

Enzymová a kyslá hydrolýza inulínu

ZDENO SAMEK - STANISLAV ŠILHÁR - LUDOVÍT POLÍVKA

Súhrn. Z hlíz topinambúr v rôznom období ich vegetačného štádia sme izolovali a čiastočne purifikovali fruktózový polymér - inulín. Definovali sa optimálne podmienky pre jeho enzymovú a kyslú hydrolýzu. Enzymová hydrolýza inulinázou (Novo Industry) pri pH 4,5 a teplote 60 °C je limitovaná aktivitou enzýmu a dobou pôsobenia. Pri aplikácii 5 U/g inulínu - za 6 hodín bol stupeň hydrolýzy 100 %-ný pri koncentrácii substrátu 10 %. Hydrolýzou - kyselinou chlorovodíkovou pri pH 2,0 a teplote 90 °C sme docielili 100 %-ný stupeň hydrolýzy za 45 minút, pri teplote 75 °C 70 %-ný. Za týchto podmienok (pH 2,0, t = 75 °C) už po 10-tich minútach hydrolýzy sme v reakčnej zmesi nestanovili prítomnosť polysacharidu.

Vysoký príjem tukov a sacharidov v strave a znížená spotreba vlákniny potravy spôsobuje rad vážnych ochorení. Z toho dôvodu boli vyvinuté a ďalej sa vyvíjajú nové alternatívne náhrady tukov a sacharidov, hlavne na báze prírodných zdrojov [1].

Jedným z významných zdrojov náhrady tuku a sacharózy je fruktózový polymér inulín, v ktorom rôzne dlhé lineárne reťazce molekúl fruktózy spojené s väzbami β -(2-1) sú vždy zakončené jednou glukózovou jednotkou [2]. Inulín sa prirodzene vyskytuje asi v 30 000 rôznych druhoch rastlín [3]. Pre priemyselnú výrobu inulínu a oligosacharidov sa využíva čakanka (*Cichorium intybus* L.) a hlúzy topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.), v ktorých sa vyskytuje inulín vo vysokých množstvách.

Inulín a fruktooligosacharidy sú utilizované črevnými baktériami z rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, ktoré v konečnom dôsledku inhibujú proliferáciu ostatných nežiadúcich druhov mikroflóry gastrointestinálneho traktu a produkty ich metabolizmu pozitívne ovplyvňujú zdravie človeka [4]. Vzhľadom na nízku energetickú hodnotu inulínu a jeho derivátov (4 - 10 kJ/g) sú vhodné aj ako objemové zložky pre čiastočnú náhradu tukov a sacharózy v širokom spektre potravín [5].

RNDr. Zdeno Samek, Doc. Ing. Stanislav Šilhár, CSc., Doc. Ing. Ludovít Polívka, CSc., Výskumný ústav potravinársky, pracovisko Modra, Stefánikova 45, 900 01 Modra.

Známe je použitie viacerých typov enzýmov schopných hydrolyzovať inulín na oligosacharidy a fruktózu, ktoré môžu byť zaradené do troch hlavných skupín [3,6]:

- | | | |
|------|--------------------------|----------------|
| I. | Exo-inulináza | [EC 3.2.1.80] |
| | (Invertáza | [EC 3.2.1.60]) |
| II. | Endo-inulináza | [EC 3.2.1.7] |
| III. | Inulín fruktotransferáza | [EC 2.4.1.93] |

Podobne v prácach mnohých autorov je uvádzaná nestálosť fruktózového polyméru v prostredí kyslého pH za zvýšenej teploty [7].

V našej práci sme sa zamerali na izoláciu inulínu z hlúz topinambur, jeho purifikáciu a optimalizáciu podmienok kyslej a enzýmovej hydrolýzy.

Materiál a metódy

Izolácia a čiastočná purifikácia inulínu

Umyté a očistené hlúzy vyzretej rastliny topinambur (mesiac október) sme plátkovali pomocou kuchynského rezača ETA. Rezký sme extrahovali trikrát vodou pri teplote 80 °C po dobu 1 hodiny dynamicky. Pomer rezkov k vode bol 1 : 5. K spojeným extraktom sme pridali hydroxid vápenatý do výslednej koncentrácie 0,4 % a temperovali pri teplote 60 až 65 °C pokým nenastala koagulácia koloidných a plávajúcich kontaminantov. Tieto sme odfiltrovali spolu so vzniknutou sadrou. Volné vápenaté ióny sme vyzrážali vo forme nerozpustného uhličitanu vápenatého prebublávaním s CO₂. Po následnej filtrácii a odfarbovaní šťavy pomocou aktívneho uhlia sme konečný produkt zahustili reverznou osmózou.

Stanovenie inulínu

Inulín sme stanovili ako redukujúce cukry metódou podľa Schoorla po predchádzajúcej a úplnej hydrolýze (pH 2,0, 100 °C, 30 minút). Obsah je vyjadrený ako fruktóza.

Stanovenie obsahu dusíka

Obsah celkového dusíka sme stanovili metódou podľa Kjeldahla [8].

Hydrolýza inulínu

Inulín sme hydrolyzovali kyselinou chlorovodíkovou. Rýchlosť hydrolýzy sme sledovali v závislosti na dobe reakcie (0 - 60 minút) a pH reakčnej zmesi (pH 2,0, 3,0 a 4,0). Hydrolýza prebiehala pri 90 °C, pri pH 2,0 reakčnej zmesi aj pri 75 °C. Pre enzýmovú hydrolýzu inulínu sme použili komerčný preparát inulinázy - Novozym 230 (Novo Industry, Dánsko). Sledovali sme rýchlosť hydrolýzy inulínu v závislosti od koncentrácie enzýmu (1 U, 2 U, 5 U na 1 gram

substrátu v reakčnej zmesi. Reakčné podmienky ($\text{pH} = 4,5$ a $t = 60^\circ\text{C}$) sme zvolili na základe odporúčenia výrobcov.

Analýza inulínu a jeho derivátov na tenkej vrstve

V práci sme použili tenkovrstvovú chromatografiu na silikagéli od firmy Merck (DC - Alufolien Kieselgel), vyvíjací roztok zmes n-butanolu-acetónu-vody v pomere 4 : 5 : 1 a detekčné činidlo roztok difenylamínu - anilínu.

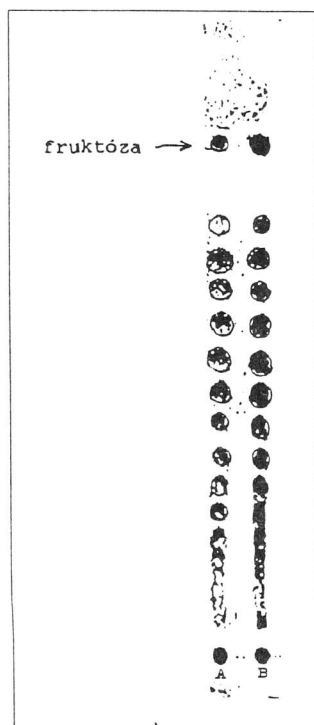
Výsledky a diskusia

V práci sme použili ako zdroj inulínu hľuzy z topinambúr, zberané v jesennom vegetačnom období, kedy je obsah inulínu najvyšší.

Popísaným postupom sme izolovali a čiastočne purifikovali z vyzretých hľúz inulín. Po trojnásobnej extrakcii rezkov hľúz topinambúr sme stanovili celkový obsah inulínu a jeho hodnota, 19,3 g inulínu na 100 g topinambúr, je v korelácii s výsledkami iných autorov [9,10]. Následnou purifikáciou sme získali číry roztok inulínu s celkovým výťažkom 18 g na 100 g topinambúr a obsahom dusíka 0,01 %. Metódou tenkovrstvovej chromatografie na silikagéli sme analyzovali nami izolovaný inulín a porovnávali s komerčným preparátom (Fibrulin, Belgicko). Z obrázku č.1 je zrejmé, že preparáty sa v zastúpení mono- a oligosacharidov zásadne nelíšia. Preto je možné princípy nami vypracovanej metódy izolácie a čiastočnej purifikácie pre prípravu inulínu pre potravinárske aplikácie považovať za dostačujúce.

S cieľom získať mono- a oligosacharidy inulínu sme sa zamerali na definovanie podmienok pre kyslú hydrolýzu priameho extraktu inulínu (2 % roztok) a overenie možnosti získať roztok sacharidov z koncentrovaného roztoku inulínu (10 %) po extrakcii komerčným preparátom termostabilnej inulinázy.

Enzymovú hydrolýzu inulínu sme uskutočnili pri optimálnych podmienkach katalýzy deklarovaných výrobcom: koncentrácia substrátu 10 %, $\text{pH} 4,5$ a 60°C . Hydrolyzovali sme 10 %-ný vodný roztok inulínu



Obr.1. Tenkovrstvová chromatografia na silikagéli.

A - komerčný preparát inulínu - Fibrulin, B - izolovaný inulín. Fig.1. Thin-layer chromatography with silica gel.

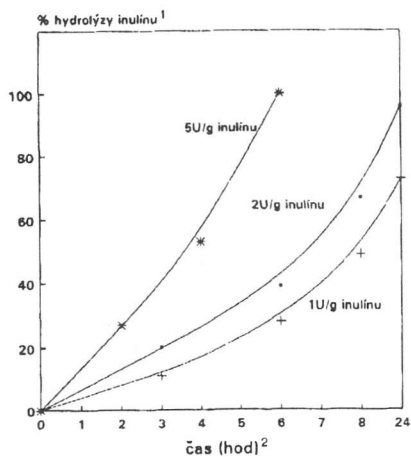
A - commercial inulin preparation - Fibrulin, B - isolated inulin.

získaný zakoncentrovaním pôvodného purifikovaného extraktu. Sledovali sme priebeh hydrolýzy pri rôznej aktivite enzýmu (1 U, 2 U a 5 U na 1 gram inulínu v reakčnej zmesi). Výsledky experimentu sú zrejmé z grafu na obr. č.2. Stupeň hydrolýzy po 24 hodinách pri použití 1 U % g inulínu dosiahol 72 %, pri použití 2 U/g inulínu - 98 %. Pri použití 5 U/g inulínu bolo 98 % inulínu hydrolyzovaných už po 6-tich hodinách a 100 % po šiestich hodinách reakcie.

Pri relatívne vysokej koncentrácii substrátu v našich experimentoch je rýchlosť reakcie hydrolýzy priamo úmerná koncentrácii enzýmu, najmä v prvých piatich hodinách, čo je zrejmé z rastu smernice lineárnej časti kinetickej krivky (pri 1 U/g inulínu = 3,1, pri 2 U/g inulínu = 13,3). Tento výsledok poukazuje na možnosť jednoduchej regulácie rýchlosti hydrolýzy pri priemyselnej produkcii oligosacharidov a využitie kinetického efektu pri regulácii priemernej molekulovej hmotnosti výsledného produktu.

Pôvodný 2 %-ný roztok inulínu sme hydrolyzovali pomocou katalytického účinku kyseliny chlorovodíkovej pri pH 2,0, 3,0 a 4,0 a teplote 90 °C, pri pH 2,0 aj pri teplote 75 °C. Priebeh hydrolýzy je zrejmý z grafu na obr.3. Pri nižších teplotách je rýchlosť hydrolýzy pomerne nižšia. Pri 90 °C a pH 4,0 nepresiahol stupeň hydrolýzy 20 %.

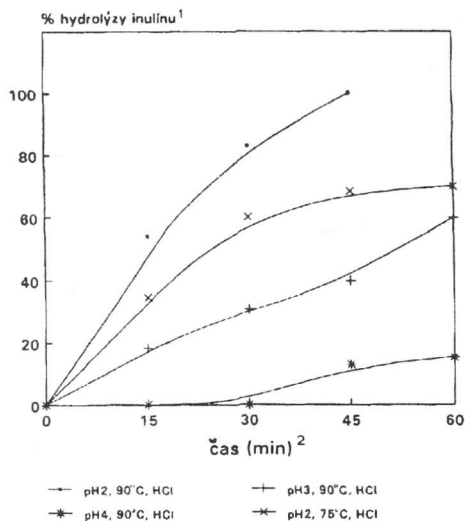
Kinetiku reakcie významne ovplyvňuje koncentrácia H^+ iónov v reakčnej zmesi. Po 15-tich minútach reakcie a pH 4,0 prakticky neboli stanovené štiepne



Obr.2. Závislosť hydrolýzy inulínu od počtu jednotiek inulázy.

Fig.2. Dependence of inulin hydrolysis on number of inulinase units.

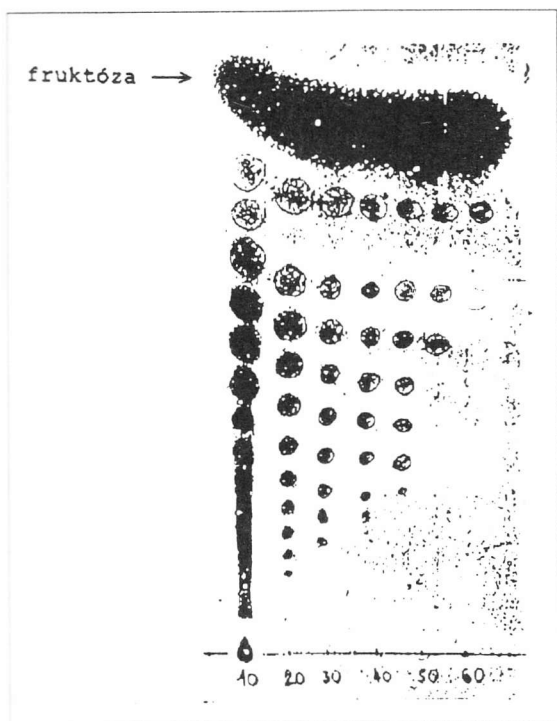
1 - inulin hydrolysis percentage, 2 - time (hour).



Obr.3. Hydrolýza inulínu s HCl.

Fig.3. Inulin hydrolysis with HCl.

1 - inulin hydrolysis percentage, 2 - time (min).



Obr.4. Tenkovrstvová chromatografia kyslej hydrolyzy izolovaného inulínu v priebehu 10, 20 až 60 minút.
Fig.4. Sour hydrolysis thin-layer chromatography of isolated inulin in 10, 20,...60 minutes.

produkty, naopak pri pH 2,0 v rovnakom čase prebehla hydrolyza už na 60 %. Po hodine reakcie dosiahol stupeň hydrolyzy pri tomto pH 100 %.

Zloženie štiepných produktov v rôznych časových intervaloch pri pH 2,0 a teplote 75 °C je vidieť z chromatogramu na obr.4.

Ako vidieť už po 10 minútach, keď celkový stupeň hydrolyzy dosiahol 50 % sa už v roztoku nenachádza pôvodný inulín. Obsah vyšších oligosacharidov s časom hydrolyzy výrazne klesá až na takmer 100 %-ný obsah fruktózy. Je teda zrejmé, že vhodnou voľbou reakčného času a podmienok hydrolyzy je možné pripraviť zmes fruktooligosacharidov s rôznou molekulovou hmotnosťou a zastúpením jednotlivých oligosacharidov.

Priemyselné spracovanie zatiaľ u nás netradične pestovaných topinambúr predstavuje jednu z možných ciest prípravy fruktózových, respektíve fruktooligosacharidových sirupov i vzhľadom na vysokú hektárovú výnosnosť topinambúr a obsah fruktózy v optimálnom čase zbere úrody [9]. V práci použitý postup spracovania bližšie nešpecifikovaného druhu topinambúr predstavuje alternatívny zdroj využitia technologických zariadení v našom spracovateľskom priemysle pre izoláciu inulínu podobne ako i pre prípravu jeho derivátov fruktózových a fruktooligosacharidových sirupov.

Porovnaním kyslej a enzymovej hydrolyzy inulínu je z procesárskeho aspektu pre prípravu fruktózového sirupu výhodnejšia enzymová hydrolyza inulínu ako kyslá. Aplikáciou vhodného počtu jednotiek enzýmu pred procesom epurácie je možné v krátkom čase dosiahnuť úplnú hydrolyzu

inulínu, čím by sa znížili energetické náklady, ale i na aromatizáciu zariadení v porovnaní s kyslou hydrolyzou. Ďalším nedostatkom kyslej hydrolyzy je dehydratácia molekúl fruktózy a vznik nežiadúcich vedľajších produktov za podmienok hydrolyzy vedených pri $\text{pH} < 2$ a $\text{teplôt} \geq 100^\circ\text{C}$ [10].

Ďalšie práce budú zamerané na stanovenie optimálnych podmienok parciálnej kyslej, resp. enzymatickej hydrolyzy inulínu s cieľom prípravy fruktooligosacharidových sirupov s rôznym percentuálnym zastúpením monosacharidov, resp. disacharidov k oligosacharidom. Obr.4. je príkladom, že kyslá hydrolyza inulínu vedená za miernejších podmienok by mohla byť jednou z možných ciest prípravy fruktooligosacharidových sirupov.

Literatúra

1. ROBERTFROID, M.: Critical Rev. in Food Science and Nutrition, 33, 1993, s.103-148.
2. TEEUVEN, H. - THONÉ, M. - VANDORPE, J.: Intern. Food Ingrid., 5, 1992, s.10-14.
3. FUCHS, A.: Starch, 39, 1987, s.335-343.
4. SPIEGEL, J.E. - ROSE, R. - KARABELL, P.: Food Technology, 1, 1994, s.85-89.
5. LUPTON, R - CODER, D.: J. Nutrition, 118, 1988, s.840-846.
6. UCHIMAZA, T. - TANAKA, K. - KAWAMURA: Denpun Kagaku, 35, 1988, s.113-120.
7. PEKIČ, B. - SLAVICA, B. - LEPOJEVIČ, Ž. - PETROVIČ, S.: Food Chem., 17, 1985, s.169-173.
8. PRÍBELA, A. - ŠORMAN, L. - SMIRNOV, V.: SVŠT, CHTF Bratislava, Návod na laboratórne cvičenie z analýzy potravín, 1984.
9. BARTA, J. - VUKOV, K. - FODOR, P. - PICHLER, E.: Zuckerind., 114, 1989, s.397-400.
10. HÖHN, E.: Lebensmittel-Technology, 19, 1986, s.34-39.
11. KUSTER, B.F. - TEMMINK, M.G.: Carbohydrate Res., 54, 1977, s.185-190.

Do redakcie došlo 5.5.1995.

Enzymatic and acid hydrolysis of inulin

ZDENO SAMEK - STANISLAV ŠILHÁR - LUDOVÍT POLÍVKA

Summary. We have isolated and partially purified fructose polymer - inulin - from bulbs of topinambur (*Helianthus tuberosus L.*) in its various vegetative stages. Optimum conditions for its enzymatic and acid hydrolysis has been defined. Enzymatic hydrolysis by means of inulinase (Novo Industry) at pH 4.5 and temperature of 60°C is limited by enzyme activity and time of its action. When applying 5 U/g of inulin into 10 % substrate, degree of hydrolysis was 100 % in 6 hours time. With the application of hydrochloric acid at pH 2.0 and 90°C , 100 % degree of hydrolysis and at 75°C , 70 % degree of hydrolysis have been achieved within 45 minutes. Under these conditions (pH 2.0, $t=75^\circ\text{C}$) we have not determined a presence of polysaccharide in reaction mixture as early as after 10 minutes.