

PANNON EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI TUDOMÁNYOK ÉS ANYAGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

**PREBIOTIKUS HATÁSÚ FRUKTOOLIGOSZACHARIDOK
ENZIMKATALITIKUS SZINTÉZISE INTEGRÁLT RENDSZERBEN**

Készítette:

CSANÁDI ZSÓFIA

okl. környezetmérnök

Témavezető:

DR. SISAK CSABA

egyetemi docens



PANNON EGYETEM
MŰSZAKI KÉMIAI KUTATÓ INTÉZET

2008

Bevezetés

Az utóbbi időben megnövekedett érdeklődés tapasztalható az egészséges táplálkozás és étrend, valamint a természetes anyagokból származó táplálék-kiegészítők iránt. A fruktooligoszacharidok számos olyan előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek lehetővé teszik széles körű élelmiszeripari és takarmányozási célú alkalmazásukat. Az emésztőszervrendszer enzimeit nem képesek lebontani, így a szervezet energiaforrásként nem képes felhasználni őket, kalóriatartalmuk kb. 8 kJ g^{-1} (2 Kcal g^{-1}). Ebből adódóan diabetikus és alacsony kalóriatartalmú termékek gyártására is felhasználhatók, bár édesítőhatásuk csupán a szacharóz kb. egyharmadának felel meg. Nem hidrolizálódnak a szájüregben sem, ezért nincs fogszuvasodást előidéző hatásuk. Ezeken kívül rendelkeznek egy lényeges tulajdonsággal, amely alapvető fontosságú az ún. funkcionális élelmiszerekben való alkalmazásuk szempontjából. Kedvező hatással vannak a bélflóra baktériumainak (*Bifidobacteria*, *Lactobacillus sp.*) szaporodására és működésére, amelyek a szervezet egészségének fenntartásában fontos szerepet játszanak: több vitamin termelődésében (K, B) is részt vesznek, valamint olyan rövidláncú zsírsavakat hoznak létre (pl.: tejsav, ecetsav, propionsav, vajsav), amelyek a bélsejtek számára szolgálnak táplálékkul. Ezen kívül segítenek megakadályozni az emésztőrendszerbe bekerült patogén kórokozók elszaporodását is.

A fruktooligoszacharidok szerkezetüket tekintve egy glükóz egységből és az ahhoz kapcsolódó két, illetve több fruktóz egységből felépülő nyílt láncú molekulák. A homológ sor első három és leggyakrabban előforduló képviselője a kesztóz (GF₂), a nisztóz (GF₃) és a fruktozil-nisztóz (GF₄).

A természetben számos növényben (pl.: hagyma, cikória, cukorrépa, gabona, rizs) megtalálhatók, azonban viszonylag kis koncentrációban. Mesterséges úton történő előállításuk egyik lehetséges fajtája az enzimkatalitikus szintézis. Ennek során szacharóz (GF) kiindulási anyagból az ún. fruktozil-transzferáz (Ft-áz) enzim segítségével alakítható ki a rövid láncú fruktooligoszacharidok elegye több lépésben. Az elegy a GF₂, GF₃, GF₄ és az át nem alakult szacharóz mellett melléktermékként keletkező glükózt is tartalmaz. Mivel glükóz a szintézisreakció kompetitív inhibitora, így annak eltávolítása nélkül maximálisan kb. 60 %-os fruktooligoszacharid-hozam érhető el. Ezért a glükóz folyamatos eltávolítása a rendszerből jelentősen megnövelheti az előállított termékkoncentrációt. A glükózelimináció egyik lehetséges és viszonylag olcsó fajtája egy másik enzimes rendszer alkalmazása, melynek során immobilizált glükóz-oxidázt (GOD) használhatunk a glükóz eltávolítására.

Az enzimkatalitikus szintézis megvalósításának két alapvető módja lehetséges. Az egyik során szakaszos üzemmódban szabad állapotú enzimmel, illetve az enzimet tartalmazó sejttel történik a szintézis. A másik esetben valamilyen szilárd fázisú hordozóhoz rögzítetten alkalmazzuk a biokatalizátort, melynek révén félfolyamatos, illetve folyamatos üzemmód is megvalósíthatóvá válik. A rögzítésre leggyakrabban Ca-alginát gélbezárást, illetve adszorpciós technikát alkalmaznak.

Munkám kezdetekor célkitűzéseim a következők voltak:

1. Kereskedelemből beszerzett fruktozil-transzferáz enzim rögzítésére alkalmas módszer(ek) és hordozó(k) kiválasztása.
2. A rögzítés optimális körülményeinek (hőmérséklet, pH, optimális szubsztrátkoncentráció) meghatározása és a rögzítés eredményességének vizsgálata lombikos kísérletekkel.
3. A szilárd fázisú készítmény katalitikus viselkedésének jellemzése, fruktooligoszacharidok előállításának vizsgálata során.
4. Kísérletek a melléktermékként keletkező glükóznak a fruktooligoszacharid-szintézissel szimultán, biokatalitikus úton történő eltávolítására.
5. A glükóz eliminációhoz alkalmazható biokatalizátor előállítása és vizsgálata.
6. Az együttes termék-előállítás és szimultán melléktermék szeparáció megvalósítására alkalmas laboratóriumi méretű reaktor összeállítása és működésének vizsgálata.

TÉZISEK

- I. A fruktooligoszacharidok szintézisére alkalmazandó, fruktozil-transzferáz aktivitással rendelkező kereskedelmi Pectinex Ultra SP-L enzimkészítményt rögzítettem abból a célból, hogy megnöveljem a biokatalizátor stabilitását. Az *Amberlite IRA 900 Cl* típusú anioncserélő gyantát alkalmasnak találtam hordozónak. A szilárd fázisú biokatalizátor előállítására egy újszerű, kétlépéses rögzítési technikát dolgoztam ki. Első lépésben az enzimoldatot az aktivált gyantán adszorbeáltattam, így ionos jellegű kötések alakultak ki a gyanta és a fehérjemolekulák között. Második lépésben a gyantán megkötődött enzim-molekulák között – stabilizálás céljából – keresztkötéseket alakítottam ki glutáraldehid segítségével. A kötőreagens nemcsak a fruktozil-transzferáz molekulákat vitte keresztkötésbe, hanem a Pectinex Ultra SP-L készítmény fő tömegét kitevő egyéb fehérjéket is. Így egy stabilizáló „fehérjeháló” alakult ki a biokatalizátorszemcsék külső és belső felületén. Az általam kidolgozott újszerű enzimirögzítési módszer tehát úgy

tekinthető, mint ionos és kovalens kötések konszekutív létrehozásán, továbbá segédfehérjék stabilizáló hatásán alapuló módszer. Fruktózil-transzferáz immobilizálására a módszert más szerzők biztosan nem alkalmazták, de alapos szakirodalmi vizsgálódásaim szerint más enzimre sem található ilyen módszer. (2. publikáció)

- II. Meghatároztam a fenti rögzítési módszer optimális körülményeit. Ennek során 16,7 g g⁻¹ biokatalizátor/hordozó arányt, 0,25 % kovalens rögzítőagens koncentrációt és 15 min keresztkötési időt állapítottam meg, mint optimumokat. A kialakított immobilizált enzimmészítmény működési paramétereinek vizsgálata során pH=5,6 és 53°C értékeket kaptam optimumként. Az ezen körülmények között létrehozott és alkalmazott biokatalizátor felezési ideje ~ 40 nap, tehát működési stabilitása gyakorlati szempontból megfelelő. A megállapított optimális működési paraméterek mellett az új típusú szilárd fázisú biokatalizátor alkalmazásával, rázatott lombikos kísérletekben vizsgáltam a fruktooligoszacharidok előállításának lehetőségét. A kísérletek során az optimális körülmények között 64,4 %-os termék-hozamot sikerült elérnem, amely megfelel a szakirodalomban talált adatoknak. (2. publikáció)
- III. A fruktooligoszacharid szintézis reakció melléktermékeként keletkező glükóz eliminálására glükóz-oxidáz – kataláz koimmobilizált enzimmészítményt állítottam elő. Az alkalmazott hordozó és a kombinált rögzítési módszer analóg a fentiekben bemutatott módszerrel, de mivel azt a jelen esetben glükóz-oxidáz – kataláz rendszer szimultán koimmobilizálására alkalmaztam – a vonatkozó szakirodalom adatainak vizsgálata alapján – újnak minősül. Megállapítottam, hogy a koimmobilizált enzimek aktivitásai jó közelítéssel azonosak azokkal az aktivitásértékekkel, amelyeket akkor kaptam, amikor a két enzimet külön-külön rögzítettem. Meghatároztam a preparátum optimális rögzítési paramétereit (0,5 % glutáraldehyd koncentráció és 60 min rögzítési idő), valamint a készítmény alkalmazási optimumait (pH=5,1 és 30°C hőmérséklet). (1. és 3. publikáció)
- IV. A kialakított rögzített biokatalizátorok felhasználásával egy, az együttes termék-előállításra és melléktermék-eltávolításra alkalmas, eredeti konfigurációjú, laboratóriumi méretű, két, oszlopból álló, integrált reaktorrendszert állítottam össze és vizsgáltam a kesztóz, nisztóz és fruktozil-nisztóz fruktooligoszacharidok előállításának lehetőségét. A két oszlopreaktor közül a szintézisreaktor állóágyas, a glükóz-oxidációs reaktor kevert ágyas üzemben működött. A működési ciklusuk úgy volt beállítva, hogy

a ciklus alatt azonos mennyiségű glükóz keletkezett a szintézis reaktorban, mint amennyi eliminálódott a glükóz-oxidációs reaktorban. Ezután a kapcsolt cső- és szeleprendszer és szivattyúk felhasználásával megcseréltem a két reaktor működési módját, majd egy újabb ciklust indítottam el. A ciklikus működésű kétreaktoros reaktorblokk az időben integrált folyamatok megvalósítására alkalmas reaktorok új típusa.

A reaktorblokkban több ciklusból álló kísérletsorozatban 74,44 %-os termékhozamot sikerült elérnem, amely lényegesen nagyobb, mint a melléktermék eltávolítása nélkül kapott érték. (1. és 5. publikáció)

Publikációk

1. Sisak, C., Csanádi, Z., Rónay, E., Szajáni, B.: Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (5), 1002-1007 (2006)
 2. Csanádi, Z., Sisak, C.: Immobilization of Pectinex Ultra SP-L pectinase and its application to production of fructooligosaccharides. *Acta Alimentaria* 35 (2), 205-212 (2006)
 3. Sisak, Cs., Csanádi, Zs., Szajáni, B.: Szilárd fázisú biokatalizátorok kialakítása és jellemzése glükóz oxidáció élelmiszeripari célú alkalmazásának előkészítése céljából. *Magyar Kémiai Folyóirat* 113/3, 97-101 (2007)
 4. Koroknai, B., Csanádi, Z., Gubicza, L., Bélafi-Bakó, K.: Preservation of antioxidant capacity and flux enhancement in concentration of red fruit juices by membrane processes. *Desalination* 228, 295-301 (2008)
-
5. Csanádi, Z., Sisak, C.: Production of short chain fructooligosaccharides. *Hungarian Industrial Journal of Chemistry* (közlésre benyújtva)
 6. Sisak, C., Csanádi, Z.: Elimination of VOC's from gases by biofiltration. (összeállítás alatt)

Konferenciakiadványban megjelent közlemények

- Csanádi, Zs., Sisak, Cs.: Immobilizált aerob mikrobák alkalmazása szerves szennyezők biodegradációjában. *Műszaki Kémiai Napok 2002 Konferenciakiadvány.* pp. 161-165 (2002)

- Sisak, Cs., Csanádi, Zs., Nagy, E., Szajáni, B.: Immobilizált enzimes rendszerek alkalmazása oligoszacharidok előállítására. Műszaki Kémiai Napok 2003 Konferenciakiadvány. pp. 328-333 (2003)
- Csanádi, Zs., Sisak, Cs.: Oldószer tartalom eliminálásának vizsgálata biofilterben. Műszaki Kémiai Napok 2003 Konferenciakiadvány. pp. 322-327 (2003)
- Csanádi, Zs., Sisak, Cs.: Fruktózil-transzferáz rögzítése és alkalmazása prebiotikus oligoszacharidok szintézisére. Műszaki Kémiai Napok 2004 Konferenciakiadvány. pp. 143-146 (2004)
- Csanádi, Zs., Szvetnik, A., Kálmán, M., Sisak, Cs.: Production of fructooligosaccharides catalyzed by immobilized fructosyl transferase. 2nd Central European Congress on Food 2004, Budapest, Hungary, CD-ROM Congress Proceedings P-N-03 (2004)
- Csanádi, Zs.: Prebiotikumként alkalmazható fruktooligoszacharidok enzimkatalitikus előállítása integrált rendszerben. Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány PhD hallgatók Szimpóziuma, Miskolctapolca, Konferenciakiadvány (2004)
- Csanádi, Zs., Sisak, Cs.: Fruktooligoszacharidok szintézise immobilizált készítmények alkalmazásával. Műszaki Kémiai Napok 2005 Konferenciakiadvány. pp. 153-156 (2005)
- Csanádi, Zs.: Production of prebiotic fructooligosaccharides catalyzed by immobilized fructosyl transferase. 5th International Conference of PhD Students, University of Miskolc, Hungary, Book of Proceedings 37-42 (2005)
- Csanádi, Zs., Szajáni, B., Sisak, Cs.: Glükóz oxidáz-kataláz rendszerek koimmobilizálása és működésének vizsgálata. Műszaki Kémiai Napok 2006 Konferenciakiadvány. pp. 105-107 (2006)
- Csanádi, Zs., Sisak, Cs.: A rögzítési módszer szerepe a fruktozil-transzferázok működésében, Műszaki Kémiai Napok 2007 Konferenciakiadvány. pp. 115-117 (2007)
- Csanádi, Zs.: Immobilization of Pectinex Ultra SP-L and its application to production of prebiotic fructooligosaccharides, 6th International Conference of PhD Students, University of Miskolc, Hungary, Book of Proceedings 47-50 (2007)
- Csanádi, Zs., Sisak, Cs.: Fruktooligoszacharidok enzimatisz előállítása integrált rendszerben. Műszaki Kémiai Napok 2008 Konferenciakiadvány. pp. 123-127 (2008)

Hivatkozások

Sisak, C., **Csanádi, Z.**, Rónay, E., Szajáni, B.: Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (5), 1002-1007 (2006)

- Ozyilmaz, G., Tukul, S.S.: Simultaneous and sequential co-immobilization of glucose oxidase and catalase onto florasil. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17 (6), 960-967 (2007)
- Mislovicova, D., Michalkova, E., Vikartovska, A.: Immobilized glucose oxidase on different supports for biotransformation removal of glucose from oligosaccharide mixtures. *Process Biochemistry* 42 (4), 704-709 (2007)
- Van der Plancken, I., Van Loey, A., Hendrickx, M.: Effect of moisture content during dry-heating on selected physicochemical and functional properties of dried egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (1), 127-135 (2007)
- Wong, C.M., Wong, K.H., Chen, X.D.: Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 78, 927-938 (2008)