

A tartózkodási idő és az enzimkoncentráció hatása frukto-oligoszacharidok szintézisére enzimes membránreaktorban

Kulcsszavak: funkcionális élelmiszerek, prebiotikumok, fruktozil transzferáz, frukto-oligoszacharidok (FOS), membránszűrés, nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), szakaszos üzemmódú keverős-tartályreaktor, folytonos üzemű enzimes membránreaktor, szacharóz

1. Összefoglalás

Az egészségtudatos fogyasztói attitűd terjedésével egyre népszerűbbek a jótékony hatású funkcionális élelmiszerek, amelyek bizonyítottan pozitívan befolyásolhatják az egészségi állapotot és különböző betegségek kialakulásának kockázatát is csökkenthetik. Kutatásunkban a prebiotikus élelmiszereken belül az oligoszacharidokkal, azon belül is a frukto-oligoszacharidokkal foglalkoztunk. A piaci igényeket kielégítő nagymértékű ipari előállítást főként reaktorokban végzik, így célzott kutatások zajlanak annak érdekében, hogy minél magasabb fokú konverziót érjenek el, és ennek megvalósításához szükséges optimalizálni az egyes beállítási paramétereket. A szacharózból kiinduló enzimes szintézis végezhető szakaszos, illetve folyamatos üzemmódú reaktorokban. Kutatásunkban a szakaszos, illetve folyamatos üzemű reaktorokban történő szacharóz-frukto-oligoszacharid konverziót vizsgáltuk, valamint azokat a műveleti paramétereket, amelyek nagymértékben befolyásolják a frukto-oligoszacharidok kihozatalát. A szacharóz-frukto-oligoszacharid átalakulást folytonos üzemű enzimes membránreaktorban 6 kísérlettel különböző paraméter kombinációkban vizsgáltuk az enzimkoncentráció (5–40 g/kg) és a tartózkodási idő (1, 1–2, 0 h) változtatásával. Az elvezetett termék szénhidrát összetételének vizsgálatát nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával végeztük. A szakaszos üzemű keverős-tartályreaktorban végzett szintézis során a szacharóz koncentráció több mint felére csökkent a kiindulási koncentrációhoz képest, míg a frukto-oligoszacharidok hozzávetőlegesen 45%-ban jelentek meg a termékben. Eredményeink azt mutatják, hogy bár az enzimes membránreaktor a termékhozam tekintetében alul teljesít a kevert tartályos reaktorral szemben (45% vs 9,5–40,5%), lehetővé teszi az enzimentes frukto-oligoszacharidok folyamatos előállítását. Nagyobb enzim koncentráció és/vagy hosszabb tartózkodási idő alkalmazásával a termékáramban magasabb polimerizációs fokú frukto-oligoszacharidok (GF3) is megjelentek. Az eredmények alapján meghatároztuk az adott paraméterek optimális beállításait, hogy a lehető legmagasabb fokú konverziót tudjuk elérni.

¹ Soós Tészta Kft.

² Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

2. Bevezetés

Napjainkban egyre fontosabbá válik, hogy az elfogyasztott élelmiszereknek az egészségre pozitív hatása is legyen [2]. A funkcionális élelmiszerek pozitív hatásokkal rendelkezhetnek, többek között emésztésjavító hatással, csökkentik a koleszterinszintet és a szívbetegségek kockázatát, csökkentik a különböző daganatos megbetegedések kockázatát illetve javítja a mentális és fizikai teljesítményt [3]. A funkcionális élelmiszerek közé tartoznak a probiotikumok is, amelyeknek fontos szerepe van többek között az optimális bélműködés biztosításában, a megfelelő vastagbél mikroflóra összetétel kialakításában, a bél limfoid szövet funkciójának szabályozásában [4]. A probiotikum jelenlegi fogalmát az ILSI Europe (International Life Science in Europe) FUFOSE (Functional Food Science in Europe) programján belül határozták meg. A probiotikus táplálék, olyan élő mikroorganizmusokkal való kiegészített élelmiszert jelent, melynek elfogyasztása jótékony hatással van az emberi szervezetre [5].

A prebiotikumok olyan nem emészthető élelmiszer-összetevők, amelyek a szelektív metabolizmusoknak köszönhetően kedvezően hatnak a béltraktusban lévő baktériumok növekedésére, és hogy ezek a jótékony mikroorganizmusok megfelelő mennyiségben legyenek jelen. A prebiotikumok tehát szubsztrátok a már bélrendszerben élő baktériumok számára, elősegítve a növekedésüket, aktivitásukat. Így lehetőséget adva egy egészségesebb mikroflóra kialakulására, amely az egészségi állapotot pozitívan befolyásolja [6]. A prebiotikumok előnyei, hogy kémiai és fizikailag stabilak, széles körben alkalmazhatóak, valamint hozzájárulnak az élelmiszerek íz és aroma kialakításához. Ahhoz, hogy a prebiotikumokat élelmiszer-összetevőként alkalmazzák, tisztázni kell a kritériumokat. A készítmény:

- ellenálló legyen a gyomor savasságával szemben, képesség a gyomor-bélrendszeri felszívódásra,
- erjeszhető legyen a bélrendszerben található mikroorganizmusok számára,
- serkentse a jótékony baktériumok növekedését és aktivitását.

A fent említett kritériumok mindegyike nélkülözhetetlen, de mégis a legfontosabb és legnehezebben megvalósuló a fent felsoroltak közül a harmadik [7].

Jelenleg a frukto-oligoszacharidok, galakto-oligoszacharidok, a laktulóz és az inulin azok a prebiotikumok, amelyek mindhárom kritériumnak megfelelnek. Az oligoszacharidok és előállításának lehetőségei. Az oligoszacharid név alatt a 3-10 monoszacharid egységből felépülő glikozidos vegyületeket értünk [8]. Kinyerhetjük őket enzimatis hidrolízissel különböző biomasszákból, illetve egyszerű oligoszacharidokból enzimatis transzfer reakcióval. A fő prebiotikus oligoszacharidok a piacon a frukto-oligoszacharidok, a galakto-oligoszacharidok és az inulin [6]. A frukto-oligoszacharidok olyan emészthetetlen élelmiszer-összetevők, amelyek bizonyítottan erősítik az immunrendszert, javítják a bélműködést, gátolják a kórokozó mikroorganizmusok növekedését, szaporodását, illetve csökkentik a daganatos betegségek kialakulásának kockázatát is [9]. Továbbá olyan lineáris fruktóz egységekből felépülő oligoszacharidok, amelyek β -(1-2) glikozidos kötéssel kapcsolódnak és számos mikroorganizmusban, illetve növényben megtalálható fruktozil transzferáz enzim segítségével előállíthatók. A frukto-oligoszacharidok legegyszerűbb képviselője az 1-kesztóz (GF2), amely kettő fruktóz molekulát és egy glükóz egységet tartalmaz. További képviselője a nisztóz (GF3), amely egy glükóz és három fruktóz molekulát tartalmaz; 1F-fruktozilnisztóz (GF4), amely egy glükóz és négy fruktóz molekulából épül fel [10].

A frukto-oligoszacharidok szerkezeti azonosítására és mennyiségi meghatározására analitikai technikák széles skálája alkalmazható. Ezeket Erdős és munkatársai (2018) által jegyzett korábbi tanulmányunkban foglaltuk össze [11]. A különböző polimerizáltsági fokú frukto-oligoszacharidok mennyiségi meghatározásának legelterjedtebb módszere a kationcserés (Na^+ , Ag^+ , Ca^{2+}) oszlopos nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) [12]. A frukto-oligoszacharidok előállítását tekintve többféle gyakran alkalmazott eljárás létezik. A termelés megvalósítható szakaszos üzem módú keverős-tartályreaktorban, folytonos üzem módú enzimes membránreaktorban, illetve rögzített enzimes eljárással.

3. Anyagok és módszerek

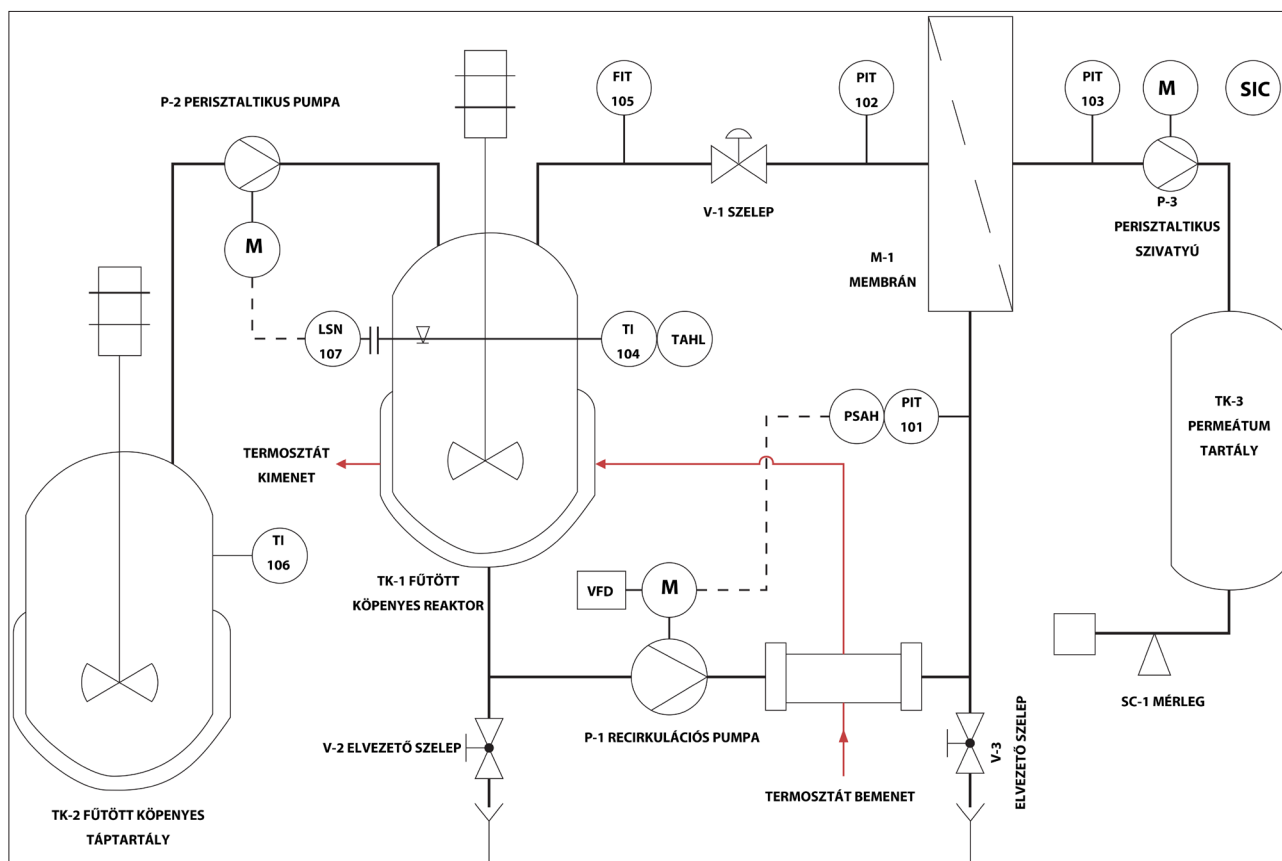
A frukto-oligoszacharidok szintéziséhez a Magyar Cukor Manufaktúra Kft. által előállított szacharózt alkalmaztunk (Diamant Kristálycukor). Továbbá ioncserélt vizet használtunk az oldatok elkészítésére. Az elkészített oldat megfelelő pH beállításához 1M NaOH-ot illetve 10% HCl-ot használtunk. A szintézishez felhasznált enzim a Pectinex Ultra SP-L volt, amelyet a Novozymes vállalat (Bagsvaerd, Dánia) állít elő. A jelen pektináz *Aspergillus aculeatus* fajtából izolált enzim, amelynek optimális működéséhez szükséges feltételei: pH optimum 5,5-6,5, hőmérséklet 50-55 °C.

3.1. Frukto-oligoszacharidok bioszintézise szakaszos üzemű keverős-tartályreaktorban

A frukto-oligoszacharidok szakaszos üzemű szintézisét három párhuzamos méréssel végeztük. Összefoglalva ezeket a lépéseket:

1. A termoblokk bekapcsolása, 90 °C-ra való felfűtése.
2. 400 g/kg koncentrációjú szacharóz oldat elkészítése.
3. Az elkészített szacharóz oldat felmelegítése 50 °C-ra, keverés mellett.
4. Az oldat pH-jának beállítása (pH = 5,5-6,0).
5. 2 g/kg Pectinex Ultra SP-L adagolása a szacharóz oldatba.
6. Mintavétel meghatározott időpontokban.
7. Mintavétel után azonnali hőkezelés a termoblokkban, 90 °C-on, 30 percig.
8. HPLC analízisig a mintákat fagyasztóban kell tárolni.

Az első lépés az elvezetett termékekben lévő enzimek inaktiválásához szükséges termoblokk (Grant QBT4, Cambridge, Anglia) bekapcsolása és felfűtése 90 °C-ra. Majd adott koncentrációjú szacharóz oldat elkészítése, jelen esetben ehhez 200 g szacharózt és 800 g ioncserélt vizet alkalmaztunk, amelyet teljes oldódásig kevertettünk. Az elkészült oldatból 200-200-200 g-ot mértünk ki három 500ml-es Erlenmeyer lombikba. Az oldatok felmelegítését 50 °C-ra kerámia lapos digitális fűtőlappal (IKA C-MAG HS 7) végeztük folyamatos kevertetés mellett. A fűtőlappal az IKA-Werke vállalat terméke (Staufen, Németország), amelyhez csatlakoztatva a hőmérséklet szabályozó egységet (IKA ETS D-5, IKA-Werke, Staufen, Németország), amellyel az oldatokat állandó hőmérsékleten tudtuk tartani. A szacharóz oldatok hőmérsékletének stabilizálódása után az enzim optimális működéséhez szükséges pH 5,5-6,0 beállítása következett, amelyet 1 M koncentrációjú HCl oldattal értünk el. A folyamatosan kevertetett oldathoz 2 g/kg koncentrációjú Pectinex Ultra SP-L-t adtunk, majd



1. ábra. Folytonos üzemű enzim membránreaktor felépítése (Kovács, 2014 nyomán)

mintavételt végeztünk a 0. időpillanatban. A kísérlet első 4 órájában fél óránként, majd a következő 3 órában óránként történt, legvégül pedig a 23,5 órakor és 24 órakor történt a mintavétel. Az oldatból elvett mintákat azonnal a 90 °C-os termoblokkba helyeztük 30 percre az enzim inaktiválásának céljából. Az így 39 mintából álló sorozatot hígítás után HPLC-vel vizsgáltuk a szénhidrát összetétel meghatározása miatt.

3.2. Frukto-oligoszacharidok bioszintézise folytonos üzemű enzimes membránreaktorban

A folytonos üzemű enzimes membránreaktor felépítését a **1. ábra** mutatja be. A reaktorba (TK-1) meghatározott mennyiségű friss, meghatározott koncentrációjú szacharóz oldat került, amelyet a termosztát állandó hőmérsékleten tart. A kívánt hőmérséklet elérésekor enzim adagolása szükséges a cukor oldatba, amelyet az ultraszűrő membránon (M-1) keresztül cirkuláltat egy szivattyú (P-1). A membránszűréshez alkalmazott ultraszűrő membrán (UF) egy 0,37 m² aktív felületű, 20 kDa vágási értékű spiráltekeres szűrő modul, ami a Synder Filtration vállalat (Vacaville, USA) terméke. A reaktorban (TK-1) az oldat állandó térfogatát egy szintérezékelőhöz (LSN 107) csatlakoztatott perisztaltikus pumpa (P-2) biztosítja. Az elvezetett permeátum térfogatának megfelelő mennyiségű friss oldat a táptartályból (TK-2) kerül a reaktorba (TK-1). A szűrés hajtóereje a retentátum és a permeátum oldal közötti transzmembrán nyomáskülönbség (Δp). A retentátum oldali nyomást szelep (V-1) segítségével lehet szabályozni. A membrán két oldala közötti nyomáskülönbséget a membrán két oldalán elhelyezett nyomásmérő (PIT 102 és PIT 103) mutatja. A permeátum térfogatáramát egy perisztaltikus szivattyú (P-3) fordulatszámának beállításával lehetséges állandó értéken tartani. A permeátum összegyűjtése a TK-3 permeátum tartályban történik. Az elvezetett termék nem tartalmaz enzimet.

A frukto-oligoszacharidok szintézisét folytonos üzemű enzimes membránreaktorban végeztük. Első lépésként a szacharóz oldatot készítettünk el, amelynek a koncentrációja minden oldat esetén 400 g/kg. A reakció megfelelő végbemeneteléhez – a szacharóz magas konverziójához – viszonylag magas szacharóz koncentrációjú oldat szükséges. A szacharóz gyorsabb oldhatósága miatt 50 °C-ra melegítettük fel az elkészült oldatot. Ez a hőmérséklet az alkalmazott enzim hőmérsékleti optimuma is. Az enzim megfelelő működéséhez pH beállítás is szükséges volt, jelen esetben ez pH 5,5, amelyet 1 M koncentrációjú HCl oldattal értünk el. A TK-1 reaktorba 2 kg mennyiségű friss, 400 g/kg koncentrációjú, 50 °C-ra felmelegített szacharóz oldat került, amelyet a termosztát állandó hőmérsékleten tartott. Ezek voltak a fix paraméterek a kísérlet sorozat alatt. Amikor az oldat hőmérséklete állandósult, Pectinex Ultra SP-L enzimet adagoltunk a szacharóz oldatba, amelyet az ultraszűrő membránon (M-1) keresztül cirkuláltat egy szivattyú (P-1). Az alkalmazott enzimmennyiségeket a **1. táblázat** mutatja be.

A TK-1 reaktorban állandó térfogatú a szacharóz oldat, hiszen a szintérezékelő (LSN 107) segítségével az elvezetett termék mennyiségével megegyező friss oldatot táplál be a perisztaltikus szivattyú (P-2) a TK-1 tartályba. Megfelelő mennyiségű friss oldat a táptartályból (TK-2) kerül a reaktorba. A retentátum oldali nyomást szelep (V-1) segítségével szabályoztuk és ezáltal állandó értéken tartottuk. A nyomáskülönbséget a membrán két oldalán elhelyezett nyomásmérő segítségével lehetett figyelni. A permeátum térfogatáramát a perisztaltikus szivattyú fordulatszámának beállításával tartottuk állandó értéken. Az elvezetett termék a permeátum tartályban került összegyűjtésre, amely nem tartalmazott enzimet a membránnak köszönhetően. A beállított paraméterektől függően alakult a frukto-oligoszacharidok, glükóz és szacharóz mennyiségének eloszlása az elvezetett termékben.

A szacharóz-frukto-oligoszacharid átalakulást folytonos üzemű enzimes membránreaktorban 6 kísérlet révén vizsgáltuk. Mindegyik kísérletben különböző paramétereket állítottunk be, amelyeket a **1. táblázat** mutatja be.

1. táblázat. A folytonos működésű enzimes membránreaktor különböző beállítási paraméterei

Mérés	Enzimkoncentráció [g/kg]	Perisztaltikus pumpa ford.sz. (p-3) [rpm]	Tartózkodási idő [h]
1	5	24	1,1
2	5	12	2,1
3	15	12	2,1
4	20	12	1,7
5	50	12	1,6
6	40	16	2,0

A következő paramétereket fixen tartottuk mind a hat kísérletben: a reaktorban lévő oldat tömegét, a szacharóz koncentrációt és a hőmérsékletet. A változó értékek pedig az enzim koncentráció, illetve a tartózkodási idő.

40 w/w%-os szacharóz oldatot készítettünk, amelyet a cukorkristályok teljes feloldódásáig kevertünk, majd a pH-t beállítottuk 5,6 értékre 1M NaOH illetve 10% HCl segítségével. Ezután 2 kg oldat került az enzim membránreaktorba. Amikor az oldat a termosztát segítségével elérte az 50 °C-ot, majd az első kísérletben hozzáadtunk 5 g/kg Pectinex Ultra SP-L enzimet. Következő lépésként a cirkulátató szivattyút 0,15 m³/h térfogatáramra, majd a retentátum oldali nyomást szabályozó szelepet 1,0 bar-ra, a permeátum oldali szivattyú sebességét pedig 24 rpm-re állítottuk be. A kísérlet során az oldat mennyisége állandó volt a reaktorban, hiszen a szintérzékelő segítségével a táptartályból az elvezetett termékkel megegyező mennyiségű friss, 50 °C-os szacharóz oldatot vezetett a reaktorba.

A második kísérlet során az előzőhöz hasonlóan változatlan mennyiségű (5 g/kg) Pectinex Ultra SP-L enzimet adtunk a rendszerhez. Az előző méréshez képest csökkentettük a szivattyú fordulatszámát 24 rpm-ről 12 rpm-re, a többi paramétert változatlanul hagytuk.

A harmadik kísérlet megnövelt mennyiségű, azaz 15 g/kg Pectinex Ultra SP-L enzimet adtunk a rendszerhez.

A negyedik kísérlet során hozzáadtunk 20 g/kg Pectinex Ultra SP-L enzimet. A többi paraméter változatlan maradt.

Az ötödik kísérlet során 50 g/kg Pectinex Ultra SP-L enzimet adtunk az oldathoz. A többi paraméter változatlan maradt.

A hatodik kísérlet esetén 40 g/kg Pectinex Ultra SP-L enzimet használtunk. A szivattyú fordulatszámát az előzőekhez képest 12 rpm-ről 16 rpm-re változtattuk, de a többi paraméter változatlan maradt.

A mérés során vett mintákat a következőképpen hígítottuk: 200µl minta és 800µl desztillált víz. Erre azért volt szükség, hogy a minták koncentrációja biztosan a kalibrált méréstartományba essen. A HPLC analízis megkezdéséig az elkészített mintákat fagyasztóban tároltuk. Az analízis segítségével meghatároztuk a minták szénhidrát összetételét a mintavételi idő függvényében.

3.3. Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

A permeátum szénhidrát-összetételének vizsgálatát egy széleskörben elterjedt, standard HPLC módszer adaptálásával végeztük a kalibráció elvégzése után [12]. A vizsgálni kívánt mintákat először hígítottuk, majd behelyeztük a mintaadagolóba. Az alkalmazott mozgó fázis ioncserélt víz, amelyet egy szivattyú segítségével vezetünk végig a rendszeren. A desztillált víz az eluens tartályból először a vákuum gáztalanító egységbe kerül (Spectra System SCM1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). A vákuum gáztalanító segítségével a mozgó fázisból eltávolíthatóak az oldott gázok, amelyek negatívan befolyásolhatják a mérést. A mozgó fázisba kerülő légbuborékok zavarják a szivattyú egyenletes és folyamatos működését és így nem tud ugyanakkora térfogatú eluent szállítani. Következő lépésként az elkészített mintákat az automatikus mintavevő (Spectra SERIES AS100, Spectra-Physics, Ferment, USA) a mozgó fázisba juttatja. A mozgó fázis tovább szállítja a mintát. Az automata mintavevő termosztátjában található a védőoszlop (Rezex RNM-Carbohydrate Na+ (8 %), Phenomenex, Torrance, USA), amelyet az analitikai oszlop védelmében alkalmaznak, illetve a HPLC oszlop (Rezex RNM-Carbohydrate Na+ (8%), Phenomenex, Torrance, USA). Fontos a reprodukálhatóság szempontjából, hogy mindkettő oszlop állandó hőmérsékleten legyen, jelen esetben 50 °C, amelyet a termosztát biztosít. A minta vegyületei különböző sebességekkel mozognak az álló fázisban, így különböző időpillanatokban fogják elhagyni az oszlopot. Az adott időpillanatban kilépő vegyületek a detektorba jutva a koncentrációjával arányos elektromos jel fog keletkezni. A refraktív index (RI) detektor (Melz LCD 312, VDS optilab Chromatographie technik GmbH, Berlin, Germany) a jelet az analóg/digitál jelátalakítóhoz (N2000 Chromatography Data System, Science Technology (Hangzhou) Inc., Kína) küldi. Az elkészült digitális jelet a számítógép dolgozza fel. A kromatogramok értékelését Surwit® 2000 (N2000 Photographic Data Workstation, Science Technology Inc., Hangzhou., Kína) szoftvercsomag segítségével végeztük. A vegyületek más és más retenció ideje alapján megkülönböztethetőek és az egyes alkotókhöz tartozó csúcsok (peak) területeinek arányából ki lehet számolni a különböző szénhidrátok koncentrációját.

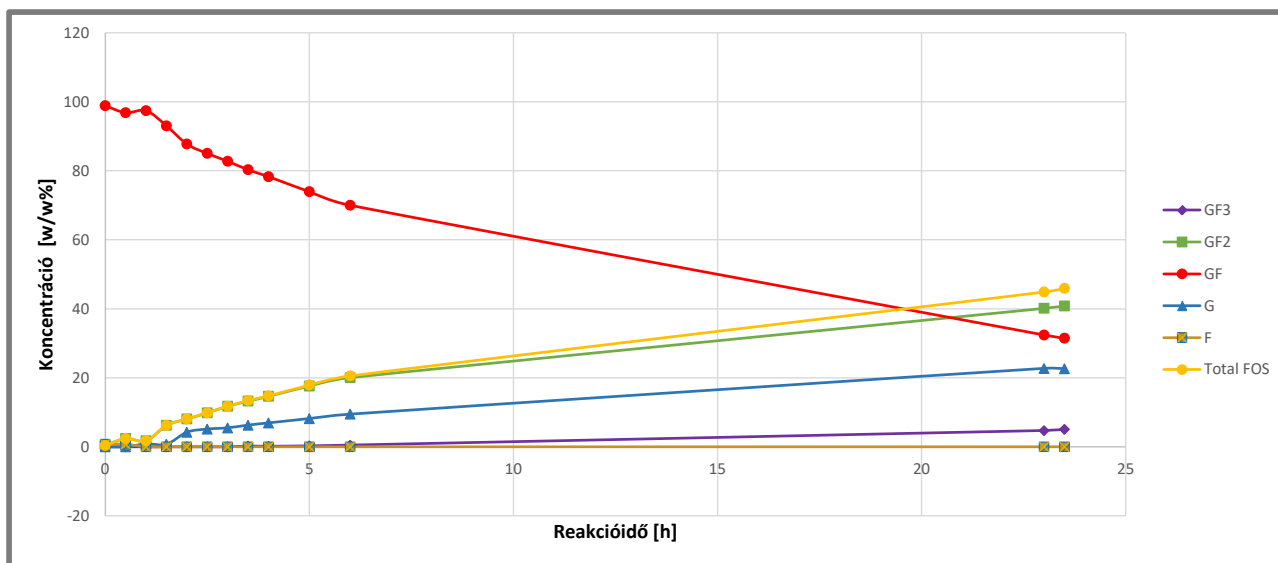
4. Eredmények és értékelésük

A szacharóz-frukto-oligoszacharid átalakulást vizsgáltuk szakaszos üzemű keverős-tartályreaktorban illetve folytonos üzemű membrános enzimreaktorban. Minden kísérlet esetében 400 g/kg koncentrációjú szacharóz oldatot alkalmaztunk. Különböző paraméterek változtatása révén vizsgáltuk a szacharóz-frukto-oligoszacharid konverzió fokát, amelyeket az alábbiakban mutatunk.

4.1. Szacharóz-frukto-oligoszacharid átalakulás vizsgálata szakaszos üzemű keverős-tartályreaktorban

A szacharóz-frukto-oligoszacharid átalakulását három párhuzamos mérés során vizsgáltuk szakaszos üzemű

keverős-tartályreaktorban (STR). A kísérlet célja, hogy adott beállítások mellett meghatározzam a konverzió hatásfokát. A kiindulási oldatként egy 40 w/w %-os szacharóz oldatot alkalmaztunk, amelyhez a megfelelő hőmérséklet és pH elérése után adtuk hozzá a 2 g/kg Pectinex Ultra SP-L enzimet. Megfelelő időközönként mintát vettünk, majd hőkezelés révén inaktívtuk a termékben lévő enzimet. A mintákat HPLC analízis alá vetettük. A következő diagram mutatja be a kapott szénhidrát összetételi adatokat (**2. ábra**).



2. ábra. Szacharóz-frukto-oligoszacharid átalakulás szakaszos üzemű keverős-tartályreaktorban (G – glükóz, GF – szacharóz, GF2 – 1-kesztóz, GF3 – nisztóz, F – fruktóz, Total FOS – összes frukto-oligoszacharid) (Paraméterek: 400 g/kg koncentrációjú szacharóz oldat, hőmérséklet: 50 °C, pH = 5,6, enzimkoncentráció: 2 g/kg, inaktíválás: 90 °C-os termoblokkban 30 percig)

A diagram alapján megállapítható, hogy a szacharóz koncentrációban hozzávetőlegesen 20%-os csökkenés érhető el már a mérés első négy órájában, a reakció végére pedig már 60–70%-os csökkenés. A frukto-oligoszacharidok hozzávetőlegesen 45 %-ban vannak jelen a végtermékben. Megállapítható, hogy a szakaszos üzemű keverős-tartályreaktorban végzett enzim katalízissel magas frukto-oligoszacharid átalakulást lehet elérni. Viszont a hátránya, hogy az elvezetett termék enzimet tartalmaz, így azt további lépésekben el kell távolítani és tisztítani szükséges a terméket. Az enzim inaktíválást 90 °C-on 30 percig végeztük. A gyártók számára az enzim inaktíválása további költségeket jelent, továbbá időigényesebb eljárás is, viszont nagyon jó konverziós hatásfok érhető el ezzel a módszerrel.

4.2. Szacharóz-frukto-oligoszacharid konverzió vizsgálata folytonos üzemű enzimes membránreaktorban

A szacharóz-frukto-oligoszacharid átalakulását 6 rövid távú (8–10 órás) kísérlettel vizsgáltuk. A kísérleteket a fent bemutatott folytonos üzemű enzimes membránreaktorban végeztük. A kísérletsorozat célja egy olyan optimális beállítás meghatározása volt, amellyel megállapítható a legjobb konverziós hatásfok és az állandósult állapot ('steady-state') kialakulásának körülményei. A mérés során szükséges volt a tartózkodási idő is meghatározni: meghatározott időközönként egy ismert tömegű mintatartó edénybe a permeátumból mintát kellett venni, majd a mintavétel időtartamát megmérni. Ezután a permeátum mintával teli edény tömegének megmérése. A tartózkodási időt az alábbi képlet alapján lehet meghatározni:

$$\tau_x = \frac{\text{minta tömege} - \text{mintatartó tömege (kg)}}{\text{mért idő (h)}} \cdot \text{reaktor tömege (kg)} \quad (\text{h})$$

ahol,

τ_x - tartózkodási idő (h),

minta tömege = a mintatartó + időegység alatt levett minta tömege (kg),

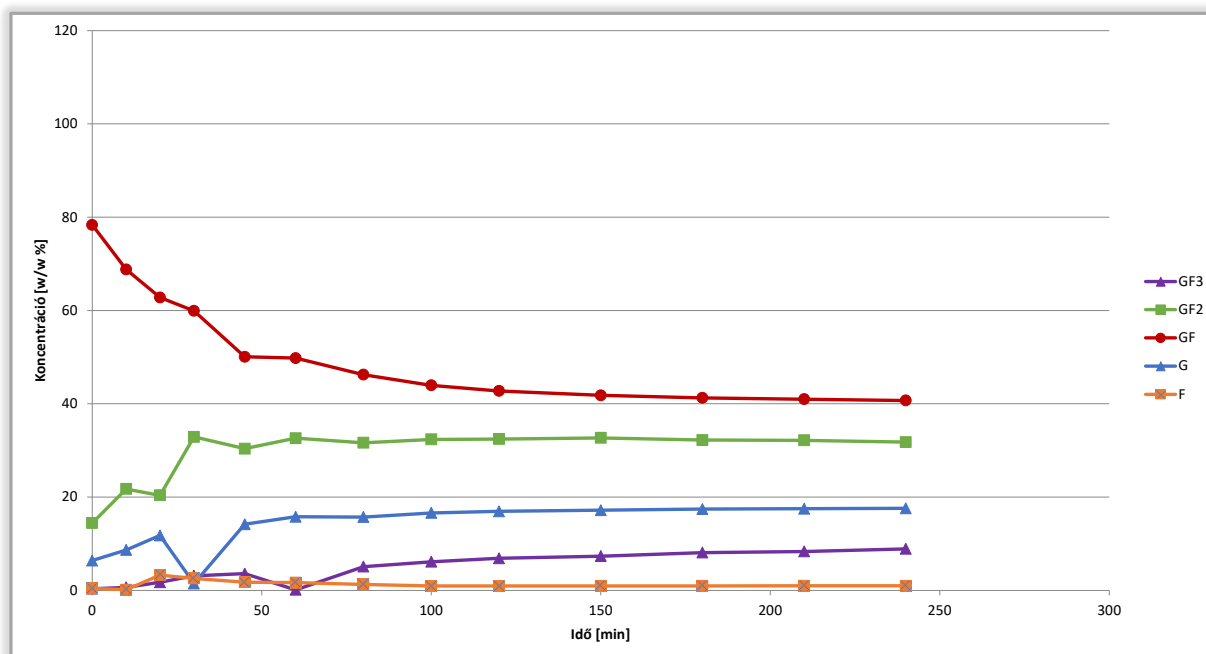
mintatartó tömege – üres mintatartó edény tömege (kg),

reaktor tömege – minden esetben 2 kg.

A kísérletek paramétereinek beállítását a **1. táblázat** értékei szerint készítettük el.

A hat kísérlet közül kiválasztottunk egyet, hogy bemutassuk a kísérleti lefutást.

A hatodik kísérlet esetén a 40 w/w%-os szacharóz oldat megfelelő hőmérsékletének és pH-jának elérése után hozzáadtuk a 40 g/kg Pectinex Ultra SP-L enzimet. Illetve a permeátum oldali szivattyú sebességét pedig 16 rpm-re állítottuk. A hatodik kísérlet mérési eredményeit a következő ábra mutatja be (**3. ábra**).



3. ábra. Szénhidrát-koncentráció a mintavételi idő függvényében. G - glükóz, GF - szacharóz, GF2 – 1-kesztóz, GF3 – nisztóz, F – fruktóz. (Fix paraméterek: 400 g/kg koncentrációjú szacharóz oldat, reaktorban lévő oldat tömege: 2 kg, hőmérséklet: 50°C, pH=5,5, transzmembrán nyomáskülönbség: 1 bar, változó paraméterek: enzimm koncentráció: 40 g/kg, permeátum oldali szivattyú sebessége: 16rpm, tartózkodási idő: 2,0 τ)

A hatodik kísérletben a szivattyú térfogatáramát az előző kísérletben beállított 12 rpm-ről 16 rpm-re növeltük, az enzimm koncentrációt pedig 50 g/kg-ról csökkentettük 40 g/kg-ra. A szacharóz-frukto-oligoszacharid konverzió mértéke egyre nagyobbak adódtak. A szacharóz koncentrációjának hozzávetőlegesen 55-60%-os csökkenése figyelhető meg. A permeátum oldali szivattyú megnövelt sebességének és a magas enzimm koncentráció alkalmazásával a szacharóz (GF) koncentrációja lecsökkent és a keletkezett termékek (GF2, GF3) koncentrációja megnövekedett az előző kísérletekhez képest. Melléktermékként glükóz (G) és kis mennyiségben fruktóz (F) keletkezett.

A szacharóz-frukto-oligoszacharid konverzió hatásfoka függ az enzimm koncentrációjától, illetve a tartózkodási időtől. Ha növeljük az enzimm koncentrációját, akkor lecsökken a konverzió időtartama és növekedik a hatásfoka. Ha a tartózkodási időt növeljük ugyanakkora enzimm koncentráció mellett, akkor szintén növekedik a szacharóz-frukto-oligoszacharid átalakulás hatásfoka. Továbbá magas enzimm koncentráció alkalmazásával magasabb polimerizációs fokú frukto-oligoszacharidok képződtek, így ha ezt a terméket szeretnénk nagyobb mennyiségben előállítani, akkor javasolt a magas enzimm koncentráció alkalmazása. A kísérlet során egy bizonyos idő után beáll az úgynevezett egyensúlyi (steady-state) állapot, amikor az egyes méréseknél a membránreaktor permeátum (kimenő) áramában a szénhidrát-frakciók koncentrációja időben állandósul.

5. A konverzió hatásfokának vizsgálata

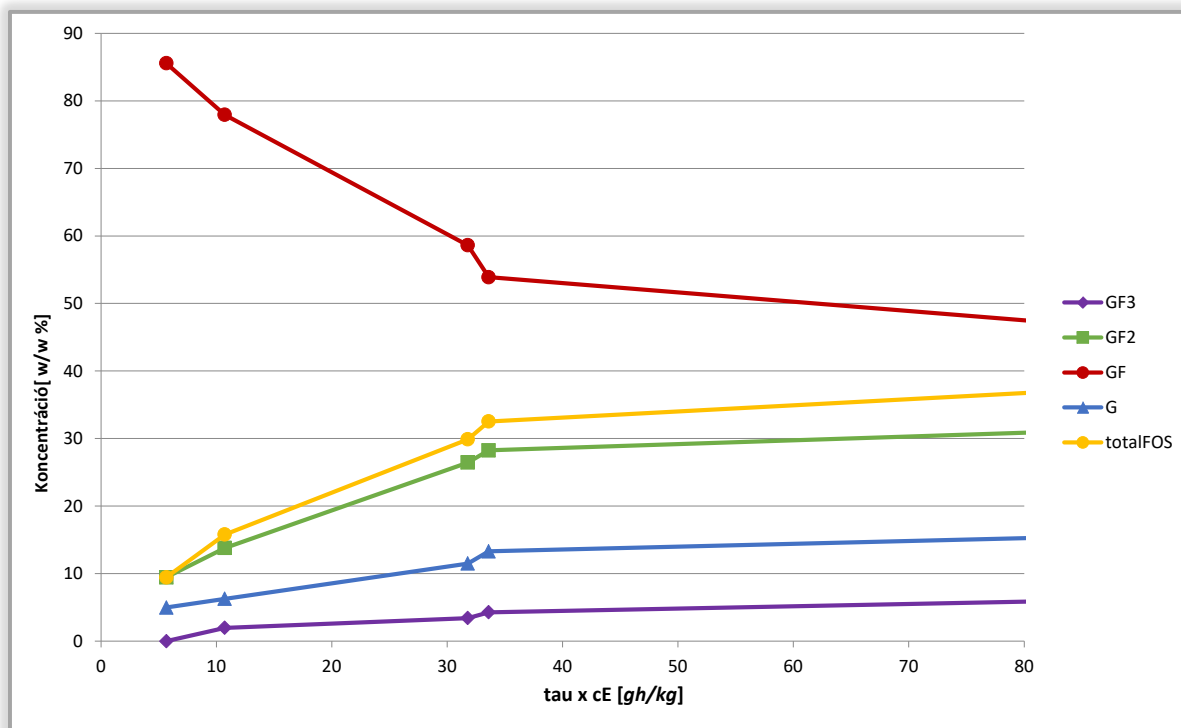
A kísérletsorozat során a legjobb konverziós hatásfokra kell törekedni, melyeket a mérési paraméterekkel lehet befolyásolni. Ezek a paraméterek a rendszerhez adott enzimm koncentráció és a permeátum oldali perisztaltikus szivattyú sebességével változtatható tartózkodási idő. Látható, hogy a perisztaltikus szivattyú sebességének növelésével a vizsgált szacharóz oldat túl gyorsan áramolt keresztül a rendszeren, így az enzimm nem volt elég ideje a szacharóz átalakítására. Az enzimm koncentráció növelésével pedig gyorsabb konverziót lehetett elérni, tehát a tartózkodási idő is lecsökkent. Ahhoz, hogy meghatározható legyen a leghatékonyabb beállítási paramétereket, a következőképpen számoltunk, minden minta tartózkodási idejéből (τ) számtani átlagot számoltunk, majd ezt az átlagot megszoroztuk az adott kísérlet során alkalmazott enzimm koncentrációjával (c_e) (átlag $\tau \times c_e$). Ezt az értéket pedig az egyes komponensek állandósult koncentrációinak átlag értékének függvényében ábrázoltuk, és a komponensek esetében az utolsó 3 érték számtani átlagát számítottuk. A mérési értékeket a **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat. Komponens koncentrációk (G - glükóz, GF - szacharóz, GF2 – 1-kestőz, GF3 – nisztóz, Total FOS – összes frukto-oligoszacharid). (Fix paraméterek: 400 g/kg koncentrációjú szacharóz oldat, reaktorban lévő oldat tömege: 2 kg, hőmérséklet: 50 °C, pH=5,5, transzmembrán nyomáskülönbség 1 bar)

	1. mérés	2. mérés	3. mérés	4. mérés	5. mérés	6. mérés
τ [h]	1,1	2,1	2,1	1,7	1,6	2,1
c_E [g/kg]	5	5	15	20	50	40
$\tau \times c_E$ [gh/kg]	5,7	10,7	31,8	33,6	82,0	81,9
GF3 (1)	0,0	0,5	3,6	4,4	5,7	8,1
GF3 (2)	0,0	0,6	3,5	4,2	5,9	8,3
GF3 (3)	0,0	4,9	3,3	4,3	6,1	8,9
GF3 (Átlag)	0,0	1,9	3,4	4,3	5,9	8,5
GF2 (1)	9,2	13,7	26,9	28,7	30,6	32,2
GF2 (2)	9,7	14,2	26,7	28,6	30,8	32,2
GF2 (3)	9,5	13,5	25,7	27,5	31,7	31,8
GF2 (Átlag)	9,5	13,8	26,5	28,3	30,9	32,1
GF (1)	85,6	79,4	57,9	52,9	48,3	41,3
GF (2)	84,9	78,6	58,1	54,1	47,4	40,9
GF (3)	86,2	75,9	59,8	54,7	45,9	40,7
GF (Átlag)	85,6	77,9	58,6	53,9	47,2	40,9
G (1)	5,2	6,4	11,6	13,7	15,0	17,4
G (2)	5,4	6,7	11,7	13,1	15,4	17,5
G (3)	4,3	5,8	11,2	13,2	15,7	17,6
G (Átlag)	4,9	6,3	11,5	13,3	15,4	17,5
Total (FOS)	9,5	15,8	29,9	32,5	36,9	40,5

A táblázat tartalmazza az átlagos Tau (τ) értékeket és az enzimkoncentrációkat (c_E), ezek szorzatát valamint a különböző komponensek koncentrációját három idővételi pontból és azok számtani átlagát. A táblázat alapján meghatározható, hogy abban a kísérletben, ahol a legnagyobb enzimkoncentrációt alkalmaztuk, ott volt a legnagyobb GF3 koncentráció is. Ahol a tartózkodási idő a legrövidebb volt, ott pedig alacsony koncentrációban képződött frukto-oligoszacharid. A következő ábra bemutatja a táblázatban összefoglalt adatokat **(4. ábra)**.

A diagram alapján meghatározható, hogy nagyobb $\tau \times c_E$ értékhez kisebb GF (szacharóz) és magasabb frukto-oligoszacharid (GF2, GF3) koncentráció tartozik, tehát nagyobb enzimkoncentrációval vagy a tartózkodási idő növelésével javítható a konverzió hatásfoka.



4. ábra. Komponensek koncentrációi a tartózkodási idő és az enzimkoncentráció függvényében (G – glükóz, GF – szacharóz, GF2 – 1-kesztóz, GF3 – nisztóz, F – fruktóz, Total FOS – összes frukto-oligoszacharid)

Az eredmények összefoglalása

A kutatásban a frukto-oligoszacharidok enzimes szintézisét vizsgáltuk szakaszos, illetve folyamatos üzemmódú reaktorokban. A szakaszos üzemű keverős-tartályreaktorban végzett szintézis során a szacharóz koncentráció több mint felére csökkent a kiindulási koncentrációhoz képest, míg a frukto-oligoszacharidok hozzávetőlegesen 45%-ban jelentek meg a termékben. A folyamatos üzemű keverős-tartályreaktorban végzett kísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy a rövid tartózkodási idő esetén az enzimnek nincs elég ideje az átalakításra, így a szacharóz oldat túl gyorsan áramlik át a rendszeren és alacsony frukto-oligoszacharid koncentrációt érhetünk el vele. A magasabb enzimkoncentráció alkalmazásával megjelentek a magasabb polimerizációs fokú (GF3) frukto-oligoszacharidok is. Ebből következtethető, ha a gyártási folyamat során GF3-at szeretnénk nagyobb mértékben szintetizálni, akkor javasolt a magasabb enzimkoncentráció alkalmazása. Az első mérés esetén volt a legkisebb a $\tau \times c_E$ érték: 5,7 gh/kg, ebben az esetben 85,6 w/w% a szacharóz és 9,5 w/w% a frukto-oligoszacharidok koncentrációja. A hatodik mérésnél 81,9 gh/kg $\tau \times c_E$ érték mellett 40,9 w/w % a szacharóz és 40,5 w/w% a frukto-oligoszacharid koncentrációja a vizsgált termékben. Megállapítható, hogy nagyobb $\tau \times c_E$ értékhez kisebb szacharóz (GF) és nagyobb frukto-oligoszacharid (GF2, GF3) koncentrációk tartoznak. Tehát az enzimkoncentráció vagy a tartózkodási idő növelésével javítható a frukto-oligoszacharid kihozatal.

A frukto-oligoszacharid szakaszos szintézise egyszerűbb eljárás, a szakaszos üzemű reaktorok alkalmazásakor hátrány a termékben lévő enzim inaktiválása (hőkezeléssel és/vagy pH eltolással), továbbá költséges downstream műveletekkel el kell távolítani a rendszerből, ami a gyártó számára további költségeket jelent, viszont nagyon jó konverziós hatásfok érhető el vele. A frukto-oligoszacharid bioszintézise folytonos üzemű membránreaktor módszerének előnye, hogy az enzim inaktiválására nincsen szükség, hiszen a membrán alkalmazásával visszatartható és vezethető a rendszerben, ezért az elvezetett termék enzimentes lesz, a biokatalizátorok tartósabb használatát biztosítja, illetve az enzimkoncentráció vagy a tartózkodási idő növelésével magas frukto-oligoszacharid kihozatal érhető el, ami azt eredményezni, hogy nagyüzemi léptékben is hatékonyan lehet előállítani.

A kutatás folytatásaként hasznos irány lehet az enzinstabilitás vizsgálata a folytonos üzemű membránreaktorokban. Másik kutatási irány lehet további enzimpreparátumok alkalmazása oligoszacharidok előállítására céljából, így lehetőség nyílna akár új oligoszacharidok bioszintézisére is.

14. Irodalom

- [1] Niva, M. (2007). 'All foods affect health': understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite*, 48(3), 384-393.
<https://doi.org/10.1016/j.appet.2006.10.006>
- [2] Illanes, A., & Guerrero, C. (2016). Functional foods and feeds: Probiotics, prebiotics, and synbiotics. In *Lactose-derived prebiotics: A process perspective* (35-86). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00002-0>
- [3] Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88(S2), S133-S138.
<https://doi.org/10.1079/BJN2002677>
- [4] Biró, Gy. (2015). Élelmiszerek élettani funkciói – funkcionális élelmiszerek (EOQ MNB Szakmai konferencia, 2015.11.25.)
<http://www.eoq.hu/szakb/3/szeged/hiro.pdf> (letöltés 2016.10.28.)
- [5] Salminen, S. (2001). Human studies on probiotics: aspects of scientific documentation. *Näringsforskning*, 45(1), 8-12.
<https://doi.org/10.3402/fnr.v45i0.1783>
- [6] Rastall, R. A. (2010). Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual review of food science and technology*, 1, 305-339.
<https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100746>
- [7] Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
<https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- [8] Grajek, W., Olejnik, A., & Sip, A. (2005). Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochimica Polonica*, 52(3), 665-671.
https://doi.org/10.18388/abp.2005_3428
- [9] Yun, J. W. (1996). Fructo-oligosaccharides – occurrence, preparation, and application. *Enzyme and microbial technology*, 19(2), 107-117.
[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00188-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00188-3)
- [10] Sánchez, O., Guio, F., Garcia, D., Silva, E., & Caicedo, L. (2008). Fructooligo saccharides production by *Aspergillus sp.* N74 in a mechanically agitate dairlift reactor. *Food and bioproducts processing*, 86(2), 109-115.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2008.02.003>
- [11] Erdős, B., Grachten, M., Czermak, P., & Kovács, Z. (2018). Artificial neural network-assisted spectrophotometric method for monitoring fructo-oligosaccharides production. *Food and bioprocess technology*, 11, 305-313.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-017-2011-3>
- [12] Antošová, M., Polakovič, M., & Bálaš, V. (1999). Separation of fructooligosaccharides on a cation-exchange HPLC column in silver form with refractometric detection. *Biotechnology techniques*, 13, 889-892. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008986426849>
- [13] Udomkun, P., Rungpichayapichet, P., Phuangcheen, N., & Innawong, B. (2021). Rapid determination of fructooligosaccharide in solar-dried banana syrup by using near-infrared spectroscopy. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 3397-3407.
<https://doi.org/10.1007/s11694-021-00911-z>

Andrea VÖRÖS¹, Zoltán KOVÁCS², László SIPOS²DOI: <https://doi.org/10.52091/EVIK-2023/2-1-HUN>

Arrived: November 2022 – Accepted: February 2023

Effect of Residence Time and Enzyme Load on the Synthesis of Fructo-oligosaccharides in an Enzymatic Membrane Reactor – Summary

Keywords: functional food, prebiotics, fructosyl transferase, fructo-oligosaccharides, membrane filtration, high performance liquid chromatography (HPLC), stirred tank reactor, enzymatic membrane reactor, sucrose

With the rise of health-conscious consumer attitudes, functional foods with beneficial effects are gaining popularity, which have been shown to have a positive impact on health and may reduce the risk of developing various diseases. In our research, we focused on oligosaccharides within the prebiotic food groups, in particular fructo-oligosaccharides (FOS). Enzymatic synthesis of FOS from sucrose can be carried out in batch or continuous reactors. In order to meet market needs, large-scale industrial production requires targeted research on the optimisation of various operational parameters that maximize conversion rates. In this study, we investigated the conversion of sucrose into fructo-oligosaccharides in batch and continuous reactors with respect to operational parameters that have a major influence on the yield of fructo-oligosaccharides. The sucrose to fructo-oligosaccharide conversion in a continuous enzyme membrane reactor was investigated by varying the enzyme load (5–40 g/kg) and the residence time (1.1 h–2.0 h). The carbohydrate composition of the resulting products was investigated by high performance liquid chromatography. During the synthesis in a batch stirred tank reactor, the sucrose concentration was more than halved compared to the initial concentration, while fructo-oligosaccharides were present in the product at approximately 45%. Our results indicate that although the enzyme membrane reactor underperforms stirred-tank reactors in term of product yield (45% vs 9.5–40.5%), it allows the production of enzyme-free FOS in a continuous fashion. With the use of higher enzyme concentrations and/or longer residence times, fructo-oligosaccharides with a higher degree of polymerisation (GF3) have also appeared in the product flow. The results were used to determine the optimal settings of operational parameters, such as residence time and enzyme load, to achieve the highest possible conversion.

¹ Soós Tészta Kft.

² Hungarian University of Agriculture and Life Sciences Institute of Food Science and Technology

Andrea VÖRÖS
Zoltán KOVÁCS
László SIPOS

vooros.andrea@gmail.com
kovacs.zoltan.andras@uni-mate.hu
sipos.laszlo@uni-mate.hu

<https://orcid.org/0000-0001-5499-8046>
<https://orcid.org/0000-0002-1397-3296>
<https://orcid.org/0000-0002-4584-6697>