesienia bez dodatku enzymu. Roztwory badane wstawiano do łaźni wodnej o temp. 60°C i utrzymywano przez 18 godz. Po tym czasie pobierano próbki roztworów i oznaczano skład mieszanin sacharydów metodą HPLC z użyciem kolumny Bio-Rad HPX87C i detektora RI, przy elucji wodą 0,5 ml/min w temp. 85°C. Rozdział chromatograficzny rejestrowano z użyciem programu Knauer Eurochrom 2000. Alternatywnie stosowano kolumnę Asahipak NH2P-504E z detektorem RI, przy elucji 65% wodnym roztworem acetonitrylu z prędkością 0,8 ml/min w temp. 20°C [16].

Jedna jednostka aktywności FT (U_T) wyraża liczbę μ moli fruktozy przeniesionej w 50% roztworze sacharozy o pH 6,8 i temp. $57 \pm 1^\circ\text{C}$ z utworzeniem kestozy i oligomerów $DP \geq 4$ w czasie 1 min z udziałem 1 ml ciekłego preparatu. Jedna jednostka aktywności FD (U_F) wyraża liczbę μ moli fruktozy uwolnionej w 50% roztworze sacharozy o temp. $57 \pm 1^\circ\text{C}$ i pH 6,8, w czasie 1 min z udziałem 1 ml preparatu.

W celu określenia korzystnych warunków procesu transglikozylacji wykonano doświadczenia z użyciem roztworów sacharozy o stężeniu 20–73% (m/m), w zakresie pH 4,5–7,5. Wykonano również doświadczenia z mieszaniną fruktozy i sacharozy o udziale molowym odpowiednio 100, 67, 44, 34, 18% w roztworze o stężeniu 69% (m/m) i pH 7,2. Podwójne próby badanych roztworów utrzymywano w temp. $57 \pm 1^\circ\text{C}$ w czasie od 20 do 300 godz. w zależności od dawek enzymu. Doświadczenia prowadzono metodą periodyczną. Do wysterylizowanych flakonów poj. 165 ml odmierzano po 150 ml roztworu sacharozy o ustalonym stężeniu oraz pH i wprowadzano obliczoną objętość enzymu, zawierającą FT w ilości $1,0 \div 2,5 U_T/1$ g sacharozy, stosownie do jego aktywności. Następnie pojemniki z próbkami umieszczano w termostacie w temp. $57 \pm 1^\circ\text{C}$. W odstępach 4, 8 lub 24 godz. pobierano podwójne próbki do analizy metodą HPLC z detekcją RI, z użyciem kolumny Aminex HPX87C i Shodex Asahipak NH2. Wyniki podane w tabelach i na wykresach są średnią z dwóch prób równoległych. W wybranych warunkach procesu transglikozylacji wykonano doświadczenia z użyciem wysterylizowanych pojemników zawierających od 1 do 3 l roztworu.

Roztwory zawierające wybrane mieszaniny oligomerów FOS i glukozy poddawano działaniu nadtlenu wodoru w obecności oksydazy glukozowej i węgla wapnia w celu utlenienia glukozy do soli kwasu glukonowego. Proces utleniania glukozy do glukonianu wapnia prowadzono według wcześniej opisanego sposobu [17].

Roztwory glukonianu wapnia poddawano krystalizacji, po czym oddzielony roztwór macierzysty odsalano z użyciem kolumny kationitowej w postaci wodorowej i kolumny anionitowej w postaci wodorotlenowej. Roztwór po odsoleniu poddawano zateżaniu do zawartości suchej masy 70% (m/m) w przypadku koncentratów w postaci syropu. W celu otrzymania preparatów FOS w postaci proszków, roztwory po odsoleniu zateżano do zawartości 40% s.s. i suszono rozpyłowo w warunkach suszenia mleka do postaci proszku z użyciem ćwierćtechnicznej suszarni rozpyłowej Niro Atomizer.

Spektroskopia masowa (oznaczanie dokładnej wartości m/z) syntetyzowanych oligosacharydów została wykonana w Pracowni Spektrometrii Mas Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi przy zastosowaniu spektrometru mas Finnigan MAT 95 (Finnigan MAT GmbH, Brema, Niemcy).

Parametry spektrometru mas w trakcie pomiaru:

Technika jonizacji	LSI (Liquid Secondary-Ion) odpowiednik FAB
Temperatura źródła jonów	$\sim 40^\circ\text{C}$
Energia jonów cezu Cs^+	13 keV

Napięcie przyspieszające 4,8 kV

Rozdzielczość spektrometru w trakcie pomiaru – minimum 10 000.

Pomiarów dokonywano przy zastosowaniu wzorca wewnętrznego – glikolu etylenowego, który stanowił jednocześnie matrycę. Wartość średnią uzyskiwano z 20 zmierzonych wartości m/z .

Wyniki i dyskusja

W tab. 1. przedstawiono aktywność fruktozylotransferazy (FT) i β -fruktozydazy (FD) w preparatach użytych do doświadczenia. Zwraca uwagę znacząco duży udział FD w sumie aktywności w przypadku preparatu Fructozyme.

Tabela 1

Aktywność fruktozylotransferazy (FT) i β -fruktozydazy (FD) preparatów handlowych użytych do biokonwersji sacharozy i utleniania glukozy do kwasu glukonowego.

Activity of fructosyltransferase (FT) and β -fructosidase (FD) in commercial preparations used for the bioconversion of saccharose and for the oxidation of glucose to gluconic acid.

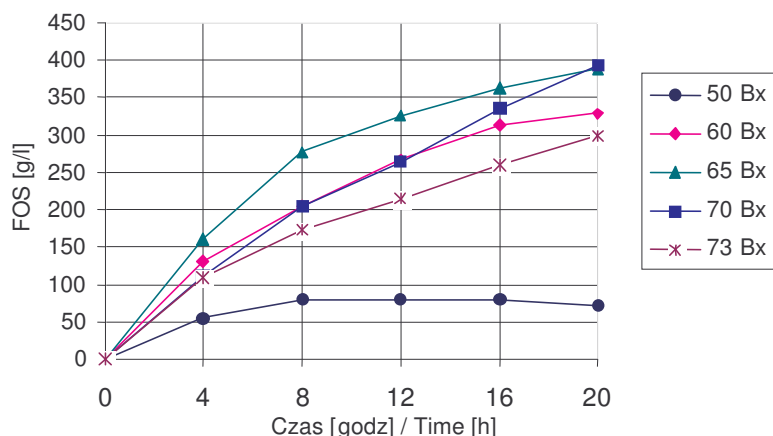
Preparat Preparation	Aktywność TF Activity TF	Aktywność FD Activity FD
	U_T /ml	U_F /ml
Fructozyme	3500	1050
Novoferm	195	≤ 10
Gammazym 9000	440	90

Objaśnienia: / Explanatory notes:

U_T i U_F – jednostki aktywności enzymów wyznaczone w ustalonych warunkach, opisanych w rozdziale “Materiał i metody badań”.

U_T , U_F – activity units determined under the fixed standard conditions (as described in the Chapter: “Materiały i metody badań”/“Materials and Methods of Investigation”).

Na rys. 1. przedstawiono zmianę zawartości utworzonych FOS w roztworze o pH 7,2 i stężeniu od 50 do 73% (m/m) w zależności od czasu biokonwersji w obecności Fructozyme w dawce 0,4 ml/l roztworu. Z przebiegu krzywych wynika, że ilość powstających FOS była proporcjonalna do czasu reakcji w pierwszych ośmiu godzinach, po czym następowało wyraźne spowolnienie szybkości syntezy fruktooligosacharydów. Zawartość FOS nie przekroczyła 100 g/l w roztworze o początkowym 50% stężeniu sacharozy. W roztworze o początkowym ponad 60% stężeniu sacharozy, a zwłaszcza bliskim 70% (m/m), zawartość utworzonych FOS osiągnęła wartość około 380 g/l i stanowiła około 40% udziału s.s. Zmianę składu jakościowego i ilościowego mieszaniny kilku sacharydów w czasie reakcji przedstawiono w tab. 2. Zwraca uwagę to, że dominującym fruktooligosacharydem była kestoza stanowiąca około 80–90% składu FOS.

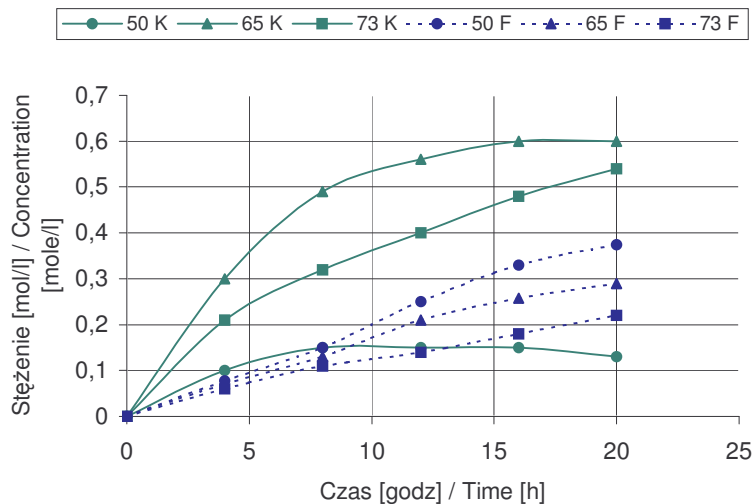


Rys. 1. Zmiana zawartości utworzonych FOS w roztworze o pH 7,2 i stężeniu 50–73% (m/m) w obecności Fructozyme w dawce 0,4 ml/l zależności od czasu biokonwersji.

Fig. 1. Change in the contents of FOS produced in the solution, its pH = 7.2 and its concentration rate = 50–73% (m/m) in the presence of Fructozyme the applied amount of which was 0.4 ml/l.

Na rys. 2. zilustrowano zmianę molowego stężenia kестоzy i fruktozy w roztworach o początkowej zawartości s.s. 50, 65 i 73% (m/m) w zależności od czasu reakcji. Przebieg krzywej badanego roztworu o stężeniu s.s. 50% (m/m) wskazuje, że szybkość transglikozylacji była większa niż szybkość hydrolizy sacharydów tylko do około 10. godz. reakcji. Później proces hydrolizy stał się dominujący, przez to udział FOS w hydrolizacie (tab. 2.) był niski, a ponadto udział fruktozy wyraźnie zwiększał się z upływem czasu reakcji. W nasyconych i przesyconych roztworach sacharozy stężenie fruktozy nie przekraczało 0,3 mol/l, a stężenie kестоzy wzrosło do 0,6 mol/l. Udział kестоzy w sumie utworzonych FOS przekroczył 80% (tab. 1.), co wskazuje, że dominował proces transglikozylacji według mechanizmu $GF + GF = GF_2 + G$ [5], a nadto konkurencyjny proces hydrolizy β -fruktanów, z udziałem β -fruktozydazy zwiększył w środowisku stężenie glukozy i fruktozy i prowadził do hamowania syntezy kестоzy i powstawania następnych oligomerów.

Na rys. 3. przedstawiono krzywe charakteryzujące zmiany zawartości sumy FOS w roztworze sacharozy o stężeniu 69% (m/m) o różnym pH w zakresie 5,8–7,3, w obecności Fructozyme w dawce 0,4 ml/l w zależności od czasu reakcji. Przebieg wykresów wskazuje, że pH bliskie 7 miało korzystny wpływ na tworzenie FOS w obecności enzymów zawartych w preparacie Fructozyme. W przypadku roztworów o pH 6,9 i 7,3 otrzymano mieszaninę kестоzy i nystozy o zawartości do 400 g/l z roztworu o początkowym 69% (m/m) stężeniu.



Rys. 2. Zmiany stężenia kestozy i fruktozy w roztworach o stężeniu 50, 65, 73% (m/m) i pH = 7,2 w obecności Fructozyme w dawce 0,4 ml/l w zależności od czasu biokonwersji.

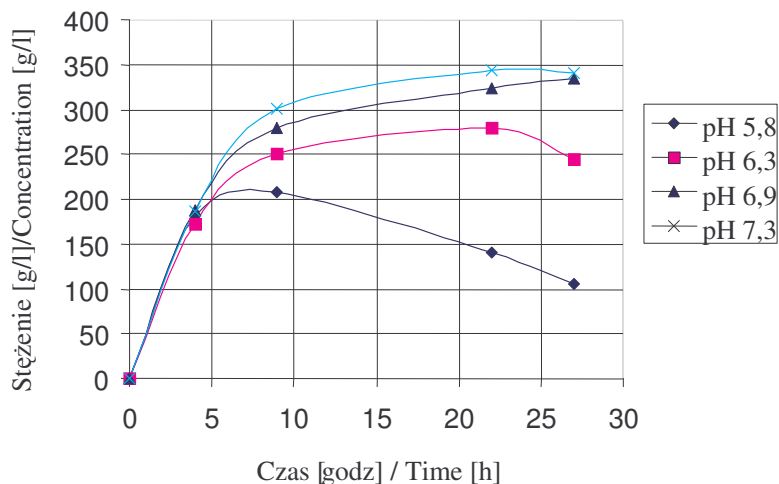
Fig. 2. Changes in the kestose and fructose concentration rates in the 50, 65, 73% (m/m) solutions having pH = 7.2, in the presence of Fructozyme (the applied amount of which is 0.4 ml/l) depending on the duration of the bioconversion reaction.

Tabela 2

Zmiana udziału sacharydów w s.s. roztworu o stężeniu 50–73 % (m/m) w zależności od czasu biokonwersji w obecności preparatu Fructozyme w dawce 0,4 ml/l roztworu.

Changes in the FOS content in dry matter contained in the hydrolysate solution, its concentration being 50–73%, depending on the time of bioconversion proceeding in the presence of the preparation Fructozyme applied in the amount of 0.4 ml/l solutions.

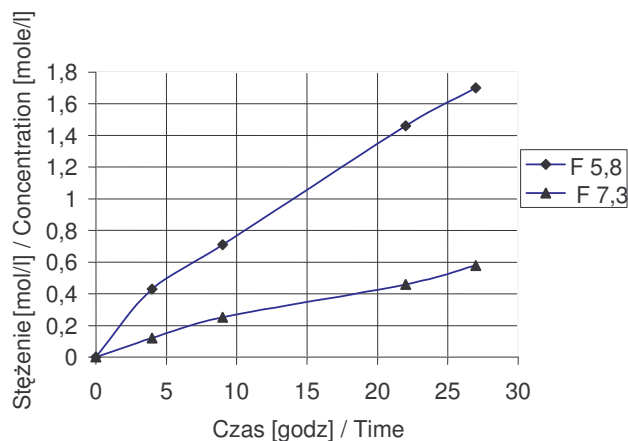
Stężenie sacharozy Concentration of saccharose [%]	Zawartość [% s.s.] / Content [% d.m.]														
	Kestoz / Kestose					FOS DP _{≥4}					Fruktoza / Fructose				
	Czas [godz.] / Time [h]														
	4	8	12	16	20	4	8	12	16	20	4	8	12	16	20
50	8,5	12,0	12,2	12,2	10,5	0,4	0,8	0,8	0,8	1,0	2,0	4,3	6,9	9,7	10,9
60	16,0	23,5	29,8	33,8	34,3	0,8	3,0	5,0	6,9	8,3	1,8	3,7	4,4	4,8	5,2
65	18,0	29,0	33,0	35,3	35,5	0,8	3,4	5,2	7,2	9,9	1,4	2,7	4,5	5,2	6,2
70	11,5	19,8	25,1	31,7	36,2	0,5	2,0	3,0	3,9	5,5	1,2	2,3	2,9	3,7	4,5
73	10,6	16,4	20,3	24,4	27,3	0,3	0,9	1,4	1,8	2,8	1,1	2,0	2,5	3,2	4,0



Rys. 3. Zmiana zawartości sumy FOS w roztworze sacharozy o stężeniu 69% (m/m) i pH w zakresie 5,8–7,3 w obecności Fructozyme w dawce 0,4 ml/l w zależności od czasu reakcji.

Fig. 3. A reaction-time depending change in the FOS sum in a 69% (m/m) saccharose with a pH value from 5.8 to 7.3 in the presence of Fructozym added in an amount of 0.4 ml/l fructose.

Na podstawie rys. 4. można stwierdzić różnicę w skutkach działania fruktofuranazy w roztworach sacharozy o wartościach pH 5,8 i 7,3. Doświadczenie powyższe wykazuje, że β -fruktofuranazyda z *Aspergillus niger* zawarta w preparacie Fructozyme zmienia aktywność, podobnie jak fruktofuranazyda z *Aspergillus oryzae* [19]. W związku z powyższym preparat Fructozyme w ściśle określonych warunkach biokonwersji jest przydatny do otrzymywania syropów zawierających FOS w ilości około 40% s.s. i stężeniu s.s. 70–73% (m/m). Zaletą stosowania Fructozyme do otrzymania syropu typu kestożowego jest niska cena enzymu i możliwość wytwarzania syropów bez potrzeby zateżenia z minimalną obróbką termiczną. Wadą stosowania tego preparatu jest względnie wysoki udział fruktozy w mieszaninie sacharydów, który wynika z obecności w roztworze β -fruktozydazy o aktywności $FD\ 1050\ U_F/1\ ml$ (tab. 1.). Inną wadą obecności fruktozy w roztworze jest tendencja do jego brązowienia oraz hamowanie transglikozylacji. W tab. 3. przedstawiono skład sacharydów na początku oraz po 8 godz. transglikozylacji w 69% roztworze wodnym o pH 7,2 i o różnym udziale sacharozy i fruktozy w obecności preparatu Fructozyme w dawce 1 ml/l.



Rys. 4. Zmiana stężenia fruktozy podczas biokonwersji w roztworach sacharozy o stężeniu 69% (m/m) przy pH 5,8 i 7,3 w zależności od czasu reakcji.

Fig. 4. A change in the fructose concentration during the bioconversion occurring in 69% (m/m) saccharose solutions, at a pH value equalling 5.8 and 7.3 depending on the time of reaction.

Z danych tab. 3. wynika, że w miarę zmniejszania udziału molowego sacharozy w mieszaninie z fruktozą, od 100% do 18%, proporcjonalnie malała wydajność tworzenia kestozy i nystozy, odpowiednio od 70% do 23%. Wydajność tworzenia inulobiozy wzrosła jedynie do około 30% i przez to sumaryczna wydajność FOS przy ponad 50% udziale molowym w mieszaninie reakcyjnej wyniosła średnio 55%, wobec 70% w roztworze sacharozy i 65% z 33% udziałem molowym fruktozy. Dane zawarte w tab. 3. świadczą o dwukrotnym wzroście natężenia zabarwienia roztworów zawierających 33% udział fruktozy w porównaniu z zabarwieniem roztworu mieszaniny sacharydów otrzymanych wyłącznie z sacharozy. Enzymatyczna modyfikacja sacharozy w mieszaninie z fruktozą przy udziale Fructozyme prowadziła do otrzymania mieszaniny FOS o gorszych cechach fizykochemicznych i składzie FOS. Działanie probifidogenne inulobiozy jest bowiem mniejsze niż oligomerów o $DP \geq 3$. W związku z powyższym, wzorując się na pracach Hanga [9, 10], podjęto próbę znalezienia handlowych preparatów enzymatycznych otrzymywanych z *Aspergillus niger* o korzystnych proporcjach aktywności FT i FD. Zbadano kilkanaście preparatów pektolitycznych, celulolitycznych i amylolitycznych, z których kilka wykazało pożądane właściwości transglukozytacji reszty fruktozy w roztworach sacharozy. Jednym z interesujących enzymów o wymienionych właściwościach jest Novoferm, użyty w dawce 1–2,5 U_T/g sacharozy.

Tabela 3

Skład mieszaniny sacharydów i zabarwienie hydrolizatów po 8 godz. transglikozylacji w 69% roztworach wodnych o pH 7,2 i o różnym udziale początkowym sacharozy i fruktozy w obecności preparatu Fructozyme w dawce 1 ml/l.

The composition of saccharides mixtures and colour of hydrolysates after the 8-hour transglycosylation proceeding in 69% aqueous solutions (69% of dry matter), their pH = 7.2, in the presence of Fructozyme (its applied dose: 1 ml/l) with various initial content rates between the saccharose and fructose.

Stężenie sacharydów Concentration of saccharides									Zabarwienie Colour ICUMSA		Wydajność transglikozylacji Yield of transglycosylation [%]		
Stężenie początkowe Initial concentration			Stężenie po 8 godz. [mol/l] Concentration after 8 hours [mole/l]										
S [mol/l]	F [mol/l]	Udział molewowy S [%]	N	K	I	S	G	F	IU	Δ	K+N	IN	Σ FOS
2,70	0,00	100	0,079	0,66	0	0,90	1,05	0,22	85	0	70,3	0	70,3
2,16	1,03	67	0,051	0,52	0,07	0,77	0,99	0,92	170	85	57,7	7	64,7
1,62	2,06	44	0,024	0,32	0,16	0,57	0,88	1,89	265	180	39,0	18	57
1,35	2,57	34	0,018	0,24	0,19	0,43	0,86	2,35	310	225	30,0	22	52
0,81	3,60	18	0,005	0,10	0,22	0,24	0,66	3,30	335	245	23,0	33	56

Objaśnienia: / Explanatory notes:

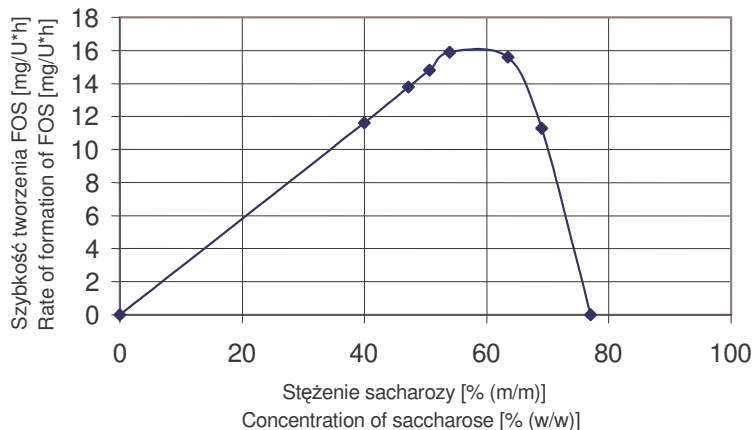
Wydajność / yield KN = $(C_{nys} + C_{kes}) / C_{gl} \cdot 100$;

Wydajność / yield IN = $C_n / C_{gl} \cdot 100$;

S – sacharoza / saccharose, F – fruktoza / fructose, N – nystoza / nystose, K – kestoza / kestone, I – inulobioza / inulobiose, G – glukoza / glucose;

Δ – przyrost zabarwienia w stosunku do roztworów sacharozy / increase in the colour intensity if compared with the colour of saccharose solutions.

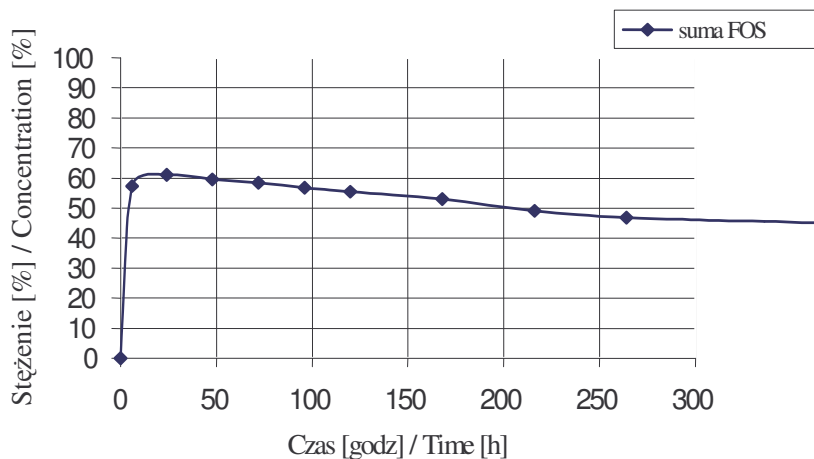
Na rys. 5. przedstawiono średnią szybkość tworzenia FOS w mg/U·godz. w zależności od początkowego stężenia sacharozy w obecności preparatu Novoferm w dawce 1,4 U/ml i T=55°C. Największą szybkość powstawania FOS, wynoszącą ~16 mg/U·godz. uzyskano przy stężeniu roztworu 55–60% (m/m). Zatem było to stężenie o 10 jednostek mniejsze od optymalnego stężenia s.s. dla enzymów zawartych w preparacie Fructozyme. Jest to pośrednie potwierdzenie małej aktywności β-fruktozydazy w preparacie Novoferm.



Rys. 5. Średnia szybkość tworzenia FOS w roztworach sacharozy o różnym stężeniu w obecności preparatu Novoferm.

Fig. 5. The average rate of forming FOS in various saccharose solutions with different concentration values in the presence of Novoferm.

Na rys. 6. zilustrowano zmianę zawartości sumy FOS w czasie biokonwersji sacharozy o stężeniu 55% (m/m) w ciągu 300 godz. (dawka enzymu 2,0.U/g). Maksimum 61% udziału FOS w s.s. wystąpiło po ok. 25 godz., po czym ogólna zawartość FOS zmniejszała się stopniowo do ~48% po 300 godz. reakcji. Zmiany udziału kestozy, nystozy i fruktozylonytozy w sumie FOS w czasie powyższej biokonwersji przedstawiono na rys. 7.

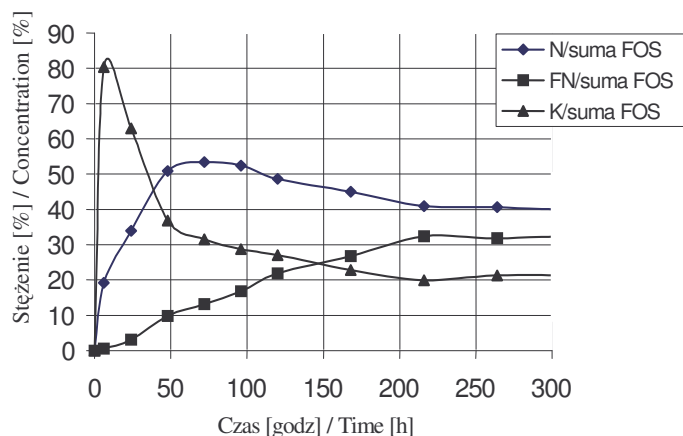


Rys. 6. Zmiana zawartości sumy FOS [%] w czasie biokonwersji sacharozy w roztworze o stężeniu 55% (m/m) z użyciem preparatu Novoferm w dawce 2 U/g sacharozy w czasie do 300 godz.

Fig. 6. A change in the FOS sum content [%] during the bioconversion of saccharose in a 55% (m/m) solution with a Novoferm preparation added (2 U Novoferm per 1 g of saccharose) during a period not exceeding 300 h.

Ponad 82-procentowy udział kestozy uzyskano po około 20 godz. reakcji, a następnie zawartość jej zmniejszała się asymptotycznie do około 20% s.s. po 250 godz. Maksymalny 55% udział nystozy wystąpił po około 100 godz. reakcji, po czym jej

udział zmniejszył się do 40% po blisko 300 godz. Fruktozylonystoza osiągnęła 33% zawartości w s.s. po około 250 godz.

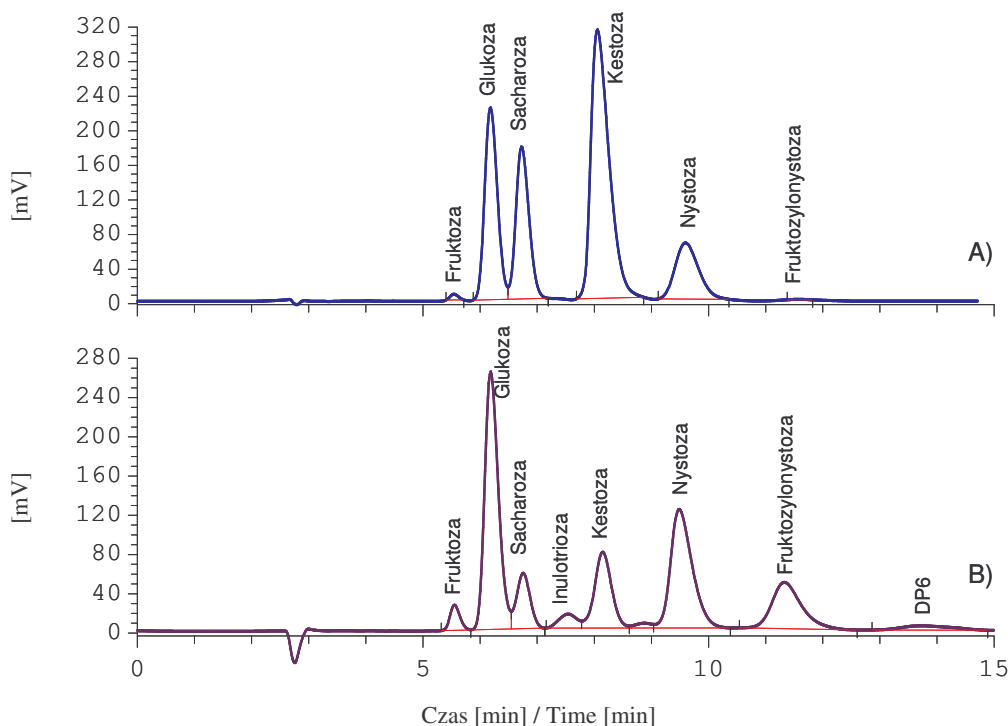


Rys. 7. Zmiany ilościowe w mieszaninie kestosy, nystozy i fruktozylonystozy w czasie biokonwersji sacharozy (początkowe stężenie 55% m/m) z użyciem preparatu Novoferm (2 U/g sacharozy).

Fig. 7. Quantitative changes in a mix of kestose, nystose, and fructosyl-nystose during a saccharose bioconversion (initial solution concentration: 55% m/m) with a Novoferm preparation (2 U/g saccharose).

Wnioskować można zatem, że sukcesywne procesy transglikozylacji reszty fruktozy w środowisku już powstałych oligomerów przebiegają konsekwentnie, jednak z coraz mniejszą wydajnością z uprzywilejowanym udziałem nystozy w składzie s.s. W związku z powyższym przerywając transglikozylację w określonym czasie lub etapie tworzenia FOS można otrzymać różne typy syropów różniące się składem chemicznym, a w konsekwencji również właściwościami fizycznymi i biologicznymi. Ze względów praktycznych, a w szczególności możliwie krótkiego czasu biokonwersji, można wyróżnić dwa zasadnicze typy syropów: kestozowy (K), w którym udział kestosy w sumie FOS jest większy niż 60% oraz nystozowo-glukozowy (NG) o przybliżonym równym udziale glukozy i nystozy.

Na rys. 8. przedstawiono chromatogramy koncentratu FOS typu K z dominującym udziałem kestosy i koncentratu FOS typu NG. W dotychczasowych publikacjach dotyczących enzymatycznej modyfikacji sacharozy w celu otrzymania krótkołańcuchowych FOS zwracano zasadniczą uwagę na optymalizację warunków otrzymywania ich sumy [4, 10, 29, 34]. Z drugiej strony w skali przemysłowej możliwe jest skrócenie procesu transglikozylacji, zwłaszcza jeżeli w dalszym etapie prowadzone jest chromatograficzne rozdzielanie składników z wykorzystaniem zjawiska wykluczania [34].

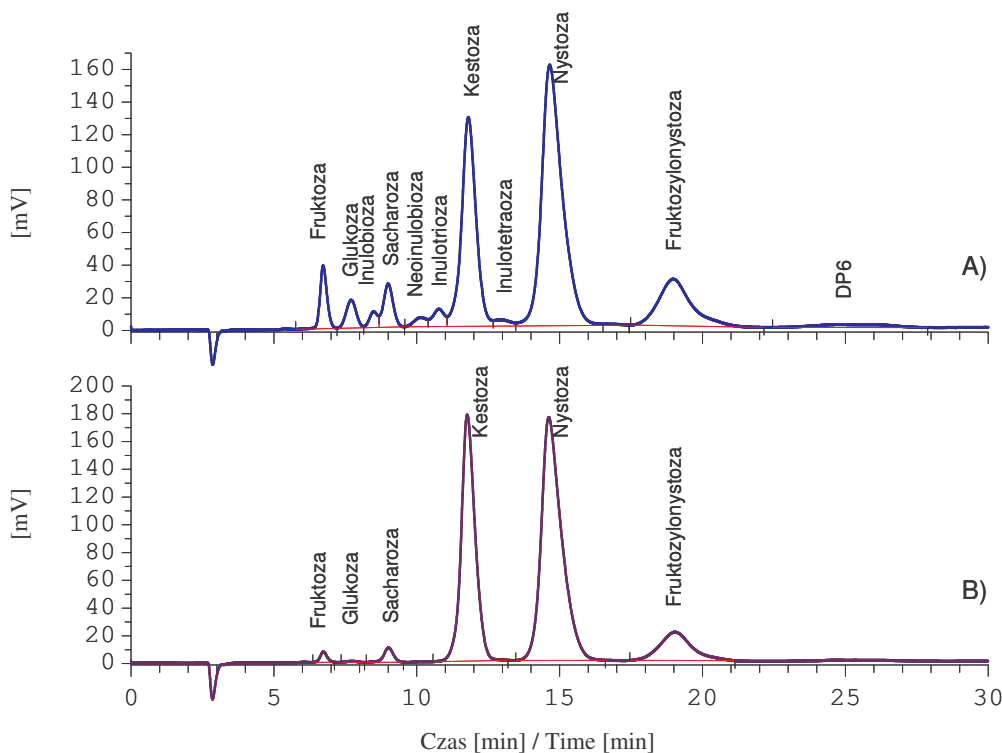


Rys. 8. Chromatogramy sacharydów zawartych w koncentracie FOS typu K (A) i koncentracie FOS typu NG (B) [16].

Fig. 8. HPLC profiles of saccharides in concentrates: FOS type K (A) and FOS type NG (B) [16].

Doświadczenia przedstawione poniżej wskazują na możliwość ominięcia drogiego procesu chromatograficznego rozdzielania składników. W wyniku należytego doboru preparatu enzymatycznego, jego dawki i warunków biokonwersji oraz ewentualnego zastosowania dodatkowych procesów korzystnych do selektywnego usuwania glukozy ze środowiska reakcji, można wytwarzać dwa rodzaje syropów bogatych w nystozę. Jeden syrop wraz z glukozą, tj. typ nystozowo-glukozowy (NG) i drugi syrop nystozowy (N) otrzymany po usunięciu glukozy, zawierający w suchej masie co najmniej 75% FOS. Roztwory o stężeniu około 40% s.s. zawierające blisko 80% FOS w s.s. można przeprowadzić w postać proszku przez suszenie rozpyłowe. Na rys. 9. przedstawiono przykładowy chromatogram preparatu w proszku otrzymanego według opisu przedstawionego w niniejszej pracy i chromatogram oligosacharydów preparatu standardowego firmy Wako Pure (handlowe preparaty FOS firmy Wako Pure są otrzymywane przez biokonwersję sacharozy, po której następuje proces niskociśnieniowej chromatografii przemysłowej z otrzymaniem frakcji kestozy-nystozowej poddawanej zateżaniu i suszeniu rozpyłowemu [34]). Zauważalne jest podobieństwo składu jakościowego obydwu preparatów i nieznaczne różnice w składzie ilościowym. Preparat FOS Wako Pure, oprócz kestozy i nystozy zawartych w równych ilościach, zawierał F-nystozę, niewielkie ilości fruktozy i sacharozy oraz

śladowe ilości glukozy, inulobiozy i neoinulobiozy. Preparat własny FOS PL 90 oprócz trzech głównych oligomerów FOS (nystozy, kestozy i Fnystozy) zawierał niewielkie ilości oligomerów homogennych, tj. inulotetraozy, inulotriozy i inulobiozy.



Rys. 9. Chromatogramy sacharydów preparatu FOS PŁ-90 (A) i preparatu firmy Wako Pure (B).

Fig. 9. HPLC profiles of saccharides in an FOS PŁ-90 (A) preparation and in a preparation made by Wako Pure (B) company.

Zawierał również fruktozę, glukozę i sacharozę w ilości do 10%. Preparat FOS PL 90 składowany w warunkach typowych dla preparatów sypkich nie ulegał zbryleniu, może to wynikać z dużego udziału nystozy i jej małej higroskopijności. W preparacie FOS WP i FOS PL 90 w śladowych ilościach występował składnik, który jest typowy dla biokonwersji sacharozy w obecności β -fruktozydazy [7], jest to β -D-fruktofuranozylo(2 \rightarrow 6)- α -D-glukopiranoza (neoinulobioza).

Roztwory zawierające powyżej 72% s.s., w których udział FOS w s.s. przekraczał 70%, podczas składowania w temp. $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ulegały zmętnieniu, a następnie pojawiał się w nich krystaliczny osad. Na podstawie oznaczeń chromatograficznych i analizy MS stwierdzono, że jest to nystoza ($M=667,2$). Wydaje się dalece prawdopodobne, że nieoczekiwana łatwość krystalizacji nystozy z odpowiednich roztworów po enzymatycznej modyfikacji sacharozy przynosi nowe możliwości wytwarzania ściśle zdefiniowanego składu oligomerycznego FOS w postaci bardzo dogodnej do

stosowania. Na obecnym etapie badań brak jest uzasadnienia łatwości krystalizacji nystozy ze złożonych roztworów.

T a b e l a 4

Skład oligomeryczny syropów FOS różnego typu oraz preparatów FOS różnego pochodzenia.
Content of oligomers contained in FOS syrups of various types and in commercial FOS preparations of different origins.

Produkt Product	Zawartość [% s.s.] Content [% d.m.]											
	GlF	S	I	NIN	K	N	FN	DP ≥ 6	Σ FOS	$\frac{N}{FOS} \cdot 100$	$\frac{DP \geq 4}{FOS}$	
FOS typ K _F	31,5	27,5	-	0,9	32,2	7,7	0,2	0	40,1	19,2	19,7	
FOS typ K	19,7	28,6	-	0,6	42,1	8,7	0,2	0	51,6	16,9	17,2	
FOS typ NG	34,0	8,3	0,8	1,9	17,0	29,2	8,5	0,3	57,7	50,6	65,9	
FOS typ N	11,5	9,0	0,5	1,5	27,9	40,3	8,4	0,3	79,5	50,7	61,6	
FOS PL 90	5,8	3,5	1,1	3,0	25,9	45,1	13,7	1,9	90,7	49,7	66,9	
Nystoza PL	0,6	0,9	-	-	5,1	91,8	1,6	0	98,5	93,2	94,8	
FOS WP	0,9	1,5	-	-	35,9	52,0	9,7	0	97,6	53,3	63,2	
Raftilose	2,7	0,2	3,0	29,0	0,7	27,6	3,8	11,8	7,6	13,6	96,1	32,7 ¹⁾

Objaśnienia / Explanatory notes:

S – sacharoza / saccharose, F – fruktoza / fructose, N – nystoza / nystose, K – kestoza / kestose, I – inulobioza / inulobiose, NIN – neoinulobioza / neoinulobiose, G – glukoza / glucose;

¹⁾ jako / as $\frac{IT + N}{FOS}$

W tab. 4. zestawiono skład oligomeryczny typowych syropów FOS otrzymanych w pracy, dwóch własnych preparatów stałych oraz handlowego preparatu Wako Pure (FOS WP) i Raftilose. Syrop typu kestożowego (FOS K), otrzymany z udziałem preparatu Fructozyme, zawierał najmniejszy udział oligofruktozy w s.s. przy zachowaniu podobnego udziału nystozy do s.s. jak w syropie typu kestożowego, otrzymanego z zastosowaniem preparatu Novoferm. Syropy oligofruktozy typu nystozowego, niezależnie od obecności glukozy, zawierały ponad 65% oligomerów DP ≥ 4 w s.s., tj. nieco więcej niż w preparatach FOS Wako Pure, otrzymanych z zastosowaniem procesu chromatograficznego. Krystaliczna nystoza, wyizolowana z syropów FOS typu nystozowego, była najbardziej skoncentrowaną postacią oligofruktozy o zawartości 94,8% oligomerów o DP ≥ 4.

Skład oligomeryczny syropów FOS typu nystozowego i preparatów proszkowych FOS 90 PL był bogatszy niż preparatów Wako Pure o oligomery homogenne: inulotriozę i inulobiozę, typowe dla preparatów FOS otrzymanych przez biokonwersję inuliny [3].

Wnioski

1. Syropy fruktooligosacharydowe o dominującym udziale kestozy w s.s. otrzymuje się najłatwiej i najtaniej, nawet z dużym udziałem aktywnej fruktozylotransferazy, towarzyszącej fruktofuranozydazie, pod warunkiem użycia roztworu sacharozy o dostatecznie wysokim stężeniu i pH bliskiego 7.
2. Niektóre preparaty enzymatyczne z *Aspergillus niger*, przeznaczone do produkcji soków owocowych i piwa, np. Novoferm, zawierają aktywną fruktozylotransferazę i dzięki temu są przydatne do wytwarzania koncentratów FOS o różnym, lecz przewidywalnym udziale kestozy, nystozy i fruktozylonystozy.
3. Roztwory po enzymatycznej modyfikacji sacharozy, zawierające ponad 50% nystozy w przeliczeniu na sumę fruktooligosacharydów, a w szczególności pozbawione glukozy przez enzymatyczne jej utlenienie, umożliwiają otrzymanie preparatów proszkowych zawierających co najmniej 80% fruktanów w s.s.
4. Z roztworów mieszaniny sacharydów o stężeniu 72% i udziale fruktooligosacharydów ponad 70% w s.s. krystalizuje nystoza i dzięki temu można otrzymać bardzo dogodną postać użytkową składnika prebiotycznego.

Badania finansowane przez KBN w ramach projektu PBZ-KBN/021/PO6/99/27/B

Literatura

- [1] Anderson H.B., Alleged L.H., Bosses I.G.: Nondigestibility characteristics of inulin and oligofructose in humans. *J. Nutr.*, 1999, **129** (75), 14289-14309.
- [2] Biedrzycka E., Bielecka M.: Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci. Technol.*, 2004, **15**, 170-175.
- [3] Booten K., Deleenheer L.: Method for preparing a polydispersed saccharide composition. Patent USA, 2001, 2001016572 (EP 0917588).
- [4] Bornet F.R.J., Brouns F., Tashiro Y., Duvilier V.: Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digest Liver Dis.*, 2002, (34) Suppl., 5111-5120.
- [5] Byung W.K., Yun J.W.: Selective production of GF₄-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme. *Biotechnol. Lett.*, 1998, **20** (11), 1031.
- [6] Cheng Tao: Tonic oligofructose salt as oral liquid. Patent chiński, 2001, CN 1289596.
- [7] Farine S., Versluis C., Bonnici P.J., Heck A., Peschet J.L., Puigserver A., Biagini A.: Separation and identification of enzymatic sucrose hydrolysis products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatog. A*, 2001, **920**, 299-308.
- [8] Fritz M.: Self-foaming soluble beverage powder. Patent USA, 2003, 6669979.
- [9] Hang U.D., Woodams E.E., Jang K.Y.: Fructosyltransferase activity of commercial enzyme preparations used in fruit juice processing. *Biotechnol. Lett.*, 1995, **17**, 741-747.
- [10] Hang Y.D., Woodams E.E.: Optimization of enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. *Lebensmittel-Wirtschaft und Techn.*, 1996, **29** (5/6), 578-580.
- [11] Hayashi S., Tobouchi M., Takasaki Y., Smada K.: Long-term continuous reaction of immobilized β -fructofuranosidase. *Biotechnol. Lett.*, 1994, **16**, 227-228.

- [12] Hidaka H., Hirayama M., Sumi N.: A fructooligosaccharide producing enzyme from *A. niger* Agric. Biol. Chem., 1998, **52**, 1181-1187.
- [13] Iiang S.: Yeast gene engineering bacterium and endoinulase preparation and its application method. Patent chiński, 2002, 1341709.
- [14] IUB – IUPAC, Abbreviated terminology of oligosaccharide chains.: J. Biol. Chem., 1982, **257**, 3347-3351.
- [15] Jung K.H., Lim J.Y., Yon S/L: Production of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Lett., 1987, **9**, 703-708.
- [16] Król B., Gałązka I. Grzelak K.: Jakościowy i ilościowy skład β -fruktooligosacharydów w preparatach prebiotycznych różnego pochodzenia. Złożone do druku w Żyw. Człow i Met.
- [17] Król B., Klewicki R.: Sposób enzymatyczny wytwarzania glukonianu wapnia. Patent polski, 2004, P-326112.
- [18] Król B.: Sposób wytwarzania mieszanin fruktooligosacharydów o pożądanej zawartości kestozy i nystozy. Zgłoszenie patentowe, 2003, P-3262881.
- [19] Kurakake M., Onoue T., Kumaki T.: Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by β -fructofuranosidase from *A. oryzae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1996, **45**, 236-239.
- [20] Lüscher M., Erdin Ch., Sprenger N.: Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. FEBS Lett., 1996, **385**, 39-42.
- [21] Ninness K.,R.: Inulin and oligofructose: What a they?. J. Nutr., 1999, **129 (75)**, 14023.
- [22] Nisher M., Frehner M., Nösberger J.: Purification and some properties of fructan: fructan fructosyltransferase from dandelion (*Taraxacum officinale*). New Phytologist, 1993, **123**, 437 – 442.
- [23] PN-91/L-84102:1991. Nadtlenek wodoru.
- [24] PN-A-74850:1996. Cukier biały.
- [25] Rao A.V.: Dose response effects on inulin and oligofructose on intestinal bifidogenic effects. J. Nutr., 1999, **129**, 14425-14459.
- [26] Rao A.V.: The probiotic properties of oligofructose and low intake levels. Nutr. Research, 2001, **21**, 843-848.
- [27] Ritsema T., Smeekens S.: Fructans: beneficial for plants and humans. Current Opinion in Plant Biology, 2003, **6**, 223-230.
- [28] Sangette P.T., Ramshur M.N., Prapulla S.G.: Production of Fructo-oligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. Process Biochem., 2004, **39**, 753-758.
- [29] Schiweck H., Munir M., Rapp K.M., Schneider B., Vogel M.: New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. In: Carbohydrates as organic raw materials, ed. Lichtenthaler F.W., VCV, New York 1991, pp. 57-94.
- [30] Seike M. Patent japoński 59-95895.
- [31] Spiegel J.E., Frankos V.H., Schmitt D.F., Rose K., Karabell P.: Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. Food Technol., 1994, **48 (1)**, 85-89.
- [32] Wilson J.: Nutritional formulation containing prebiotic substances. Patent USA, 2003, US 060445.
- [33] Yun J.W., Song S.K., Han J.H., Cho Y.C., Lee J.H.: Separation and purification of fructooligosaccharides by ion-exchange resin column. Korean J. Biotechnol. Bioeng., 1993, **9**, 35- 39.
- [34] Yun J.W.: Fructooligosaccharides – occurrence, preparation and application. Enzyme and Microbiol. Technology, 1996, **19**, 107-117.

**PRODUCTION OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDES (FOS) CONCENTRATIONS WITH
VARIOUS CONTENTS OF OLIGOMERS USING ENZYMATIC
BIOCONVERSION OF SACCHAROSE**

S u m m a r y

In the paper, there are described conditions for bioconversion of saccharose into FOS preparations by commercial enzyme preparations (Fructozyme or Novoferm containing fructosyltransferase). The main objective of this bioconversion was to manufacture 3 FOS syrups and 2 powders containing 50%-60%, and over 90% of fructans respectively.

It was proved that the transglycosylation of the fructose moiety was a three-phase process when the enzyme was applied in doses of 1.0–2.5 U/g saccharose.

During the first phase, kestose is a major fructan formed (nearly 80% of the synthesized FOS). During the second stage, kestose is transformed into nystose (over 50% of the synthesized FOS). Additionally, during the third stage, a balance state among kestose, nystose and F-nystose (their proportion rates are 2:4:3) is settled.

It was proved that after the glucose has been removed by an enzymatic oxidation, the nystose-rich solutions of FOS can be dried off using a spray-drying method; the dry-off process shall occur under the conditions similar to the production of powder milk. Furthermore, it was evidenced that from among all the nystose syrups containing over 72% (w/w) of dry matter, the nystose crystallizes with a little amount of kestose applied in the form of a non-hygroscopic fine-crystal substance.

Key words: fructooligosaccharides, fructosyltransferase, fructosidase, transglycosylation ☒