

Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

Galakto-oligoszacharidok enzimes szintézisének nyomon követése UV spektrofotometriás módszerrel

TDK Dolgozat

Készítette: Koncz Sára Bernadett
Bsc. III. évfolyam

Témavezető: Dr. Kovács Zoltán
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

Társtémavezető: Dr. Firtha Ferenc
Fizika-Automatika Tanszék

Budapest, 2014

Tartalom

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. A tejsavó, mint melléktermék	6
2.2. Galakto-oligoszacharidok.....	7
2.2.1. Galakto-oligoszacharidok jelentősége	7
2.2.2. Galakto-oligoszacharidok kémiai felépítése, szintézise	7
2.3. Különböző alkalmazott konfigurációk a GOS előállítására	9
2.3.1. GOS előállítás szakaszos üzemmódban.....	9
2.3.2. GOS előállítás folyamatos működésű enzimes membrán reaktorban (EMR)	9
2.3.3. GOS előállítás rögzített enzimes eljárással.....	10
2.4. Az enzimes galakto-oligoszacharid szintézis nyomon követhetősége	10
2.4.1. HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) technológia.....	10
2.4.2. Egyéb módszerek eddigi alkalmazása a GOS szintézis nyomon követésére	11
2.4.3. Az UV-spektroszkópia elve	12
2.4.3.1. Parciális Legkisebb Négyzetek Regressziója (PLS)	13
3. Célkitűzések	16
4. Anyag és módszer	17
4.1. Felhasznált anyagok	17
4.1.1. Enzim.....	17
4.1.2. Laktóz	17
4.1.3. Vivinal GOS Syrup és Powder	17
4.2. Berendezés konfiguráció	18
4.2.1. GOS előállítás folyamatos működésű enzimes membrán reaktorban	18
4.3. Analitikai módszerek.....	20
4.3.1. Nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfia (HPLC).....	20
4.3.2. UV-VIS Spektrofotométer.....	21
4.4. PLSR implementációja MATLAB®-ban.....	22
5. Eredmények	23
5.1. Megvalósíthatósági példa	23
5.2. Galakto-oligoszacharidok enzimes szintézisének vizsgálata	24
5.2.1. Minta előkészítés	24
5.2.2. Mintaanalízis.....	26

5.2.3. Adatfeldolgozás PLS modell segítségével.....	30
6. Összefoglalás	34
7. További célkitűzések.....	36
8. Irodalomjegyzék.....	37

1. Bevezetés

Az egészségtudatos szemlélet előtérbe kerülésével egyre nagyobb hangsúly fordítódik a funkcionális élelmiszerekre, azaz azon hozzáadott értéket tartalmazó termékekre, melyek egészségmegőrző hatásuk miatt egyre népszerűbbek a fogyasztók között. Prebiotikus hatásuknak köszönhetően a galakto-oligoszacharidok is ebbe a csoportba tartoznak. (Van Loo, et al., 1999)

Az egészségre gyakorolt hatásukat tekintve a galakto-oligoszacharidok (továbbiakban GOS) pozitív hatással vannak a bélflórára. Mivel a nem-emészthető cukrok közé tartoznak, így kalória értékük nulla és a glikémiás-indexet sem befolyásolják. Laktóz érzékenyek és cukorbeteg is fogyaszthatják. A GOS-ok prebiotikus hatásának igazolására számos kísérletet végeztek. Ez egy egészséges felnőttek részvételével folytatott kísérlet alapján már 5 grammos napi bevitelnél kimutatható. (L.M.G. Davis, et al., 2010)

A galakto-oligoszacharidokat főleg tejsavóból kinyert laktózból állítják elő β -galaktozidáz enzim segítségével. A tejsavó tejipari melléktermék, mely nagy mennyiségben keletkezik a sajt-, túró- és kazein-gyártás során. Nagy környezeti terhelést jelent, így ipari feldolgozása fokozottan indokolt. A tejsavó 5-6%-ban tartalmaz laktózt, melyet membránműveletek segítségével választanak el a savótól. (M.H.L. Levia, et al., 1995)

Összefoglalva a GOS számos az élelmiszeripar számára előnyös tulajdonsággal rendelkezik. Oldhatósága nagyobb, mint a laktózé, emellett édesítő hatása is jóval nagyobb. Az anyatejben található oligoszacharidokhoz hasonlóan jótékony hatással van a bélrendszerben található bifidobaktériumokra és laktobacillusokra (E.Elizabeth Tymczyszyn, et al.,2011).

A galakto-oligoszacharid tartalmú élelmiszerek már mindennaposak a boltok polcain. Joghurtok, reggeliző pelyhek, fagylaltok, tej alapú italok és nem utolsósorban csecsemőtápszerek tartalmazzák. A GOS-t gyártó és forgalmazó élelmiszeripari vállalatok listája globálisan egyre nagyobb. Japánban hatezer tonna galakto-oligoszacharidot állítottak elő 2005-ben. (Taniguchi, et al.,2005) Jelentős termelők Kína, Ausztrália, az Amerikai Egyesült Államok és Hollandia is.

Bár napjainkban a galakto-oligoszacharidok a legnagyobb mennyiségben előállított prebiotikus oligoszacharidok, a gyártási folyamat optimalizálását kutató kísérletek a mai napig zajlanak. Cél, hogy a konverzió mértéke minél nagyobb legyen, magas legyen a GOS kihozatal. A szintézis reaktorokban zajlik, melyekben megfelelő körülmények között megtörténik az enzimes átalakítás. Jelenleg a tartályban zajló reakció közvetlenül nem követhető nyomon, így a gyártónak nincs információja az enzim működéséről, illetve a GOS szintézis mértékéről az előállítás ideje alatt. A produktum ellenőrzésére csak utólag van lehetőség, és az erre szolgáló analitikai módszer viszonylag költséges és időigényes. Amennyiben hiba merül fel a gyártás során, arról a gyártó csak

utólag szerezhet tudomást, és ez esetben az alapanyag és a reakcióra fordított idő és energia is kárba vész, mely minden esetben anyagi veszteséget jelent.

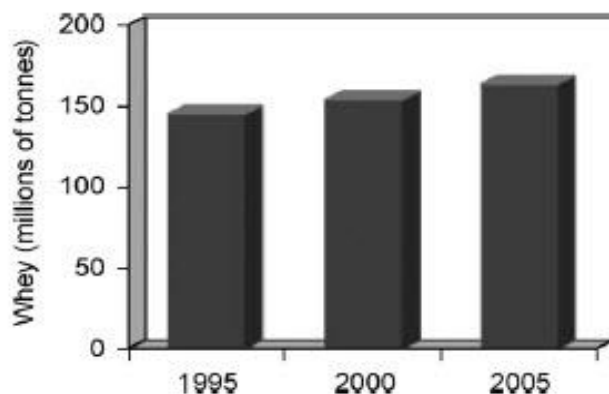
Egy online, megfelelő analitikai módszer alkalmazásával azonban lehetőség nyílna a rendellenességek azonnali észlelésére és a szükséges korrekciók elvégzésére.

Ez a dolgozat részét képezi a Budapesti Corvinus Egyetemen zajló kutatásnak, amelynek célja tejsavóból magas galakto-oligoszacharid tartalmú szirup előállítása és az előállítási folyamat optimalítása.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A tejsavó, mint melléktermék

Évente 150-160 millió tonnára tehető a Föld országainak éves savótermelése, melynek közel fele az Európai Unió területén belül keletkezik. Ahogy az 1. ábra is mutatja, az évi volumen-növekedés 1-2%-ra tehető.



*1. ábra: A Föld országainak éves tejsavó termelése (1995-2005)
(G.W. Smitthers 2008, az FAO 2006-os adatai alapján)*

A sajt-, túró- és kazeingyártás során a tej szárazanyag tartalmának fele a savóban fog megjelenni. A tejsavó fő oldott komponense a laktóz, és emellett tartalmaz savófehérjéket, tejsírt, nemfehérje nitrogén-vegyületeket és vitaminokat. 1 kg sajt előállításához a tej minőségétől függően körülbelül 10 kg tej szükséges, maradékként képződik a savanykás ízű, átlátszó, zöldes-sárgás árnyalatú tejsavó. Enzimátikus alvasztással úgynevezett édes savó keletkezik, melynek laktóz tartalma kicsit magasabb, mint a tejsavas erjesztésnél keletkező savanyú savóé (González-Martinez, 2002).

Ez az ipari mennyiségben keletkező tejipari melléktermék jelentős környezetvédelmi problémákat vet fel. Magas biológiai- (BOI) és kémiai-oxigénigénye (KOI) miatt szennyvízként a csatornahálózatba jutva rendkívüli mértékben károsítaná a környezetet (Bhattacharjee, et al., 2006). A tejsavó hasznosítási lehetőségeinek palettája rendkívül széles. Használják takarmányozásra, készíthető belőle savósajt. Vákuumbepárlással tejsavó koncentrátum nyerhető, mely koncentrátumból porlasztva szárítással savóport gyártanak. Membránműveletek segítségével (ultraszűrés, nanoszűrés) az egyes komponensek szétválaszthatók, és lehetőség nyílik magas hozzáadott értékkel rendelkező termékek előállítására (Román, 2010). A galakto-oligoszacharid gyártás elsőszámú alapanyaga a laktóz, mely szintén membránműveletek segítségével nyerhető ki a tejsavóból.

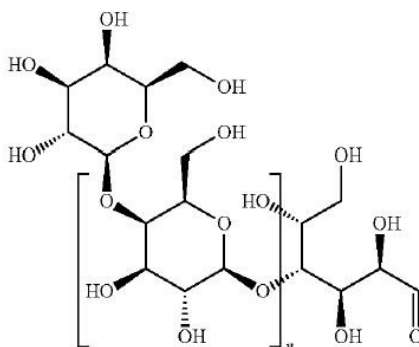
2.2. Galakto-oligoszacharidok

2.2.1. Galakto-oligoszacharidok jelentősége

A prebiotikumok olyan nem emészthető élelmiszer összetevők, melyek pozitív hatással vannak a vastagbél mikroflórájára. A galakto-oligoszacharidok emésztetlenül a vastagbélbe kerülve a jótékony hatású bélbaktériumok által kerülnek lebontásra, ezzel szelektíven fokozva azok számát, segítve az ásványi anyagok felszívódását és a zsírbontást (Macfarlane, et al., 2008).

A laktózzal ellentétben a GOS nagyon jól oldódik vízben. Nagy stabilitással rendelkezik, viszkozitása a szacharózhoz hasonló. Ellenáll a magas hőmérsékletnek és savas közegnek is, így jól alkalmazható gyümölcslevekben, joghurtokban és hőkezelt élelmiszerekben egyaránt. Felhasználása technológiai szempontból is előnyös. Az éves GOS termelés 20 000 tonnára becsült, és a termelt mennyiség évi 3-5%-os növekedést mutat (Affertshort-Allen, 2007).

2.2.2. Galakto-oligoszacharidok kémiai felépítése, szintézise



2. ábra: β -(1,4)-kötéssel kapcsolódó galakto-oligoszacharid molekula felépítése (H. Jeong, et al., 2011)

A prebiotikus oligoszacharidok általában 2-10 összekapcsolódó cukor monomerből felépülő vegyületek (Gibson & Roberfroid, 1995). A GOS szubsztrátja a laktóz, mely egy β -D-glükóz és egy β -D-galaktóz β -(1,4)-es glikozidos kötésével létrejövő diszacharid. β -galaktozidáz enzimmel való kezelés során párhuzamosan két reakció zajlik, mivel az enzim képes a β -kötéssel rendelkező cukrok szintézisében és hidrolízisében egyaránt részt venni. Így az enzimés átalakítás végére keletkeznek hidrolízissel glükóz és galaktóz monomerek, a transzgalaktozilálás eredményeként pedig különböző polimerizáltsági fokú (Degree of Polymerization) galakto-oligoszacharidok (DP3, DP4, DP5, DP6), és maradék laktóz (Gosling, et al., 2009). Ipari szempontból kívánatos a

hidrolízissal keletkező termékek mennyiségének visszaszorítása. Attól függően, hogy milyen mikroorganizmustól származik a reakcióban használt enzim, a GOS-t felépítő monomerek száma eltérő lehet. Továbbá az enzim eredete a β -(1,4)-kötés mellett előforduló β -(1,3)-, és β -(1,6)-kötések arányát is befolyásolja. A GOS szintézis történhet a tiszta enzimek felhasználásával, mikor pedig az enzimet termelő mikroorganizmusokat is tartalmazza a reaktor, fermentációról beszélünk. A különböző reakció feltételek GOS kihozatalra vonatkozó befolyását a 3. ábra szemlélteti.

Enzyme source ^a	Reaction conditions				Lactose conversion (%)	Maximum GOS yield ^b	Reference
	Initial lactose concentration	Temperature (°C)	pH	Buffer composition			
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	600 g/l	80	6.0	50 mM potassium phosphate	70	52.5% (w/w)	Park et al., (2008)
<i>Aspergillus oryzae</i>	500 g/l	40	4.5	20 mM citrate phosphate	56	52% (w/w)	Neri et al. (2009)
<i>Bullera singularis</i>	180 g/l	50	6.0	50 mM sodium phosphate	72	50% (w/w)	Cho, Shin, and Bucke (2003)
<i>Aspergillus oryzae</i>	1.67 M	40	4.5	pH adjusted with 1 M HCl	55	31% (mol/mol)	Iwasaki et al. (1996)
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	600 g/l	70	7.0	pH maintained by addition of 1 M NaOH, 10 μ M MnCl ₂	75	41% (w/w)	Nakao et al. (1994)
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	200 g/l	60	5.0	100 mM sodium acetate	63	39% (w/w)	Onishi and Tanaka (1995)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	205 g/l	37	6.5	50 mM phosphate containing 1 mM MgCl ₂	80	38% (w/w)	Splechtna et al. (2006)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	270 g/l	70	5.5	20 mM sodium citrate	80	33% (w/w)	Petzelbauer, Reiter, Splechtna, Kosma, and Nidetzky (2000)
<i>Bifidobacterium longum</i>	400 g/l	45	6.8	30 mM phosphate	60	32.5% (w/w)	Hsu et al. (2007)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	270 g/l	70	5.5	20 mM sodium citrate	72	26% (w/w)	Petzelbauer et al. (2000)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	400 g/l	40	7.0	200 mM potassium phosphate containing 2 mM MgCl ₂	92	24.8% (w/w)	Chockchaisawasdee et al. (2005)
<i>Thermotoga maritima</i>	500 g/l	80	6.0	50 mM potassium phosphate	50	19% (w/w)	Ji et al. (2005)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	745 mmol/kg	80	5.0	0.2 mol/kg citrate	73	18.1% (w/w)	Bruins et al. (2003a)

^a All enzymes are β -galactosidases, except the *Sulfolobus solfataricus* and *Pyrococcus furiosus* derived β -glycosidases.

^b GOS concentration as a percentage of initial lactose concentration.

3. ábra: Maximálisan elért GOS kihozatal különböző reakció feltételek mellett (A. Gosling et al., 2010).

Az enzim megfelelő működésének érdekében, és hogy elsősorban ne monomerek keletkezzenek, magas kiindulási laktóz koncentrációval érdemes dolgozni. A kiindulási laktóz koncentrációt tekintik az egyik kulcsfontosságú faktornak a reakcióban (Mahoney, 1998). A konfigurációtól, pH-tól és hőmérséklettől függően eltérő GOS kihozatal érhető el. A kihozatal mértéke általában 30-40 tömeg-százalékra (w/w%) tehető, 40-50 °C-on 4.5-6-os pH mellett. A kihozatal ritkán haladja meg az 50 w/w%-ot. 52,5 w/w%-os kihozatal 600 g/l-es kiindulási laktóz koncentrációval értek el, az alkalmazott hőmérséklet 80 °C volt, 6-os pH mellett (Park, et al., 2008). Mivel a laktóz korlátozottan oldódik vízben, magas hőmérsékleten érdemes dolgozni, különben kikristályosodik (Burrington, 2004).

2.3. Különböző alkalmazott konfigurációk a GOS előállítására

GOS előállítására a legegyszerűbb konfiguráció a szakaszos üzemmód ('batch' technológia), ahol az enzimek, vagy fermentáció esetén a mikroorganizmusok oldott állapotban vannak a reaktorban. A termelés folyamatossá tehető az enzimes membrán reaktor (EMR), vagy a rögzített enzimes eljárás felhasználással. Utóbbi kettőből azonban még nincs ipari méretű alkalmazás GOS előállításra. Ennek oka, hogy implementációjuk jóval összetettebb technikai megoldásokat kíván. Bár alkalmazásuk optimális esetben költséghatékonyabb lenne, mint a szakaszos üzemmód, a gyártás során számos probléma merülhet fel, melyek azonnali észlelésére jelenleg nincs lehetőség.

2.3.1. GOS előállítás szakaszos üzemmódban

A szakaszos (batch) üzemmódnál adott koncentrációjú laktóz oldat kerül a kevertetett tartály reaktorba, melyet állandó hőmérsékleten tartanak, hozzáadják az enzimet (vagy az enzimtermelő mikrobákat) és kevertetik az oldatot. Az alkalmazott beállításoktól függően a kívánt GOS konverzió elérése után az enzim inaktiválásával állítható le a reakció (Ken-ichi, et al., 1994). A kezdeti magas laktóz koncentráció a reakció ideje alatt folyamatosan csökken, a keletkezett galakto-oligoszacharidok mennyisége folyamatosan nő, amíg a körülmények megfelelőek a konverzióhoz. A batch üzemmód előnye, hogy viszonylag egyszerű konfigurációjú, nem kell számolni a membrán eltömődésének lehetőségével (L.M. Huerta, et al., 2010). A szakaszos technológiával magas GOS hozam érhető el, azonban az enzimek inaktiválásán kívül számolni kell a termék enzim- és mikrobamentesítésével is.

2.3.2. GOS előállítás folyamatos működésű enzimes membrán reaktorban (EMR)

Folyamatos működésű enzimes membrán reaktor alkalmazása esetén a laktóz oldat az enzimmel együtt egy kevertetett reaktorba kerül. Egy szivattyú keringteti a rendszerben, mely egy membrán modul tartalmaz. A membrán egy olyan permszelektív réteg, melynek köszönhetően az ultraszűrés az enzimet visszatartja (retentátum), de átengedi a szénhidrátokat (permeátum). A permeátum mennyiségétől függően, azzal megegyező mennyiségű friss laktóz oldatot adagolnak a reaktorba, így a rendszerben keringő folyadék mennyisége állandó. A magas kezdeti laktóz koncentráció a reakció első óráiban csökken, majd egyensúly áll be. A GOS kihozatal ezt követően állandó. Ezen konfiguráció előnye, hogy nincs szükség az enzim inaktiválására, így költségtakarékos az enzim újrafelhasználhatósága miatt, és a produktum elvezetése miatt annak

enzimműködést gátló hatása sem érvényesül (T. Palai, et al.,2014). Hátránya, hogy az enzimek számos okból kifolyólag veszíthetnek aktivitásukból az előállítás során. Ennek oka lehet például a szivattyú folyamatos működése, vagy a membrán pórusainak részleges vagy teljes eltömődése. Szintén gondot jelenthet, hogy a membrán feletti koncentráció polarizációs rétegben saját oldhatóságukat túllépik.

2.3.3. GOS előállítás rögzített enzimes eljárással

A rögzített enzimes eljárás során az enzimek az előző két konfigurációtól eltérően nem oldott állapotban vannak jelen a rendszerben. Leggyakrabban az enzimet valamilyen kémiai kötéssel a hordozóhoz rögzítik, mely többnyire szerves cellulóz-származék. Így a reakció végén nincs szükség az enzimek inaktiválására, és a termék enzimmentesítésére sem. Nagy előnye még, hogy az enzim stabilitása a szabad enzimhez képest jelentős mértékben nő. Itt azonban számolnunk kell azzal, hogy az átáramló folyadék nagyobb járatokat tör magának („chanelling”), így a konverzió mértéke nem lesz megfelelő. Ennek elkerülése érdekében alkalmazható az áramlás irányának periodikus változtatása, ez azonban szintén inaktiválhatja az enzimek egy részét. Emellett a gyártás során rendszeresen szükség van adott idő elteltével tisztítási műveletek elvégzésére.

2.4. Az enzimes galakto-oligoszacharid szintézis nyomon követhetősége

2.4.1. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

A galakto-oligoszacharid előállításánál a produktum összetételének ellenőrzésére legtöbbször HPLC-t (High Performance Liquid Chromatograph) használnak. Kvalitatív és kvantitatív módszer, megbízható információt szolgáltat. (Gosling, et al.,2009)

A kromatográfias módszerek feladata a minta komponenseinek egymástól való elválasztása. A méréshez szükséges egy mozgó fázis (eluens), melybe a mintát injektáljuk. A mérés során az eluent szoros kontaktusba hozzuk az azzal nem elegyedő álló fázissal. Az eluent állandóan mozgásban tartva a minta komponensei kölcsönhatásba lépnek az álló fázissal, és e kölcsönhatások különböző mértéke miatt a megfelelő kontaktidő elteltével elkülönülnek egymástól. A rendszerhez

kötött detektor megkülönbözteti a mintakomponenseket az oldószertől. A detektorjel az idő függvényében ábrázolható, ekkor csúcsokat (ún. peak-eket) kapunk. A különböző csúcsok egy-egy adott vegyületet jelentenek. E csúcsok az adott vegyületre jellemző retenciós idő (minta injektálásától a peak megjelenéséig eltelt idő) elteltével jelennek meg. A kvalitatív analízis tehát a retenciós idő alapján történik, mivel ez a minta anyagi minőségének függvénye. A kvantitatív analízis a csúcsok alatti terület meghatározásával lehetséges, az adott komponens mennyisége ezzel arányos a mintában.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiánál a hatékonyság növelését nagyon apró szemcseméretű, és így nagy fajlagos felületű töltetek alkalmazásával érték el. Ezen szemcsék igen tömören helyezkednek el a kolonnában, ezzel jelentősen megnövelve annak ellenállását. Ezért szükséges az eluens nagy nyomással való áramoltatása, ami különleges szerkezeti anyagú, kémiai ellenálló és költséges dugattyús folyadékpumpákkal valósítható meg. Az eluens és a minta sem oldott gázokat, sem szennyeződés szemcséket nem tartalmazhat, mert ez a detektor jel ingadozását és a töltött oszlop szemcséi közti mikrométernél is kisebb járatok eltömődését eredményezi. (Galbács, et al., 2008)

2.4.2 Egyéb módszerek eddigi alkalmazása a GOS szintézis nyomon követésére

A HPLC-n kívül a laktóz és a GOS mennyiségének meghatározására a termékben egyéb módszereket is alkalmaztak:

- kapilláris elektroforézis UV-DAD detektorral (Chockchaisawasdee et al., 2005; Splechtna, et al., 2001, 2006, 2007; van den Broek et al., 2008);
- vékony réteg kromatográfia (Aslan & Tanriseven, 2007; Sanz, Coté, Gibson, Rastall, 2005; Splechtna et al., 2001, 2006);
- tömeg spektroszkópia (Sanz et al., 2005)

A GOS előállítás kivitelezését azonban nagyban megkönnyítené egy online analitikai módszer használata, melynek segítségével a termék összetétele valós időben meghatározható lenne. Az erre alkalmas módszer felé támasztott elvárás, hogy gyors, megbízható, egyszerű és olcsó legyen. Jelenleg a szakirodalomban nem található olyan publikáció, mely teljes körű megoldást kínálna a problémára, de egy 2008-as publikáció alapján az UV-spektroszkópia a megfelelő statisztikai módszerrel együtt használva (Partial Least Squares Regression - PLS vagy Artificial Neural Networks - ANN) alkalmas a képződő termékek gyors determinálására.

A fermentációt batch módban működő bioreaktorban végezték. Az 53 mintát három különböző fermentációból nyerték. A HPLC analízist szobahőmérsékleten végezték a minták

hígítása után, RI detektort (refractive index) alkalmazva, ezzel nyerve a referencia értékeket a statisztikai modell tréningezéséhez. Az UV-spektroszkópiás mérés előtt a mintákat 1:100 arányban hígították, szűrték, és 190-299 nm-es tartományban detektálták a minták abszorbanciáját. A két kapott adathalmaz között a statisztikai programok segítségével kereshető a matematikai összefüggés. A modell számos minta adataival való tréningezése után az összetétel egyre nagyobb pontossággal határozható meg. Megállapításra került, hogy mind a PLS, mind az ANN módszer segítségével meghatározott összetételi adatok nem térnek el az elméleti értékektől (5%-os szignifikancia szinten). Az UV-spektroszkópia a megfelelő statisztikai modellel alkalmazva tehát alkalmas a GOS előállítás termékeinek gyors meghatározására, de a bemért minták számának növelésével még pontosabb becslés is kivitelezhető lenne. (L.G. Dias, et al.,2008) Fontos kihangsúlyozni, hogy a publikációban ismertetett kísérlet során fermentációt végeztek, tehát a bemért minták tartalmazták az enzimet termelő mikroorganizmusokat is. Továbbá, hogy a mintákat hígították és szűrték az UV-spektrofotometriás mérés előtt.

Az UV/PLSR-módszer sikeres alkalmazását 2013-ban publikálták más kutatási területen, három antiemetikus gyógyszer gyors, egyidejű meghatározására (F. Bourdon, et al.,2013).

2.4.3. Az UV-spektroszkópia elve

Az abszorpciós spektroszkópia az elektronátmenetek tanulmányozásával foglalkozó egyik spektroszkópiai módszer. Ultraibolya (UV, $200\text{ nm} \leq \lambda \leq 400\text{ nm}$) fény abszorpciójakor (elnyelések) a molekulák elektroneloszlása megváltozik, kisebb energiájú pályákról az elektronok nagyobb energiájú pályákra ugranak át, gerjesztődnek. Azt az energiatartományt, melynél az adott vegyület elnyel, elnyelési sávnak nevezzük, ennek helye a spektrumban az anyagi minőség függvénye. Az anyag fényelnyelését a besugárzó fény hullámhosszának függvényében ábrázolva kapjuk az abszorpciós spektrumot. Ez kvalitatív és kvantitatív információkat is hordoz.

Az oldatot egy I_0 intenzitású, adott hullámhosszú fénysugárral besugározva, a fénysugár intenzitása az anyag abszorpciója miatt lecsökken I intenzitásra. A fényelnyelést egy mértékegység nélküli mennyiség, az abszorbancia jellemzi. Az abszorbancia az I_0 és az I hányadosának tízes alapú logaritmus. (Galbács, et al., 2008)

A hagyományos spektrofotométerekben a mintát küvettába helyezik, és ezt világítják át egy monokromatikus fénysugárral. Az úgynevezett átfolyós (flow-through) spektrofotométerekben a mintavétel folyamatos. Az átfolyós UV-detektorokat elterjedten alkalmazzák HPLC mérések detektoraként (F. M. Willis, M. J. Felton, 2004).

A flow-through technológia teszi alkalmassá az UV-spektroszkópiát, hogy a jövőben részét képezhesse egy olyan online analitikai módszernek, mely a GOS enzimes reaktorban történő szintézisének nyomon követésére alkalmas.

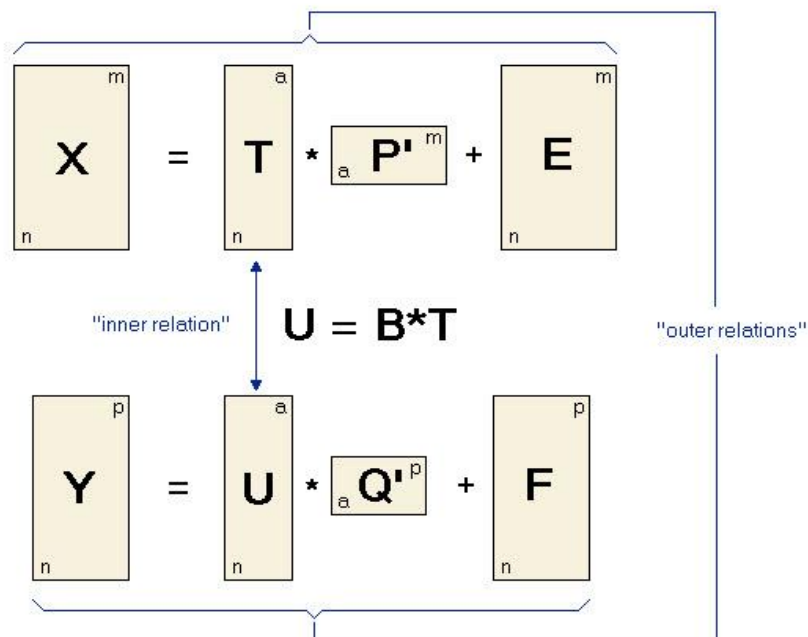
Az UV-spektrofotométerrel történő pásztázással (scanning) nyert adatokból közvetlenül nem következtethetünk a fermentációból nyert minta összetételére. A kapott adatmátrix és a valós összetétel közötti összefüggést statisztikai módszerek segítségével írhatjuk fel. TDK dolgozatomban a Parciális Legkisebb Négyzetek Regressziójának (PLS) módszerével foglalkozom részletesen.

2.4.3.1. Parciális Legkisebb Négyzetek Regressziója (PLS)

A PLS a kemometriában legelterjedtebben alkalmazott regressziós módszer. Segítségével az UV-spektroszkópiánál modellezhető a kapcsolat a minták abszorbancia értékei, és a kémiai összetétele között. A PLS modell felépítését a 4. ábra szemlélteti. Adott a független változók ('independent variables') X mátrixa, ami jelen esetben az egyes minták abszorbancia értékének mátrixa. A függő változók ('dependent variables') Y mátrixa ennél az alkalmazásnál az egyes minták kémiai összetétele.

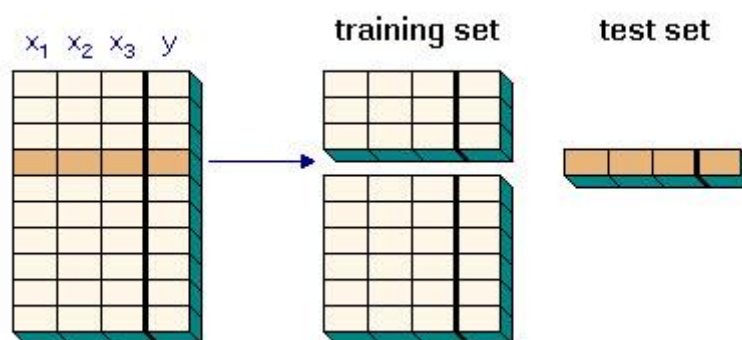
A PLS első lépése főkomponens analízis (Principal Component Analysis, PCA). A PCA adott adatmátrixra megkeresi azt az irányt, melynek mentén a változók maximálisan szétszóródnak, tehát az első főkomponens megtalálásával maximalizáljuk a változók egy lineáris kombinációjának szórását. Ezt követően erre az egyenesre merőleges irányok mentén meghatározzuk a további főkomponenseket.

Így bontható főkomponens analízissel X egy ' T ' mátrixra (ún. faktorpontok – 'score matrix'), ' P ' faktor súlyra (factor loading), és ' E ' hiba mátrixra. Y ezzel analóg módon bontható ' U ' mátrixra (faktor pontok), ' Q ' faktor súlyra és ' F ' hibamátrixra. A PLS regresszió a következő lépésben, az így nyert két mátrix első n főkomponense (látens változók) között épít fel lineáris regressziót.



4. ábra: A PLS modell felépítése
http://www.statistics4u.com/fundstat_eng/dd_pls.html

Fontos kérdés a PLS modell létrehozásánál, hogy hány főkomponenssel dolgozzunk. Annyi főkomponens lehetséges, amennyi a változók száma, de ha túl sokkal dolgozunk, az úgynevezett overfitting-hez vezet, melynél nagy lesz a becslésünk hibája. Ha túl kevés komponenst tartunk meg, akkor épp ellenkezőleg, nem tudjuk eléggé magyarázni a függő változókat, ez az underfitting, melynél szintén pontatlanul becslünk. A főkomponensek optimális számának meghatározására keresztvalidáció (crossvalidation) használható. Ennek során két részre bontjuk az adathalmazunkat, ahogy ezt az 5. ábrán láthatjuk. A nagyobb rész ('training set') segítségével hozzuk létre a modellt, a kisebb részt ('test set') pedig annak validálására használjuk, melynek során összehasonlítjuk a kapott eredményeket a várt értékekkel.



5. ábra: Cross validation
http://www.statistics4u.com/fundstat_eng/cc_cross_validation.html

Mivel a tesztállomány kiválasztása véletlenszerű, minden modell újraépítésekor más eredményt kaphatunk. Ezért Monte-Carlo módszerrel n-szer újraépítve a modellt, kapjuk a statisztikailag korrekt eredményt.

A felvázolt PLS modell gyakorlati implementációja során szükséges az egyes minták adott hullámhossz-tartományon mért abszorbanciája, és a mintákhoz tartozó összetételi adatok. Ezt nevezzük 'training set'-nek, mely segítségével tanítjuk a modellt. Minél nagyobb mintahalmaz áll rendelkezésre a modell felépítéséhez, annál pontosabb eredményeket érhetünk el. A modell elkészítése után már elegendő a mintákhoz tartozó abszorbancia mátrix, mert a modell segítségével így már jó közelítéssel becsülhető a komponensek összetételi aránya, HPLC alkalmazása nélkül.

3. Célkitűzések

Ez a dolgozat részét képezi a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszékén zajló kutatásnak, melynek célja, hogy tejsavóból nyert laktózból magas galakto-oligoszacharid koncentrációjú szirupot állítsunk elő.

A galakto-oligoszacharid gyártási folyamatának optimalizálásához szükséges felmérni az enzim működéséhez legoptimálisabb feltételeket és keresni azt a konfigurációt, mellyel gyorsan és költséghatékonyan magas GOS hozamot érhetünk el. A reakció nyomon követhetőségének érdekében pedig szükség van egy online analitikai módszerre, hogy a konverzió mértékéről ne csak utólag nyerhessünk információt, ezzel megkönnyítve mind az optimalizálás, mind pedig az ipari előállítás folyamatát.

Tekintettel arra, hogy az UV spektrofotometria alkalmazásáról a GOS előállítás területén jelenleg csak egyetlen publikáció ismert a szakirodalomban, elsődleges cél annak bizonyítása, hogy a módszer valóban alkalmas a különböző összetételű minták egymástól való megkülönböztetésére.

Sejthető, hogy az eredmények közötti összefüggés nem lineáris, az abszorbancia értékekből nem következtethetünk közvetlenül a minta összetételére. A következő lépés így a megfelelő statisztikai módszer kiválasztása az adathalmazok kezelésére.

Dolgozatom elsősorban a folyamatos működésű enzimes membrán reaktorban előállított GOS termelést vizsgálja, hiszen itt a termék mikrobától és enzimtől mentes. Ipari alkalmazást tekintve a szakaszos üzem mód a leginkább elterjedt, így szakaszos üzem módban előállított mintákra vonatkozóan is végeztem kísérleteket.

Egy új online analitikai módszer kifejlesztése összetett feladatot jelent. Szükséges felmérni a módszer pontosságát, megbízhatóságát, robusztusságát. Az UV Spektroszkópia módszere rendkívül gyors, olcsó és egyszerű, a HPLC-s mérésekkel ellentétben itt a minták hígítására sincsen szükség. Fontos kihangsúlyozni, hogy ezzel a módszerrel nem kaphatunk a HPLC precizitását megközelítő összetételi adatokat, így célunk nem a HPLC kiváltása. Hatalmas előnye az offline HPLC-vel szemben azonban, hogy online módszer, valós időben szolgáltatva adatokat a reakció állapotáról, az aktuális laktóz illetve galakto-oligoszacharid koncentrációról. A módszer ipari alkalmazása nagyban megkönnyíthetné a gyártók munkáját, redukálhatná költségeiket, mivel az esetleges problémákat azonnal jelezve lehetővé teszi a hibák időben történő korrekcióját.

TDK dolgozatom célja tehát az UV spektroszkópiával történő online analitikai módszer kidolgozása. A módszer igazolására kísérletek és tesztek futtatása, és a megfelelő matematikai-statisztikai háttér kidolgozása a nyert adatok feldolgozására és gyors értelmezésére.

4. Anyag és módszer

4.1. Felhasznált anyagok

4.1.1. Enzim

A galakto-oligoszacharidok laktózból való szintéziséhez felhasznált enzim β -galaktozidáz volt, termelő mikroorganizmusa *Bacillus circulans*. A Biolacta N5-öt (gyártó: Daiwa Kasei K.K., Japan) a Friesland Campina DOMO (Amersfoort, Hollandia) biztosította a kutatáshoz.

4.1.2. Laktóz

A galakto-oligoszacharidok enzimes szintéziséhez felhasznált reaktorba illetve táptartályba töltött oldat gyógyszerészeti minőségű α -laktóz-monohidrát desztillált vizes oldata volt.

Az általam felhasznált termék a **Lactochem®** Pharma Fine Powder, melyet a Friesland Campina DOMO (Amersfoort, Hollandia) állítja elő.

A termék fehér, por halmazállapotú, nedvesség tartalma 5,1%, 100 g termék 94,9 g laktózt tartalmaz.

4.1.3. Vivinal GOS Syrup és Powder

Az UV-spektrofotometria módszer használhatóságát előzetes mérések során teszteltem. Ehhez a **Vivinal®** GOS Syrup és **Vivinal®** GOS Powder termékeket használtam fel (gyártó: Friesland Campina DOMO).

1. Táblázat: **Vivinal®** termékek összetétele

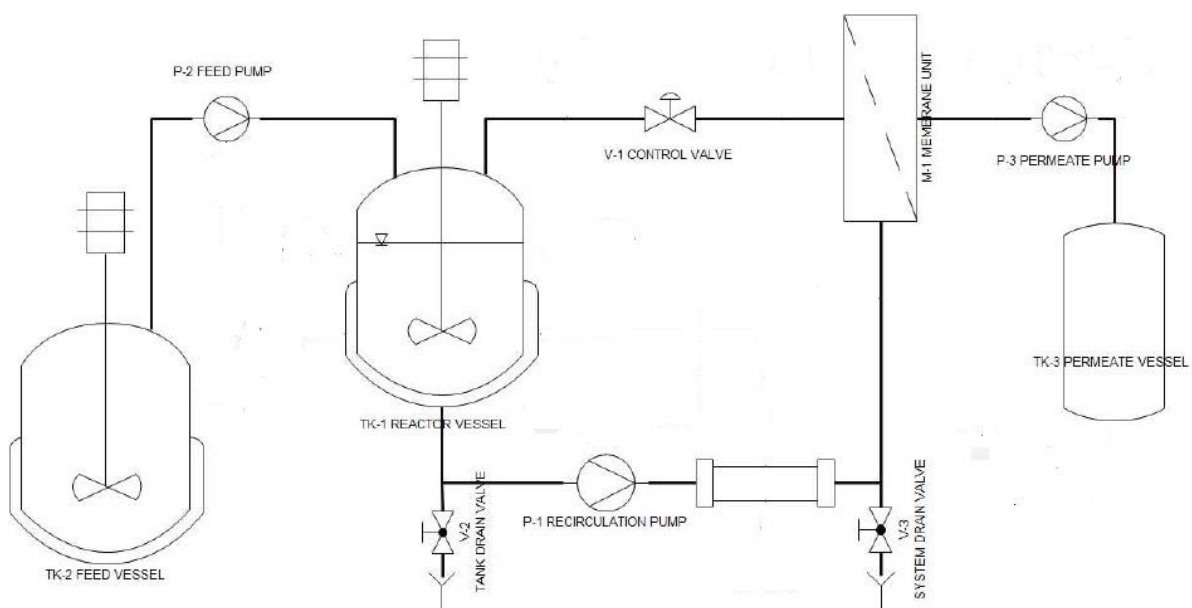
	Vivinal® GOS Syrup	Vivinal® GOS Powder
Nedvesség tartalom:	25 %	2,9 %
Száraz anyag tartalom:	75 %	97,1 %
GOS mennyisége a száraz anyagban:	59 %	71 %
GOS tartalom 100 g termékben:	44,25 g	68,94 g

4.2. Berendezés konfiguráció

4.2.1. GOS előállítás folyamatos működésű enzimes membrán reaktorban

Az általam használt berendezés vázlata 6. ábrán látható. A GOS szintézishez a reaktorba (TK-1) kerül a laktóz oldat, mely egy termosztát segítségével állandó hőmérsékleten tartható. Egy szintérzékelőhöz (LSN-107) csatlakoztatott perisztaltikus szivattyú (P-2) segítségével a reaktorban az oldat térfogata állandó. Az elvezetett permeátum mennyiségétől függően annak megfelelő mennyiségű friss laktóz oldat kerül a reaktorba a táptartályból (TK-2). Az enzimet a reaktorban adjuk hozzá az oldathoz, melyet egy szivattyú (P-1) segítségével cirkuláltatunk az UF-membránon (M-1) keresztül. A membránszűréshez használt UF membrán típusa PES10-31-CB-1812PHT-F, 0.37 m² aktív felülettel, 10 kDa vágási értékkel. A membránt a Synder Filtration-tól (San Francisco, USA) szereztük be. A membrán az enzimeket teljesen visszatartja, a szénhidrátokat átengedi. A szűrés hajtóereje a transzmembrán nyomáskülönbség (Δp , Bar) a permeátum és a retentátum oldal között. A retentátum-oldali nyomás a V1-es szelep segítségével szabályozható. Az P-3-as jelű perisztaltikus szivattyúval elvezetett termék így enzimmentes, az általunk beállított tartózkodási idő függvényében tartalmaz galakto-oligoszacharidokat, glükózt, galaktózt és laktózt. Az egyensúly beállta után, amennyiben nem történik zavar a rendszerben, a permeátumban a GOS mennyisége állandó, hiszen mindig ennek megfelelő mennyiségű friss laktóz oldat kerül a reaktorba.

Az EMR előnye, hogy nincs szükség az enzim inaktiválására, mivel a termék enzimmentes, így nagy mennyiségű enzim takarítható meg ezzel a konfigurációval, ezzel csökkentve a költségeket.



6. ábra: Folyamatos működésű enzimes membrán reaktor

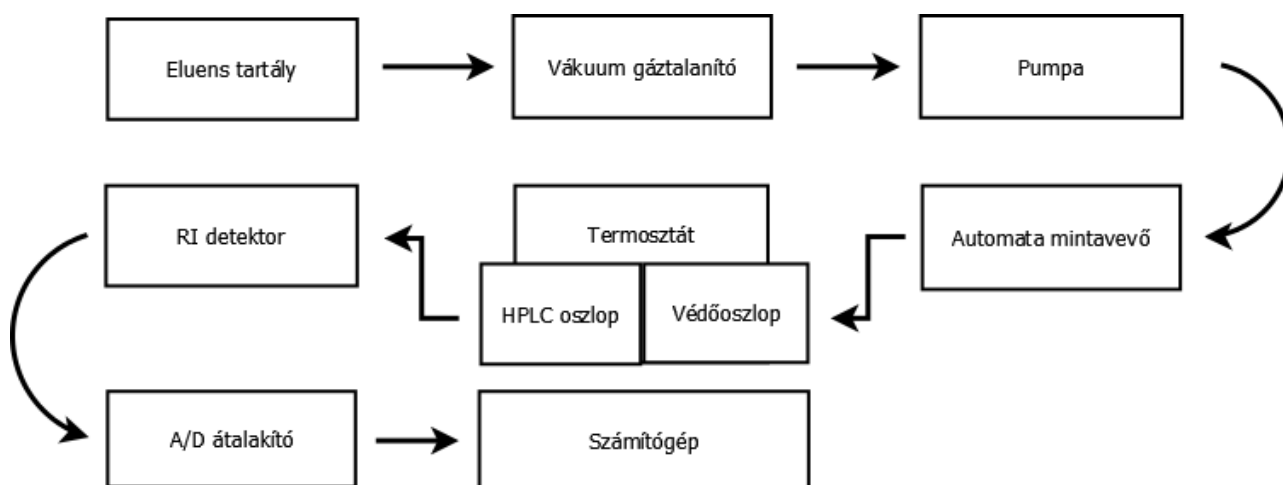


7. ábra: A kísérletekhez használt EMR berendezés

4.3. Analitikai módszerek

4.3.1. Nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfia (HPLC)

A reaktorból vett mintákat, illetve a Friesland Campina által biztosított Vivinal GOS termékeket nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiával vizsgáltam. A HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) működési elve a 2.4.1.-es szekcióban került ismertetésre. Az általam alkalmazott HPLC rendszer felépítését a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra: HPLC folyamatabrája

A mérés során az eluens tartályból desztillált víz folyik keresztül a rendszeren. Először a vákuum gáztalanítóba kerül (*SpectraSystem SCM1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA*), ahol a mérést torzító légbuborékok eltávolításra kerülnek. Ezt követően a pumpán halad át (*SpectraSERIES P200, Spectra-Physics, Fermont, USA*), majd az automata mintavevő (*SpectraSERIES AS100, Spectra-Physics, Fermont, USA*) az eluensbe injektálja a bekészített mintákat. A védőoszlopot (*Rezex RNM-Carbohydrate Na⁺ (8%), Phenomenex, Torrance, USA*) és a HPLC oszlopot (*Rezex RNM-Carbohydrate Na⁺ (8%), Phenomenex, Torrance, USA*) az automata mintavevő termosztátjába építettük be, ahol a termosztátot a mérések során állandó 50 °C-os hőmérsékletre állítottam. Az oszlopon átfolyik a mintát tartalmazó eluens, és az oszlop apró tölteteivel a minta vegyületei különböző módon lépnek interakcióba. Az RI detektor (*Melz LCD 312, VDS optilab Chromatographietechnik GmbH, Berlin, Germany*) megkülönbözteti az oldott komponenseket a víztől és továbbítja a jelet az analóg/digitál jelátalakítóhoz (*N2000 Chromatography Data System, Science Technology (Hangzhou) Inc., Kína*), amely már a digitális jelet továbbítja a számítógép felé. A kromatogram a Surwit® 2000 szoftver segítségével került rögzítésre (*N2000 Photographic Data Workstation, Science Technology Inc., Hangzhou., Kína*).

A különböző retenciós idők alapján az egyes komponensek megkülönböztethetők, és a Surwit® 2000 szoftverrel az egyes peak-ek területeinek arányából következtethetünk a minta mennyiségi összetételére is.

4.3.2. UV-VIS Spektrofotométer

Az UV-spektrofotometria elméleti alapjai a 2.4.3.-as szekcióban olvashatóak. A HPLC-vel analizált mintákat UV-VIS spektrofotométerrel is bemértem. Ehhez a Thermo Electron Corporation Spectronic GENESYS 5 UV-Visible Spectrophotometer készüléke állt rendelkezésemre. A GENESYS 5 modell 8 darab küvetta tartóval rendelkezik és 200 nm-től 1100 nm-ig képes mérni. A készülék LCD kijelzővel van ellátva, ahol azonnal megjelennek a mérési eredmények. Két ún. SoftCard segítségével működtethető, az egyik a szükséges szoftvert tartalmazza, a Memory SoftCard-ra pedig a mérési adatok menthetők. A készülék nyomtató-kompatibilis, így az eredmények nyomtatás és szkennelés után számítógépen is feldolgozhatók.

Méréseim során egy adott minta abszorbanciájára több hullámhosszon is szükség volt. Ezt az UV-tartományban 201 és 300 nm közötti szkenneléssel nyertem, 3 nm-es felbontással, így mintánként 34 hullámhosszon bemérve 34 darab abszorbancia érték állt rendelkezésre. Erre a softwer Survey Scan programját használtam, az adott mérési beállítások mentésével a SoftCard-ra. A mérések előtt mindig sorkerült a baseline felvételére, mikor a készüléket tiszta desztillált vizet tartalmazó vakoldatra nulláztam.

Az előzetes vizsgálatoknál különböző hígítási sorokat készítve vizsgáltam a kapott abszorbancia értékek közötti különbséget, de a tényleges mérés során vett minták hígítás nélkül kerültek bemérésre. Fontos szempont volt a mérés során, hogy a gyors és könnyebben megvalósítható ipari kivitelezés érdekében ne legyen szükség a permeátumból vett minták hígítására.

4.4. PLSR implementációja MATLAB®-ban

A MATLAB® egy interaktív környezet numerikus számítások elvégzésére, vizualizációjára és programozásra. Használatával lehetséges az adatfeldolgozás, algoritmusok írása, különböző modellek és applikációk létrehozása. (<http://www.mathworks.com/products/matlab/>)

Az általam MATLAB®-ban létrehozott PLS modellhez a két kísérletből összesen 81 darab minta UV-spektrofotométerrel meghatározott abszorbancia adatait, és HPLC-vel meghatározott kémiai összetételi adatait használtam fel. A független változók mátrixa egy 34 x 81 –es mátrix, mivel 201nm - 300 nm hullámhossz tartományban mértem 3 nm felbontással és ez 34 különböző abszorbancia értéket eredményezett. A függő változók mátrixa egy 7 x 81 –es mátrix, mert a minták HPLC analízisének a galaktóz, glükóz, DP2, DP3, DP4, DP5 arányát mértem, mely kiegészült a DP3, DP4 és DP5 egyes mintánkénti összegével. Ennek oka, hogy a DP3-DP5 együttes mennyisége többet árul el az enzimes reakció lefutásáról, mint külön az egyes oligo-szacharidok mennyisége.

A PLS komponensek számának meghatározásához (egyezik a PCA komponensek számával) keresztvalidációt alkalmaztam, melynek során a minták 10%-a került kiválasztásra a 'test set'-hez, az algoritmus által véletlenszerűen. Fontos megjegyezni, hogy a véletlenszerű kiválasztás miatt az algoritmus minden egyes lefuttatásának alkalmával törvényszerű, hogy valamelyest eltérő eredményeket kapjunk. A Monte-Carlo módszert 100-as ismétlés számmal alkalmaztam.

5. Eredmények

5.1. Előkísérletek

A tervezett kísérletet megelőzően több előkísérletet végeztem arra vonatkozóan, hogy az UV spektroszkópia valóban alkalmas-e, hogy különböző laktóz, illetve galakto-oligoszacharid tartalmú minták között különbséget tegyen.

A méréshez 33 g/l illetve 50 g/l –es koncentrációjú desztillált vizes oldatokat készítettem. Három különböző oldott anyaggal dolgoztam: **Lactochem®** Pharma Fine Powder, **Vivinal®** GOS Syrup és **Vivinal®** GOS Powder. A termékek részletes jellemzése a 4.1-es szekcióban olvasható.

A könnyebb összehasonlíthatóság érdekében a következő táblázatban foglaltam össze az egyes oldatok laktóz/galakto-oligoszacharid tartalmát.

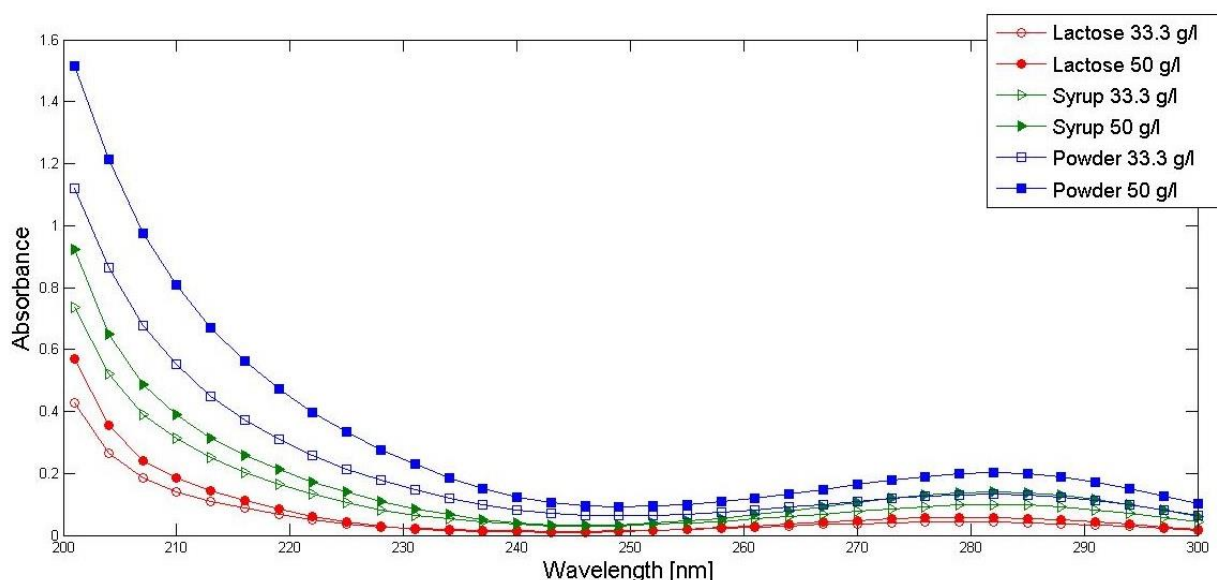
2. Táblázat: A felhasznált oldatokban található oldott anyagok mennyisége

Oldott anyag:	33 g/l oldatban oldott szacharidok mennyisége:	50 g/l oldatban oldott szacharidok mennyisége:
Lactochem® Pharma Fine Powder	31,3 g/l laktóz 0 g/l GOS	47,5 g/l laktóz 0 g/l GOS
Vivinal® GOS Syrup	14,6 g/l GOS	22,1 g/l GOS
Vivinal® GOS Powder	22,8 g/l GOS	34,47 g/l GOS

Az elkészített oldatokat Spectronic GENESYS 5 UV-Visible Spektrofotométerrel mértem be 201-300 nm-ig terjedő hullámhosszon.

Ahogy a 9. ábrán látható, az ugyanazon oldott anyagot tartalmazó minták esetén a koncentráció függvényében eltérő volt az abszorbancia. Megállapítható, hogy az abszorbancia függ az egyes minták galakto-oligoszacharid tartalmától, a legnagyobb értékeket a legtöbb GOS-t tartalmazó oldatra kaptam.

Az előzetes kísérlet igazolta, hogy az UV- spektroszkópiával különbséget tehetünk az egyes minták között, így indokolt további kísérletek elvégzése a kitűzött cél megvalósításának érdekében.



9. ábra: Az egyes oldatok abszorbanáciája a hullámhossz függvényében

5.2. Galakto-oligoszacharidok enzimes szintézisének vizsgálata

Két kísérletet futtattam le enzimes membrán reaktorban, hogy mintákat nyerjek az UV-spektrofotometriás analízishez. Fontos megjegyezni, hogy ezen kísérletek ipari szempontból nem relevánsak, a cél nem az EMR beállítási paramétereinek optimalizálása volt a GOS szintézishez. Elsődlegesen arra fókuszáltam, hogy a generált minták szacharid tartalma a legszélesebb spektrumon mozogjon, így reprezentálva az ipari alkalmazásnál lehetségesen előforduló különböző kompozíciókat az összetételt tekintve. Ennek értelmében az enzimes membrán reaktor használata önkényes választás volt. Más konfigurációk, mint a rögzített enzimes eljárás, ahol a termék szintén enzimmentes, ugyancsak alkalmasak lennének a célnak megfelelő mintahalmaz generálására.

5.2.1. Minta előkészítés

1. Kísérlet:

Az első kísérlethez 30 w/w%-os laktóz oldatot készítettem, és a pH-t NaOH segítségével 6-osra állítottam. Az oldatból 2 liter az EMR reaktorba került. Mikor a termosztát segítségével a reaktorban az oldat elérte az 50 °C-t, 2 g Biolacta N5 enzimet adagoltam hozzá, így az oldatban az enzim koncentráció 0,1 w/w% lett. Az enzim hozzáadása után beindítottam az oldatot cirkuláltató szivattyút, 0,15 m³/óra térfogatáramra. A retentátum oldali nyomást a szabályozó szelep segítségével 1 bar-ra állítottam. Ekkor a permeátumot áramoltató perisztaltikus szivattyú térfogatáramát 0,9 L/óra állítottam. A reaktorban található oldat térfogata a kísérlet során végig

állandó volt, mert egy szintérzékelő segítségével a permeátum mennyiségével egyezően egy perisztaltikus pumpa friss, szintén 50 °C-os laktóz oldatot adagolt a reaktorba. Ezen beállítások mellett a cirkuláló oldat tartózkodási ideje folyamatosan 1,8 óra volt.

A folyamatos működésű enzimes membrán reaktor 7 órán át üzemelt ezekkel a beállítási paraméterekkel. Az enzim hozzáadásától számított 3 óra elteltével 18 g friss enzimet adagoltam a reaktorba, így az enzim koncentráció 1,0 w/w% lett. A hőmérséklet, a retentátum és permeátum oldali nyomás és a szivattyúk által biztosított térfogatáram végig kontrollálva volt a mérés során. A mintavételezés az enzimmentes permeátumból történt.

2. Kísérlet:

A második kísérlet során az EMR a hagyományostól eltérően üzemelt, mert a retentátum mellett a permeátum is a reaktorba lett visszavezetve. Ennek köszönhetően nem volt szükség friss laktóz oldat adagolására, hogy a térfogat állandó maradjon. A reaktorba 6 kg 30 w/w%-os laktóz oldat került, pH-ját NaOH segítségével 6-osra állítottam. Termosztátot 50 °C-ra állítottam, ez a hőmérséklet állandó volt a mérés során. Az oldatot keringtető szivattyú 0,15 m³/óra térfogatáram generálásával működött. Enzimet adagoltam a reaktorba, hogy a koncentráció 0,3 w/w% legyen. Miután az enzim a reaktorba került, a retentátum oldali nyomást 1 bar-ra állítottam.

Az EMR a felsorolt beállítási paraméterek mellett szakaszos üzemmódban 6 órán keresztül üzemelt. A hőmérséklet, nyomás és térfogatáram végig kontrollálva volt a mérés során. A mintákat a permeátum kivezető csövéből vettem, így azok enzimmentesek voltak. Mivel az összes oldattérfogathoz képest gyakori volt a mintavétel, így az elvett mennyiséget ugyanannyi friss 30 w/w%-os laktóz oldattal pótoltam.

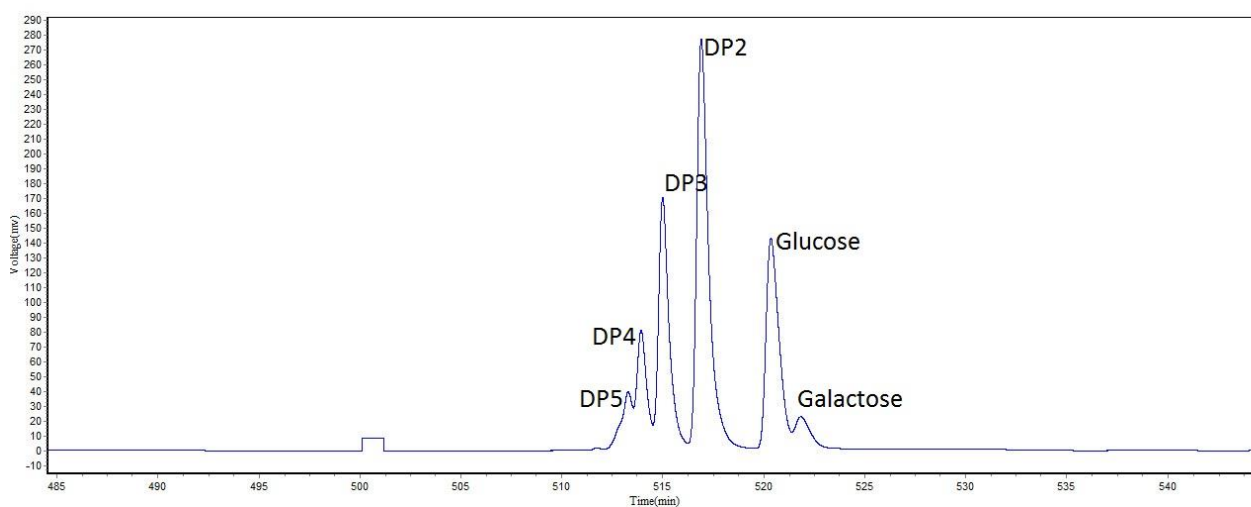
A membrán tisztítása:

A mérés előtt és után történik a membrán tisztítása. Először desztillált vizes átmosás történik, amit célszerű többször is megismételni. Ez után NaOH segítségével beállítom a desztillált víz pH-ját 10,5-re és ezzel történik egy mosás 50°C-on 0,5-1 bar nyomáson 1 órán keresztül. Majd újra desztillált vizes mosás következik, hogy ne maradjon a rendszerben NaOH. Minden tisztítás után szükséges mérni a membrán fluxusát.

5.2.2. Mintaanalízis

A HPLC analízis eredményei:

Az 10. ábrán egy az EMR reaktorból vett minta kromatogramja látható. Előzetes kísérletekben a komponensek egymáshoz viszonyított retenciós idejét hígítási sorok segítségével meghatároztuk. Látható, hogy a legrövidebb retenciós idővel a galaktóz rendelkezik, majd glükóz, DP2 (két monomerből álló oligoszacharid), DP3 (három monomerből álló oligoszacharid), DP4 és DP5 a sorrend. (A mintában a galaktóz jelenléte utal rá, hogy a transzgalaktozilálás mellett hidrolízis is zajlott.)

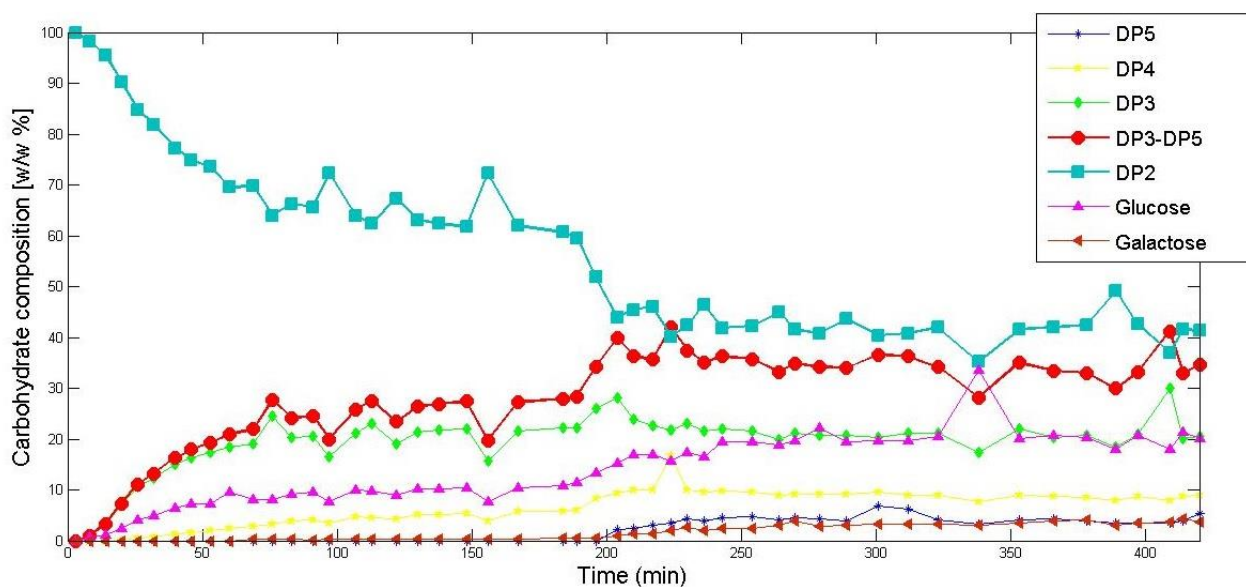


10. ábra: Egy EMR-ből vett minta HPLC kromatogramja a Surwit® 2000 szoftverben

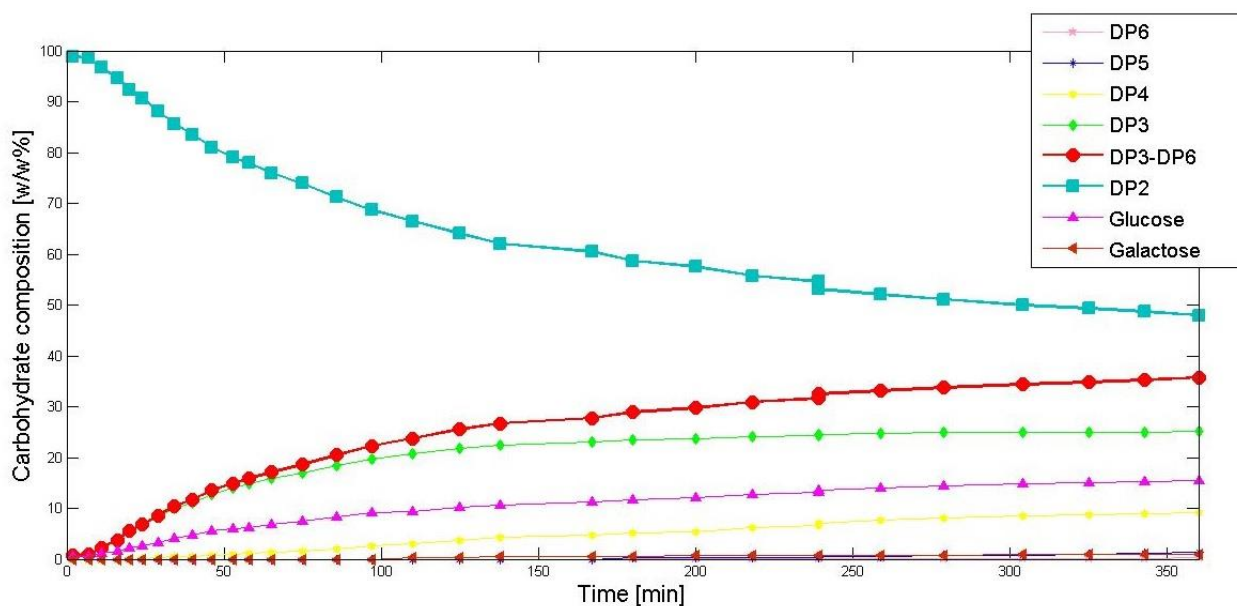
A két kísérlet során vett minták HPLC-vel meghatározott összetétele a 11. és 12. ábrán látható. Az egyes minták összetételét a mintavétel időpontjának függvényében ábrázoltam, így képet kaptunk az enzimes GOS szintézis lefutásáról.

A könnyebb áttekinthetőség érdekében a két legfontosabb komponens lefutási görbéjét kiemeltem. Kék négyzet jelöli a DP2-t, azaz a két monoszacharidból álló oligoszacharidot. Ennek mennyisége a reakció legelején 100%, mivel ez a szintézis kiindulási anyaga, a laktóz. Fontos megjegyezni, hogy a DP2-vel jelölt komponens a reakció során már nem csak laktózt jelenthet. Ennek oka, hogy az általunk használt HPLC berendezéssel nem tudjuk külön detektálni a laktóz molekulát és az enzimes szintézis során képződő két monomerből álló galakto-oligoszacharidokat. Tekintve, hogy a DP2 jelentős részét végig a laktóz teszi ki, csökkenéséből látjuk, hogy az enzim mekkora százalékban bontotta le és alakította át a kiindulási anyagot.

A DP2 csökkenésével párhuzamosan a piros körrel jelölt DP3-DP5 mennyisége nő. A DP3, DP4 és DP5 komponenseket külön-külön detektáljuk a HPLC analízis során. Együttes mennyiségük feltüntetése azonban azért indokolt, mert így könnyebben átlátható a reakció lefutása.



11. ábra: 1. kísérlet: GOS előállítás folyamatos működésű enzimes membrán reaktorban. Az egyes minták tömeg %-ban kifejezett szénhidrát összetétele a mintavétel időpontjának függvényében.



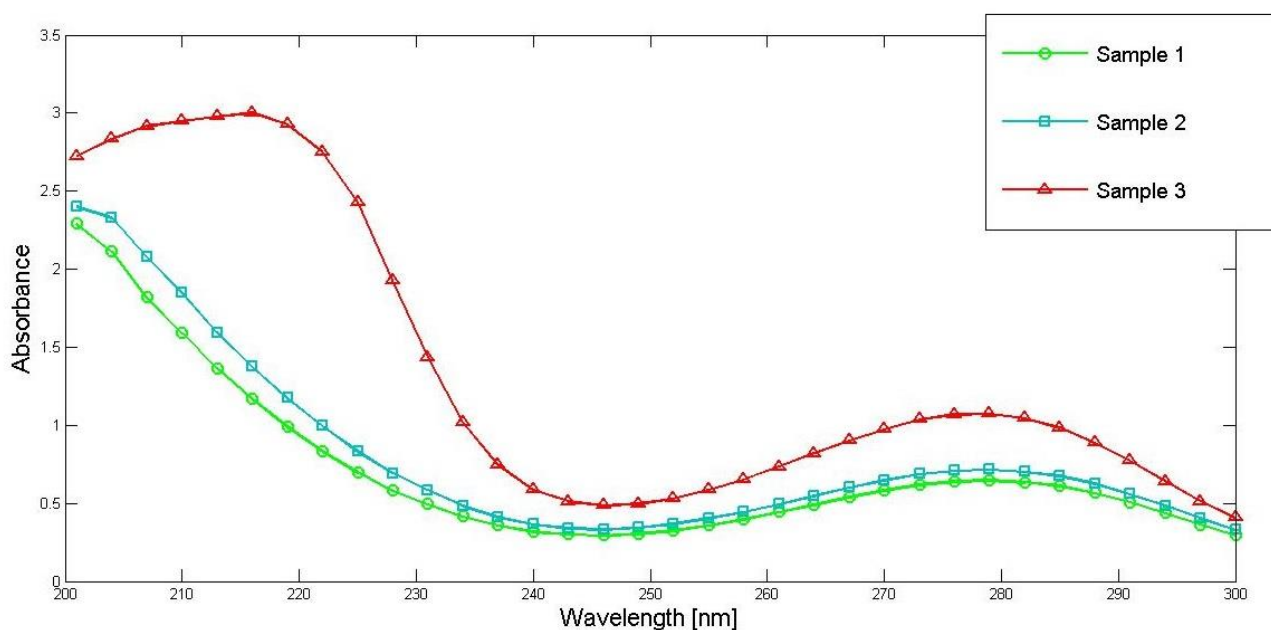
12. ábra: 2. kísérlet: GOS előállítás szakaszos üzemmódban működő enzimes membrán reaktorban. Az egyes minták tömeg %-ban kifejezett szénhidrát összetétele a mintavétel időpontjának függvényében.

Az EMR-ben végzett első kísérletnél láthatjuk, hogy az első egy óra elteltével a rendszerben nagyjából beáll az egyensúly, a képződő GOS mennyiség 25 w/w% körüli. 3 óra elteltével 1,0 w/w%-ra emeltem az enzim koncentrációját. Ezt követően a DP3-DP6 mennyisége 35 w/w%-ra emelkedett. Ismét beállt az egyensúly, a laktóz és a képződött galakto-oligoszacharid koncentrációja állandó volt. Ez erre a konfigurációra jellemző, mivel mindig az elvezetett permeátum mennyiségének megfelelő friss laktóz oldatot vezettünk be a rendszerbe.

A második kísérletnél az EMR-t szakaszos üzemmódban használtam. Láthatjuk a 12. ábrán, hogy a DP2 mennyisége egyenletesen csökkent, míg a DP3-DP6 mennyisége a reakció során végig egyenletesen nőtt. Ennél a kísérletnél az enzim koncentrációja végig állandó volt.

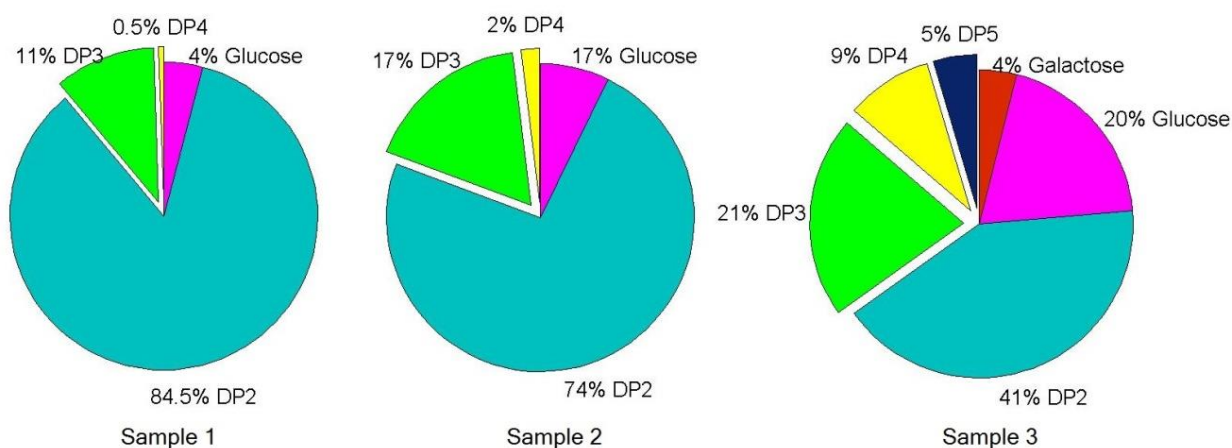
Az UV spektroszkópia eredményei:

A HPLC analízissel ellentétben az UV-spektrofotométerrel bemért minták eredményeiből közvetlenül nem tudunk következtetni az összetételre. A következő két ábra segítségével szemléltetni szeretném a különbséget, mely az egyes eltérő GOS tartalmú minták abszorbancia értékei között adódik. A 13. ábra három véletlenszerűen kiválasztott minta abszorbanciáját szemlélteti a hullámhossz függvényében. A zöld körrel jelölt első mintát (Sample 1) az enzim hozzáadása után 26 perccel vettük a reaktorból az első kísérlet során. A másodikat (Sample 2), a reakció 53. percében vettük. A harmadik minta (Sample 3) vételezése a 270. percben történt.



13. ábra: Az EMR-ből vett három véletlenszerűen kiválasztott minta abszorbancia értékei a hullámhossz függvényében.

A könnyebb összehasonlíthatóság érdekében a három minta HPLC-vel meghatározott összetételét egy-egy kördiagramon szemléltettem a 14. ábrán. Az első két minta összetétele között nincs olyan nagy különbség, mindkettő a reakció kezdeti szakaszából való. Láthatjuk, hogy abszorbancia értékeik is csak kis mértékben térnek el. A harmadik minta galakto-oligoszacharid tartalma már jóval magasabb, abszorbanciája is nagyban eltér az előző kettőtől.

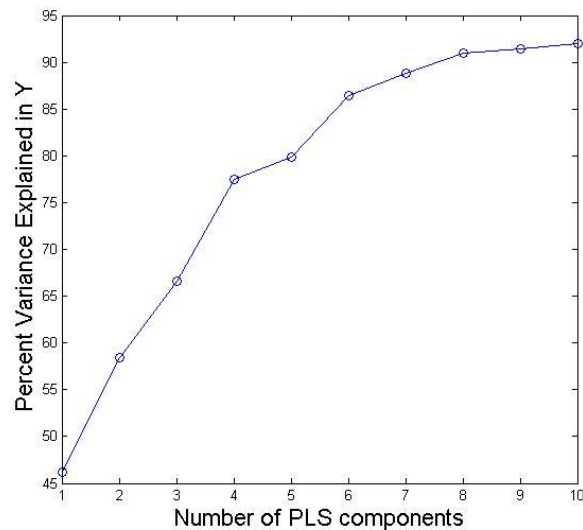


14. ábra: Az EMR-ből vett három véletlenszerűen kiválasztott minta HPLC-vel meghatározott szénhidrát összetétele

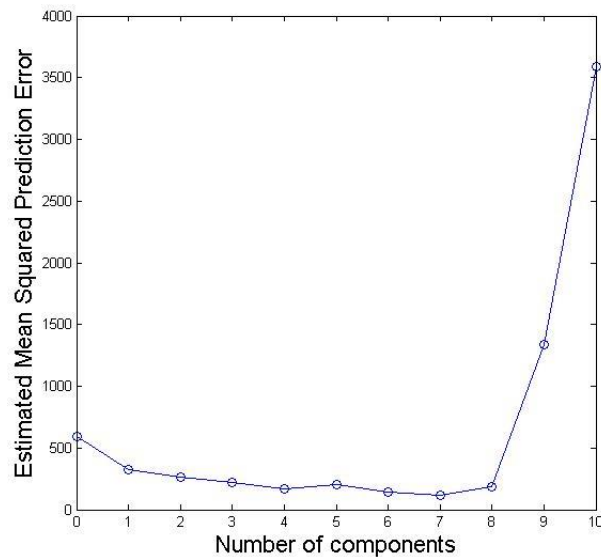
5.2.3. Adatfeldolgozás PLS modell segítségével

A MATLAB®-ban megírt algoritmus lefuttatása után nagyon jó eredményeket kaptam az UV-spektrofotométerrel bemért adatok alapján kiszámított szénhidrát összetétel becslésére.

Elsősorban szükség volt a PLS komponensek számáról való döntésre.



15. ábra: Az adatok magyarázata (%) a PLS komponensek számának függvényében.

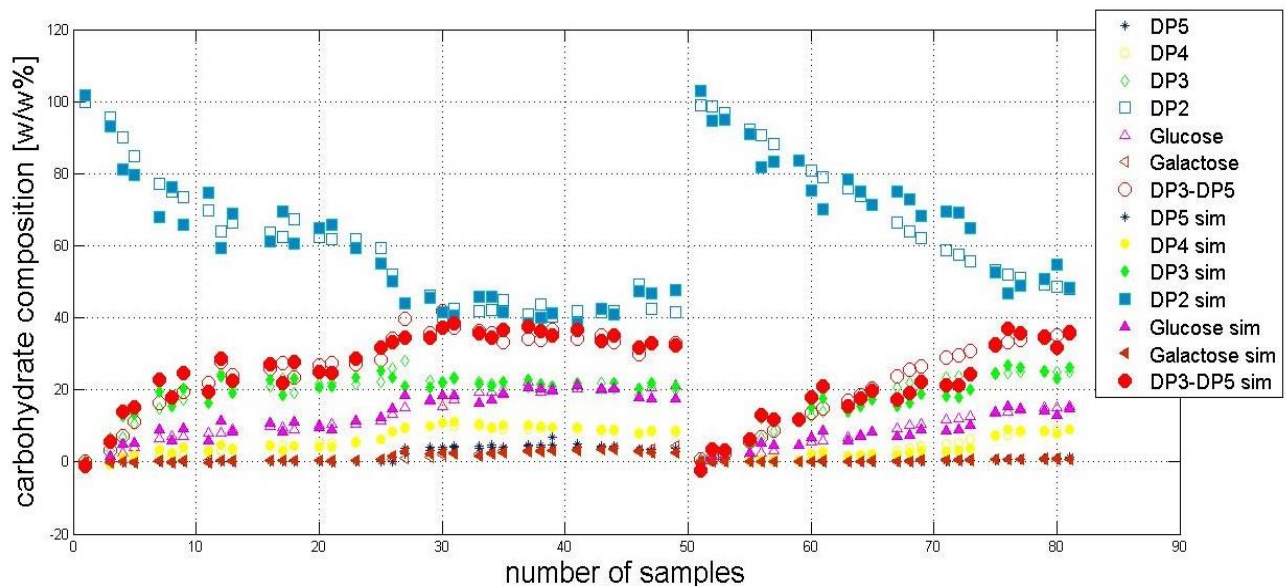


16. ábra: A PLS modell hibája a PLS komponensek számának függvényében.

A PLS komponensek számáról való döntést a 15. és 16. ábra segítette. A 15. ábrán láthatjuk, hogy az alkalmazott PLS komponensek számának függvényében milyen mértékben magyarázza a modell az adatokat. A 15. ábra a modell hibáját becsli meg a PLS komponensek számának függvényében. Ennek a minimuma 7 látens változó alkalmazásánál van. Hogy elkerüljük az 'overfitting' és 'underfitting' okozta pontatlanságokat, a modell felépítéséhez 7 PLS komponenst alkalmaztam.

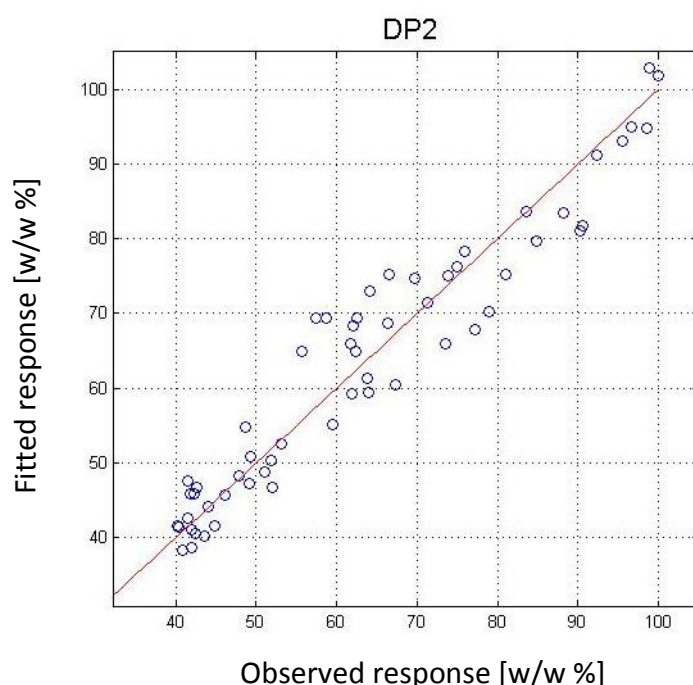
A 16. ábrán egyszerre két adatsort láthatunk. Az egyik a HPLC-vel meghatározott szénhidrát összetétel, amit az üres síkidomok jelölnek. A HPLC adatokat a modell tanításához vittem be. Mivel a modell építését egyszerre az összes minta adatsorával végeztem, az ábrán mindkét kísérlet adatai egyszerre szerepelnek. Ez azért is lehetséges, mert a modell szempontjából nincs jelentősége a mintavétel időpontjának, így az ábra x tengelyén a mintaszám szerepel. A másik adatsort modell elkészültével az algoritmus szimulálta, az UV-spektrofotométerrel meghatározott abszorbancia értékei alapján. Ezt a teli síkidomok ábrázolják.

Láthatjuk, hogy a teli és üres jelölések egészen jó illeszkedést mutatnak. Fontos hangsúlyozni, hogy célom a reakció nyomon követhetővé tétele, hogy korrigálni tudjuk az esetlegesen felmerülő problémákat. A 16. ábra alapján megállapíthatjuk, hogy az általam felépített PLS modell erre alkalmas.



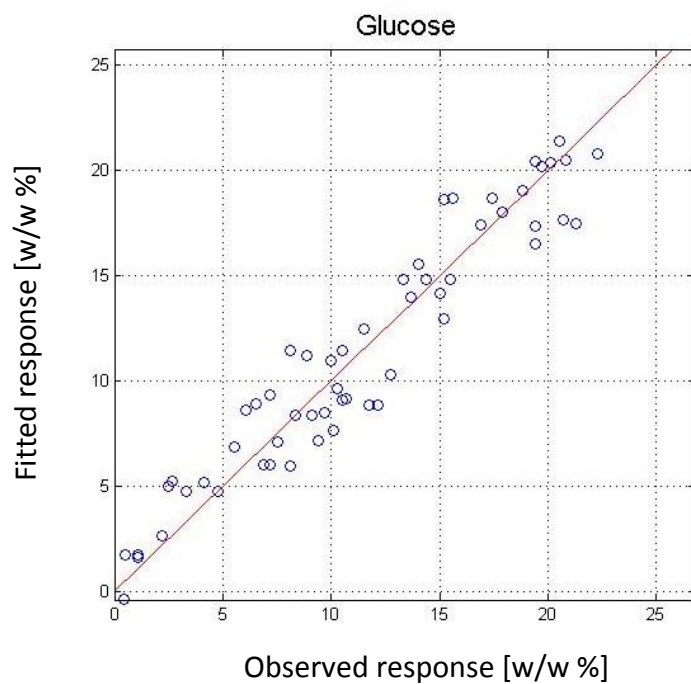
16. ábra: A két elvégzett kísérletből vett minták szénhidrát összetétele tömeg %-ban, és a PLS modell által szimulált szénhidrát összetétel tömeg %-ban.

A 17. és 18. ábrán láthatjuk, hogy mennyire egyeznek a modell által becsült eredmények a mérési adatokkal. A 17. ábrán a DP2 komponens tömegszázalékos arányát láthatjuk az egyes mintákban. Az ábra függőleges tengelyén, százalékos arányban a DP2 komponens modell által becsült mennyisége látható. A vízszintes tengely a HPLC analízissel meghatározott mintákban található DP2 komponens mennyiséget szemlélteti. A szimulált adatok megbízhatóságát az egyes pontok egyenesre való illeszkedésének mértéke mutatja. A 17. ábra alapján, az általam felépített PLS modell jó közelítéssel becsli meg a minta laktóz (illetve kisebb mennyiségű két monomerból álló galakto-oligoszaharid) tartalmát. Ez a reakció nyomon követhetősége szempontjából nagyon fontos, hiszen a DP2 a többi komponenshez képest nagy mennyiségben van jelen. A DP2 mennyiségének ismeretében könnyen megállapítható, hogy milyen fázisban van a reakció, mennyire hatékony az enzimes átalakítás.



*17. ábra: A egyes minták modell alapján becsült és
méréssel meghatározott DP2 komponens tartalmának
korrelációja*

A 18. ábra alapján láthatjuk, hogy a reakció során jóval kisebb mennyiségben jelen lévő glükózra is viszonylag pontos becslést ad a modell, nincsenek túlságosan kiugró pontok.



18. ábra: A egyes minták modell alapján becsült és méréssel meghatározott glükóz komponens tartalmának korrelációja

6. Összefoglalás

A galakto-oligoszacharidokat, mint hozzáadott értéket tartalmazó élelmiszerek összetevőit, az élelmiszeripar egyre nagyobb mennyiségben állítja elő. Az emésztésre gyakorolt jótékony hatásuknak köszönhetően egyre több termék tartalmazza. A galakto-oligoszacharidok felhasználhatósága széleskörű, mivel laktóz érzékenyek és cukorbetegség is fogyaszthatják. Alacsony glikémiás indexük és kalória tartalmuk miatt fogyókúrák számára is ideálisnak bizonyulnak.

A GOS gyártás kiindulási anyaga a laktóz, mely megtalálható az egyik legnagyobb mennyiségben keletkező tejipari melléktermékben, a tejsavóban. A szintézist végző enzim transzgalaktozilálással állítja elő a különböző számú monomerből felépülő galakto-oligoszacharidokat.

Számos különböző konfiguráció ismert GOS előállításra. A három leggyakoribb a szakaszos üzemmódban működő keverős tartály reaktor, a folyamatos működésű enzim membrán reaktor alkalmazása és a rögzített enzim eljárás. Az alkalmazott konfiguráció határozza meg, hogy a termék enzimmentes, vagy tartalmazza a szintézist végző enzimeket/mikroorganizmusokat.

A reaktorban történő GOS szintézis nyomon követése a jelenlegi ipari alkalmazásoknál nem kivitelezhető. A termék összetételéről a gyártó csak megkezdésével, ill. a reakció leállítását követően kaphat információt. A termékben található komponensek meghatározására jelenleg többnyire HPLC analízist alkalmaznak az ipari gyakorlatban. Ez a módszer precíz és megbízható, azonban nagyon lassú és drága.

Szükségessé vált egy online analitikai módszer kifejlesztése, mellyel a reakció valós időben nyomon követhető. Fontos, hogy gyors, olcsó és viszonylag egyszerűen kivitelezhető mérési eljárást találjunk.

Az általam elvégzett kísérletek alapján elmondható, hogy az UV-spektrofotometria a megfelelő adatfeldolgozó algoritmus segítségével alkalmas az enzimmentes minták összetételének gyors determinálására. Nincs szükség a minták hígítására, így egy reaktorba beépített átfolyósos spektrofotométerrel a reakció nyomon követhető.

Az UV-spektrofotométerrel való mérésekhez szükséges GOS-tartalmú minták előállításához egy enzim membrán reaktort használtam, amit különböző (optimális és szuboptimális) működési paraméterek mellett üzemeltettem. Így nagyszámú és szénhidrát összetételt tekintve széles spektrumú mintát kaptam. Adatfeldolgozó módszernek a Parciális Legkisebb Négyzetek (PLS) regresszióját választottam. A minták HPLC analízissel nyert összetételi adatait és az UV-spektrofotométerrel bemért abszorbancia értékeit egyaránt felhasználtam a PLS modell

felépítéséhez. Az általam írt algoritmus így adott minták abszorbania értékei alapján képes becsülni azok szénhidrát-összetételét.

A módszer természetesen nem szolgáltat olyan pontosságú adatokat, mely a HPLC analízis késztermékek minőségellenőrzésében betöltött funkcióját kiváltaná, azonban egy megbízható becslést ad a komponensek valós idejű összetételéről. Alkalmazása lehetővé teszi az ipari GOS előállítás során felmerülő problémák azonnali korrekcióját. Segítségével biztonságos és költséghatékony termelés valósítható meg.

7. További célkitűzések

A későbbiekben szeretnék még további vizsgálatokat folytatni az általam kidolgozott módszer tökéletesítésére. Terveim között szerepel olyan kísérletek elvégzése, melyek segítségével tesztelném a módszer robusztusságát. Vizsgálni szeretném, hogy a minták eltérő pH-ja és hőmérséklete mennyiben van befolyással a kapott eredmények pontosságára.

Eddigi kutatásomhoz a PLS regresszió módszerét választottam az adatok feldolgozására. Erre a célra használható még a mesterséges neurális hálók (Artificial Neural Networks – ANN) módszere is. Az abszorbancia és a szénhidrát összetétel közötti összefüggést ezzel a módszerrel is szeretném modellezni. Szeretném felmérni, hogy melyik módszerrel nyerhetőek pontosabb, megbízhatóbb eredmények.

Az általam elvégzett kísérleteknél a termék minden esetben enzimmentes volt. Az ipari előállításnál azonban a gyártók sokszor választanak olyan konfigurációt, melynél az enzimek/mikrobák jelen vannak az egész rendszerben és a termékben is. Vizsgálni szeretném, hogy ezen reakciók nyomon követésére az UV-spektroszkópia mennyiben alkalmas.

8. Irodalomjegyzék

Aaron Gosling, Geoff W. Stevens, Andrew R. Barber, Sandra E. Kentish, Sally L. Gras (2009). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry* 121 (2010) 307–318

Affertsholt-Allen T. 2007. *Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives*. IDF Symposium “Lactose and its Derivatives.” Moscow. Available from: http://lactose.ru/present/1Tage_Affertsholt-Allen.pdf. Accessed Sept 30, 2009.

Aslan, Y., & Tanrıseven, A. (2007). Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce galactooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45, 73–77.

Bhattacharjee, S., Bhattacharjee, C. & Datta, S., 2006. Studies on the fractionation of β -lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chromatography. *Journal of Membrane Science*, pp. 141-150.

Burrington, K. J., (2004.) Functional properties of lactose products. In: *Reference Manual for U.S. Whey and Lactose Products*. Wisconsin: Wisconsin Center for Dairy Research, pp. 85-88.

Chockchaisawasdee, S., Athanasopoulos, V. I., Niranjan, K., & Rastall, R. A. (2005). Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous uf membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(4), 434–443.

E. Elizabeth Tymczyszyn, Esteban Gerbino, Andrés Illanes, Andrea Gómez-Zavaglia (2011). Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Cryobiology* 62 (2011) 123–129

F. Bourdon, M. Lecoœur, P. Odou, C. Vaccher, C. Foulon. (2013). Complementarity of UV-PLS and HPLC for the simultaneous evaluation of antiemetic drugs. *Talanta* 120(2014)274–282

- Felicia M. Willis and Michael J. Felton. (2004). UV detectors. *Today's Chemist at Work*. July 2004
- Galbács, G., Galbács, Z. & Sipos, P., 2008. *Műszeres analitikai kémiai gyakorlatok*. Szeged: JATEPress.
- Geoffrey W. Smithers (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal* 18 (2008) 695– 704
- Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The journal of nutrition*, pp. 1401-1412.
- González-Martinez, C., 2002. Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science & Technology*, pp. 334-340.
- Hervé Abdi. (2007). Partial Least Square Regression PLS-Regression. In: Neil Salkind (Ed.) (2007). *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. Thousand Oaks (CA): Sage.
- Jeong Hea-Seok, Kwon Hyuk-Kon, Jong-Soo Choi. *High-purity galactooligosaccharides and uses thereof*. 2011 aug. 4. US20110189342 A1
- Ken-i&i Iwasaki, Mitsutoshi Nakajimab & Shin-i&i Nakao. (1994). Galacto-oligosaccharide Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using P-Galactosidase. *Process Biochemistry* Vol. 31, No. 1, pp. 69-76,1996
- Leopoldo Martin Huerta, Carlos Vera, Cecilia Guerrero, Lorena Wilson, Andres Illanes. (2010). Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry* 46 (2011) 245–252
- L.M.G. Davis, I. Martínez, J. Walter, R. Hutkins (2010). A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology* 144 (2010) 285–292
- Luis G. Dias, Ana C.A. Veloso, Daniela M. Correia, Orlando Rocha, Duarte Torres, Isabel Rocha Ligia R. Rodrigues, Antonio M. Peres. (2008). UV spectrophotometry method for the monitoring of galacto-oligosaccharides production. *Food Chemistry* 113 (2009) 246–252

- Macfarlane, G. T., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 305–344
- Mahoney, R. R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. *Food Chemistry*, 63(2), 147–154.
- M.H.L. Leiva, M. Guzman (1995). Formation of oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of milk whey permeates. *Process Biochem.* 30 (1995) 757–762.
- Park, H. Y., Kim, H. J., Lee, J. K., Kim, D., & Oh, D. K. (2008). Galactooligosaccharide production by a thermostable beta-galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1553–1558
- Román András (2010). Tejsavó nano- és diaszűrésének vizsgálata. *Budapest: Élelmiszertudományi Doktori Iskola, Doktori (PhD) értekezés*
- Sanz, M. L., Cote, G. L., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2005). Prebiotic properties of alternansucrase maltose-acceptor oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5911–5916.
- Splechtna, B., Petzelbauer, I., Baminger, U., Haltrich, D., Kulbe, K. D., & Nidetzky, B. (2001). Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 434–440.
- Splechtna, B., Nguyen, T.-H., Steinbock, M., Kulbe, K. D., Lorenz, W., & Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using bgalactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4999–5006.
- Splechtna, B., Nguyen, T.-H. , & Haltrich, D. (2007). Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion processes for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides using b-galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6772–6777.

- Splechtna, B., Nguyen, T.-H., Zehetner, R., Lettner, H. P., Lorenz, W., & Haltrich, D. (2007). Process development for the production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using β -galactosidase from *Lactobacillus* sp. *Biotechnology Journal*, 2, 480–485.
- Taniguchi, H. (2005). Carbohydrate active enzymes for the production of oligosaccharides. In C.-T. Hou (Ed.), *Handbook of industrial biocatalysis*. Boca Raton: CRC Press. pp. 20-1–20-23.
- Tapas Palai, Avaneesh K. Singh, Prashant K. Bhattacharya. (2014). Enzyme, β -galactosidase immobilized on membrane surface for galacto-oligosaccharides formation from lactose: Kinetic study with feed flow under recirculation loop. *Biochemical Engineering Journal* 88 (2014) 68–76
- Van den Broek, L. A. M., Hinz, S. W. A., Beldman, G., Vincken, J.-P., & Voragen, A. G. J. (2008). Bifidobacterium carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(1), 146–163
- Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., et al. (1999). Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: A consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition*, 81(2), 121–132.
4. ábra: http://www.statistics4u.com/fundstat_eng/dd_pls.html
5. ábra: http://www.statistics4u.com/fundstat_eng/cc_cross_validation.html