



PANNON EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI TUDOMÁNYOK ÉS ANYAGTUDOMÁNYOK
DOKTORI ISKOLA

PEKTINEK KINYERÉSE ÉS ENZIMES HIDROLÍZISE

DOKTORI (PH. D.) ÉRTEKEZÉS

KISS KATALIN
OKLEVELES KÖRNYEZETMÉRNÖK

Témavezető:
BÉLAFINÉ DR. BAKÓ KATALIN
TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS



PANNON EGYETEM
MŰSZAKI KÉMIAI KUTATÓ INTÉZET

2009

PEKTINEK KINYERÉSE ÉS ENZIMES HIDROLÍZISE

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:
Kiss Katalin

Készült a Pannon Egyetem Vegyészmérnöki Tudományok és Anyagtudományok
Doktori Iskolája/ programja/ alprogramja keretében

Témavezető: Bélafiné Dr. Bakó Katalin

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton % -ot ért el,

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....

(aláírás)

Bíráló neve:) igen /nem

.....

(aláírás)

***Bíráló neve:) igen /nem

.....

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján% - ot ért el.

Veszprém/Keszthely,

.....
a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....
Az EDT elnöke

Kivonat

Pektinek kinyerése és enzimes hidrolízise

A disszertációban a Magyarországon is termesztett bogyós gyümölcsök feldolgozásánál keletkező melléktermékek hasznosítása volt a cél, s ezen belül is a pektin tartalmuk kinyerése, annak jellemzése illetve a feltárt pektin enzimes lebonthatóságának vizsgálata.

A szerző először a pektin feltárhatóságát vizsgálta meg savas, lúgos illetve vizes feltárási módszereket összehasonlítva, majd a különböző forrásokból származó pektin készítményeket jellemezte. A leghatékonyabb feltárási módnak, figyelembe véve a környezetvédelmi és gazdasági szempontokat, a vizes feltárás mutatkozott. A kinyert pektin színezetét a CIE 1986-os szabvány alapján vizsgálta meg a szerző, majd a színezettségért felelős antioxidáns hatású vegyületeket fotometriás analitikai módszerekkel határozta meg, melynek eredményeként megállapította, hogy a pektinkészítmények antioxidáns hatással rendelkeznek. A különböző pektinek észterezettségi fokának megállapításához titrálós ill. FT-IR módszert alkalmazott és arra az eredményre jutott, hogy magas észterezettségi fokú (ÉF > 50%) pektineket állított elő.

A szerző megvizsgálta az új pektinkészítmények enzimes lebonthatóságát *Aspergillus niger*ből származó tisztított poligalakturonáz enzimmal (50 °C, 0,001g/l enzim). Meghatározta a kinetikai állandók (K_m , v_{max} , K_i) értékeit és arra a következtetésre jutott, hogy a reakció során kompetitív termék-inhibíció lép. Az inhibíció visszaszorítása érdekében megvizsgálta a pektinek folyamatos hidrolízisét 0,01 m² felületű sík lap típusú ultraszűrő membránból összeállított termosztált membrán reaktorban. Ily módon a fellépő termék-inhibíciót sikerült visszaszorítani és az enzime vonatkoztatott produktivitást 40,6 százalékkal megnövelni. A fluxus és vele a produktivitás további növelésének érdekében a membrán szekunder oldalán szakaszosan vákuumot alkalmazott, mely során a produktivitási értékek tovább javultak.

Abstract

Extraction and enzymatic hydrolysis of pectin

In this work extraction and characterization (monosaccharide composition, degree of esterification, colour, total phenolic, antocianin and galacturonic acid content) of pectin from press residues of red (*Ribes rubrum*) and black currant (*Ribes nigrum*), raspberry (*Rubus ideaus*) and black berry (*Rubus fruticosus*) were investigated.

Hydrolysis of the new pectin substrates was studied by purified polygalacturonase enzyme from *Aspergillus niger* and strong product inhibition was observed. The reaction kinetic parameters (K_m , v_{max} , K_I) were determined.

To avoid product inhibition thermostated flat sheet membrane bioreactor was used for the experiments, where vacuum was applied in the secondary side to enhance flux. Higher productivity has been achieved for the pectin substrates compared to the traditional shaking flask, batch processes due to the elimination of product inhibition.

Auszug

Gewinnung und enzymatische Hydrolyse von Pektin

In dieser Arbeit wurde die Gewinnung und Charakterisierung (Monosaccharidzusammensetzung, Veresterungsgrad, Farbe, Anthocyane, Phenolverbindungen und Gehalt an Galakturonsäure) von Pektin aus Himbeerentrestern, Brombeerentrestern, roten und schwarzen Johannisbeerentrestern untersucht.

Hydrolyse der neuen Pektinen wurde mit gereinigtem Polygalacturonase aus *Aspergillus niger* studiert und starke Produktinhibition beobachtet. Um die Produktinhibition zu verhindern das Experiment wurde in einem thermostatisierten Flachmembranbioreaktor untersucht. Vakuum wurde in der Sekundärseite des Membranmoduls verwendet um das Flux und die Produktivität zu erhöhen.

TARTALOMJEGYZÉK

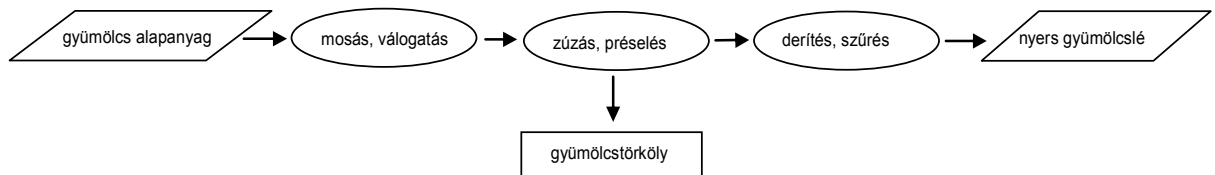
1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ	3
2.1. A pektin	3
2.1.1. Szerkezeti felépítés	3
2.1.2. A pektinek előfordulása	8
2.1.3. A pektin feltárása	10
2.1.4. A pektin gélesedése	13
2.1.5. A pektinek jellemzése	14
2.2. Enzimkinetika	18
2.2.1. Az enzimes reakciók kinetikája.....	18
2.2.2. Enzim inhibíciós kinetika.....	19
2.3. Pektin enzimes lebontása	22
2.3.1. Pektinázok.....	22
2.3.2. A poligalakturonáz	24
2.3.3. A pektináz enzimek ipari alkalmazása	25
2.3.4. A pektináz enzimek kinetikai viselkedése.....	27
2.4. Membrán bioreaktorok alkalmazása	29
2.4.1. Membrán bioreaktorok.....	29
2.4.2. A pektin lebonthatóságának vizsgálata enzim-membrán reaktorban	31
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
3.1 Felhasznált anyagok	33
3.1.1. Enzimek	33
3.1.2. Vegyszerek.....	34
3.2. Mérési módszerek	35
3.2.1. Pektin feltárás.....	35
3.2.2. Enzimes előkezelés és gyümölcsle hozam optimalizálás	36
3.2.3. Pektinkészítmények jellemzése	37
3.2.4. Az enzimes hidrolízis nyomon követése	43
3.2.5. Rázatot lombikos kísérletek	43
3.2.6. Kísérletek membrán reaktorban	44
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	46
4.1. Pektin feltárás	47
4.1.1. Új pektin készítmények előállítás.....	47
4.1.2. Enzimes előkezelés és gyümölcsle hozam optimalizálás	51
4.2. Pektinkészítmények jellemzése	57
4.2.1. A pektin porok, oldatok és gélek szinkordinátáinak értékelése.....	57
4.2.2. Antioxidáns aktivitás, összes fenol és antocianin tartalom	62
4.2.3. Az érzetességi fok meghatározása.....	64
4.3. A pektin enzimes lebonthatóságának vizsgálata	68
4.3.1. A rázatott lombikos kísérletek értékelése.....	68
4.3.2. A termék-inhibíció és a kinetikai paraméterek meghatározása	70

4.4. Pektin enzimes hidrolízisének vizsgálata membrán reaktorban	74
4.4.1 Citrus pektin hidrolízis vizsgálata membrán reaktorban	74
4.4.2 Vákuum alkalmazása pektin membrán reaktorban történő hidrolízise során	76
4.4.2.1. A vákuum hatása a fluxusra	76
4.4.2.2. Folyamatos pektinbontás membrán reaktorban vákuum alkalmazása mellett.....	78
5. ÖSSZEFOGLALÁS	82
6. IRODALOMJEGYZÉK.....	84
TÉZISEK.....	94
THESES.....	96
PUBLIKÁCIÓK ÉS PROCEEDINGEK	98
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	
FÜGGELÉK	

1. Bevezetés

Az egészséges életmód és vele együtt az egészséges élelmiszerek iránti igény nemcsak a világban, hanem Magyarországon is egyre növekszik. Az egészséges táplálkozáshoz a különböző friss gyümölcsök valamint a belőlük készített gyümölcslevek és élelmiszerek fogyasztása mindenképpen hozzátartozik.

A gyümölcslevek gyártása során [1.1.1. ábra] minden esetben keletkeznek mezőgazdasági hulladéknak számító gyümölcs törkölyök, amelyek azonban korántsem értéktelenek, mivel nagy mennyiségben tartalmazhatnak értékes anyagokat, például pektint.



1.1.1. ábra: A gyümölcslé előállítás egyszerűsített folyamatábrája

A pektin régebben víz-visszatartó hatása révén elsősorban, mint megoldandó probléma jelentkezett a gyümölcs- és zöldséglevek gyártásában, hiszen jelentősen megnehezítette a lé kinyerését, megnövelve ezzel az egységnyi termék előállításához szükséges alapanyag- és a feldolgozáskor keletkező melléktermék mennyiségét. Az 1930-as években felfedezték, hogy bizonyos enzimek (pektinázok) felhasználásával a pektin szerkezete megbontható, ezáltal víz-visszatartó hatása megszüntethető, a gyümölcslé kinyerésének határfoka pedig maximalizálható.

Az előbbi bekezdésben kiemelt negatív tulajdonsága mellett azonban a pektin számos kedvező tulajdonsággal is rendelkezik. Mivel könnyen gélt képez és kedvező élettani hatásokkal is rendelkezik, a pektint, valamint az azt felépítő galakturonsavat az élelmiszeripar mellett a gyógyszer- és a kozmetikai ipar is előszeretettel használja egyes termékei adalék- és alapanyagaként.

Ezen ismeretek ellenére Magyarországon mostanáig még nem vizsgálták a lehetőségét, hogy a gyümölcslégyártás során keletkező törkölyökből pektint tárjanak fel és azt, mint új terméket, hasznosítsák. A törköly ily módon történő felhasználásával

azonban a gyümölcslegyártás folyamata egy hulladékhasznosítási lépéssel egészíthető ki, ami a magas pektintartalmú gyümölcsök esetében mindenképpen célszerűnek tűnik.

Kutatómunkám során tehát célul tűztem ki a hazai bogyós gyümölcsök (piros- és fekete ribizli, szeder, málna) feldolgozásánál keletkező gyümölcstörkölyökből pektin előállítását, illetve a kapott pektinek fontos jellemzőinek meghatározását. Tanulmányozni kívántam továbbá a pektinek poligalakturonáz enzimmel történő lebonthatóságát, amelynek eredményeként galakturonsav nyerhető. Az enzimes folyamat kinetikai vizsgálatát követően membrán bioreaktorban terveztem megvalósítani a pektin hidrolízisét.

2. Irodalmi összefoglaló

2.1. A pektin

A pektint először egy francia kémikus, Henri Braconnot izolálta [Wikipedia/pektin 2008] és írta le 1825-ben, habár a tényt, hogy a pektin a lekvárt besűríti, és zselés állagot kölcsönöz neki, már jóval korábban is ismerték. Az első pektint előállító gyárak az 1920-as és 1930-as években alakultak meg főleg olyan területen, ahol almalet is előállítottak

Legismertebb tulajdonsága, hogy vizes oldatban, cukor hozzáadásával gyümölcszselék, gyümölcszések, lekvárok, valamint befőttek besűrítéséhez használható, mivel főzés után a pektin kivonat gélesedést okoz. Számos kereskedelmi forgalomban kapható termékben megtalálható.

A pektint ma már nemcsak az élelmiszeriparban alkalmazzák. Előfordulhat kozmetikumokban [Leroux et al. 2003], mint stabilizáló és emulgeáló anyag, valamint a gyógyszeripar is előszeretettel használja [Voragen et al. 1995] koleszterinszintcsökkentő [Ginter et al. 1979], nehézfém megkötő [Kumer et al. 2008], bélműködést szabályozó [Wilson et al. 1974] képessége miatt.

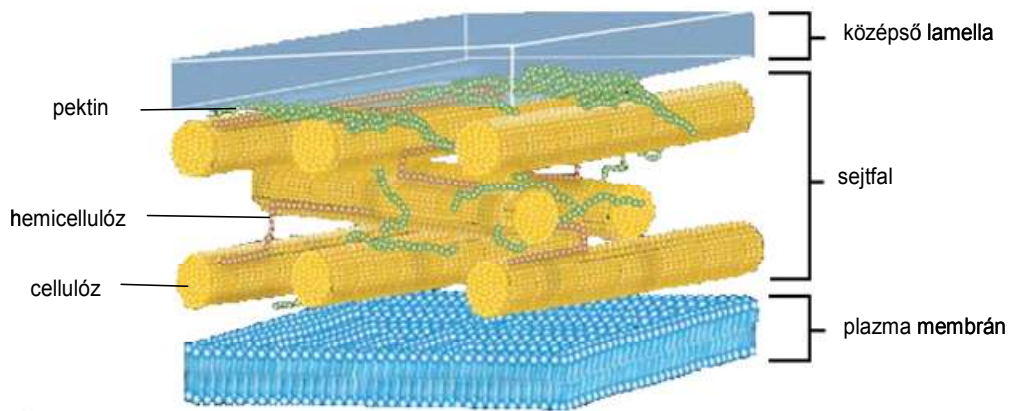
A különböző forrásokból származó pektinek kinyerése, feltárása, jellemzőik meghatározása manapság igen aktívan kutatott tématerület, nagy európai projektek [Maxfun, 2002], illetve tematikus nemzetközi konferenciák [Pectins and Pectinases 1995,2001] jelzik fontosságát, aktualitását.

2.1.1. Szerkezeti felépítés

A pektin szinte minden növényi sejt falban megtalálható (2.1.1. ábra). Átlagos molekulatömege nagyon széles határok között mozog: 10-360 000 g/mol [Fogarty et al, 1983]. Feladata, hogy más sejtalkotókkal (cellulóz, hemicellulóz) kötéseket hozzon létre, és így növelje a sejt mechanikai szilárdságát és rugalmasságát [McCann et al. 1991].

A pektin szó – általános értelemben – többfajta poliszacharid gyűjtőneve, régebben félreértéseket is okozott használata. Az Amerikai Kémikusok Szövetsége (American Chemical Society) egy bizottsága 1944-ben fogadta el a pektinekre vonatkozó standardizált nomenklaturát [Nelson et al. 1977]. Eszerint a pektinszerű anyagok („pectic substances”) a komplex, kolloid szénhidrátok csoportját alkotják,

amelyek növényekben fordulnak elő és belőlük nyerhető ki, valamint láncszerűen összekapcsolódott galakturonsav molekulákat tartalmaznak.

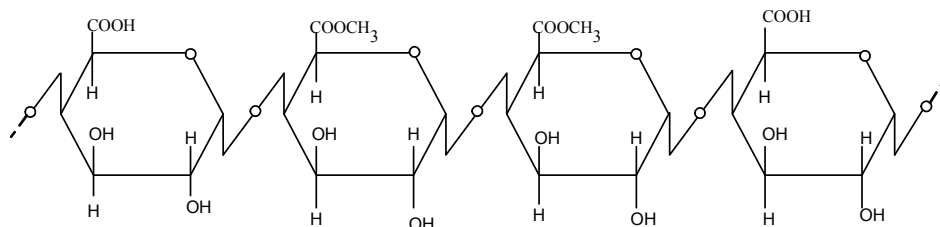


2.1.1. ábra: A növényi sejtfal [Sigmaaldrich/Cellwall 2008]

A pektin valójában tehát heterogén poliszacharid, nem egy meghatározott monomerből felépülő homogén polimer. Szerkezetét tekintve három különböző alcsoportot különböztethetünk meg:

- Homogalakturonát (2.1.2. ábra) (HGA):

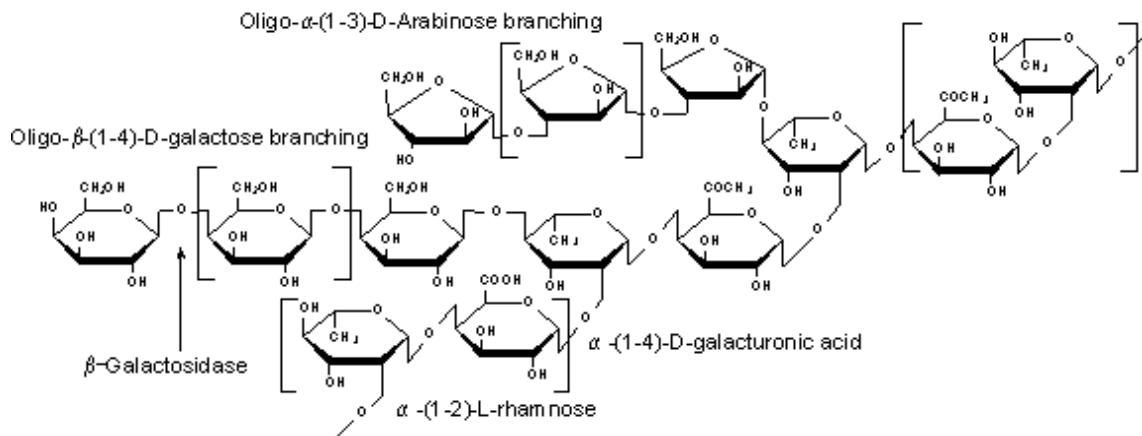
Egy α -1,4 kötéssel egymáshoz kapcsolódó, D-galakturonsav monomerekből felépülő lineáris polimer [Quemener et al. 2003].



2.1.2. ábra: A homogalakturonát szerkezete

- Ramnogalakturonát I (RGI):

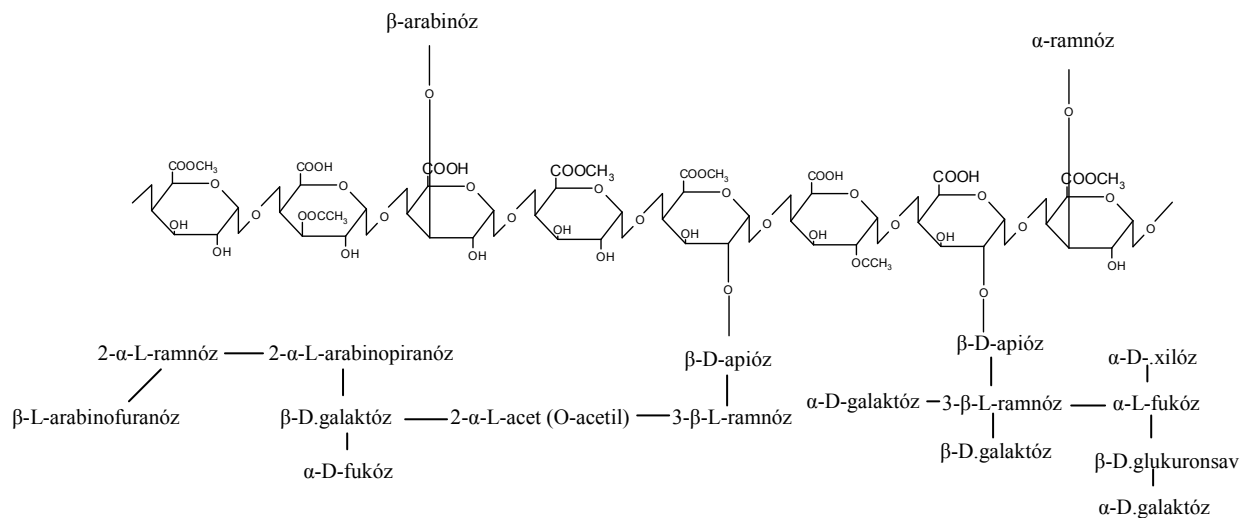
A poliszacharid vázát ramnóz és galakturonsav egységek váltakozva építik fel (2.1.3. ábra), és ehhez más, töltéssel nem rendelkező monoszacharid komponensek (α -(1-5)-L-arabinóz és a β -(1-4)-D-galaktóz) kapcsolódnak [Schols et al. 1994].



2.1.3. ábra: Ramno-galakturonát I szerkezeti felépítése [Sigmaaldrich 2008]

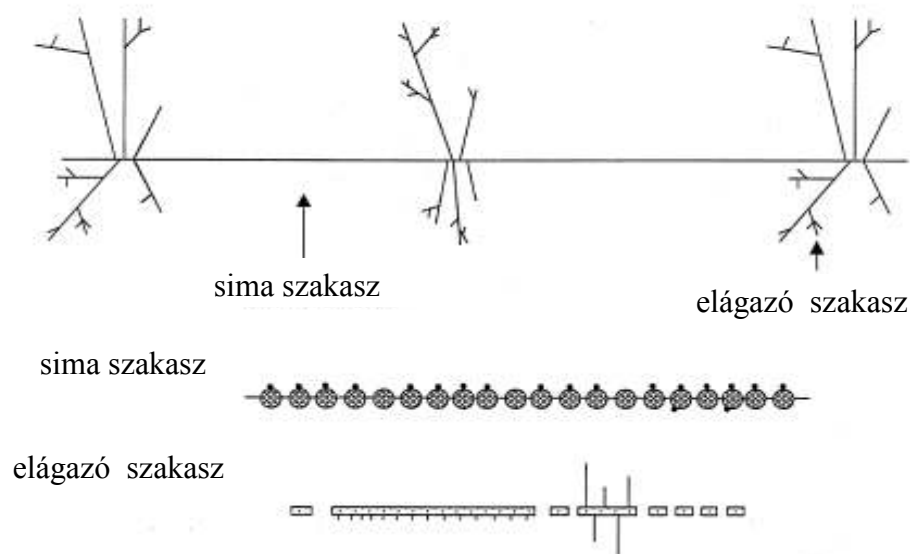
o Ramnogalakturonát II (RGII):

Igen bonyolult felépítésű molekula (2.1.4. ábra). A fő vázat 8-10 galakturonsav egység alkotja, amelyhez 12 különbözőfajta cukor, 20 különböző típusú kötéssel kapcsolódhat [Kobayashi et al. 1996].



2.1.4. ábra: Ramno-galakturonát II szerkezeti felépítése [Sigmaaldrich 2008]

A pektin láncon belül is megkülönböztethetünk úgynevezett sima („smooth”) területeket, ahol főként homogalakturonát található, illetve elágazó („hairy”) részeket is, ahol főként ramnogalakturonát egységeket figyelhetünk meg (2.1.5. ábra).



2.1.5. ábra: A pektin lánc felépítése (Voragen et al. 1995)

A pektin vegyületekben található galakturonsav előfordulhat szabad sav formájában, metanollal észterezett formában, kationnal (Na^+ , K^+ , NH_4^+) alkotott sóként, továbbá tartalmazhat acetil-csoportokat is. Az acetil-csoportok a galakturonsav hidroxil-csoportjaihoz kapcsolódnak észterkötéssel, s jelenlétük jelentősen befolyásolja a pektinek gélesedési tulajdonságait. Az egyes forrásokból származó pektinek acetil tartalmát a 2.1.1 táblázat mutatja [McComb et al. 1957].

2.1.1. táblázat: Néhány pektin acetil csoport tartalma:

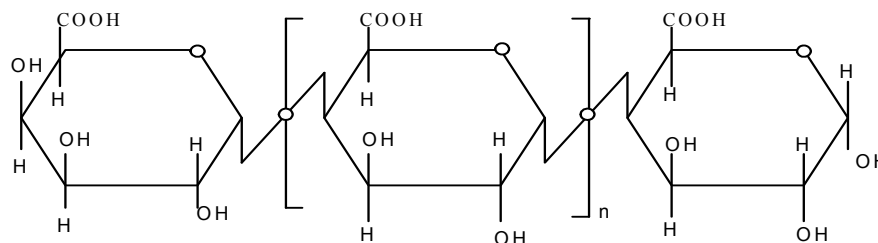
Pektin forrás	Acetil csoport [%]
Málna	0.25
Citrus	0.23
Cseresznye	0.18
Sárgabarack	1.36
Eper	1.47
Cukorrépa	2.5

Az, hogy a galakturonsav milyen formában van jelen, nagymértékben függ a pH-tól, és igen fontos jellemző a pektin lebontását katalizáló enzimek számára [Schols et al. 1994].

A pektineket más szempont alapján is csoportosíthatjuk:

A protopektin a pektin vegyületek kiindulási anyaga, részleges hidrolízisével pektin és pektin sav (pectic acid) nyerhető. A protopektin néha egy szakkifejezést takar, még hozzá azt a vízoldhatatlan pektin vegyületet, ami a növényi szövetekben található, és amelyből az oldható pektin vegyületeket állítják elő [Kilara et al. 1982, Pifferi et al. 1989].

A pektines sav (pectinic acid) olyan galakturonsav egységekből áll (2.1.6. ábra), amelyek elhanyagolható mennyiségben tartalmaznak metoxi csoportokat (metanollal észterezettek). A pektátok a pektines savak kationnal alkotott semleges vagy savasan hidrolizáló sói [Kashyap et al. 2001, Kilara et al.].

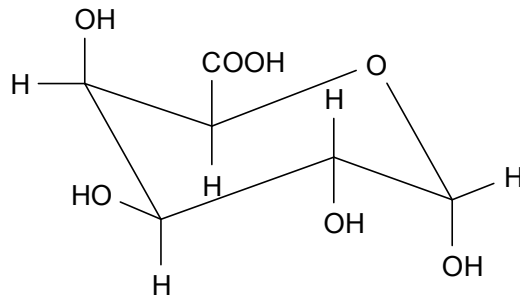


2.1.6. ábra: A pektines sav felépítése

A pektin sav olyan galakturonsav egységekből épül fel, amelyek különböző mennyiségben tartalmaznak metoxi csoportokat. A pektin sav semleges vagy savas karakterű sóit nevezik pektinátoknak. A pektin savak egyedülálló tulajdonsága, hogy gélt képeznek cukor és sav komponensekkel, vagy kellően alacsony metil tartalom mellett más vegyületekkel, mint pl. a Ca-sók [Kashyap et al. 2001, Kilara et al. 1982]. Erről egy későbbi fejezetben részletesebben is szó lesz.

A galakturonsav:

A pektin egyik fő monomerje a D-galakturonsav (2.1.7. ábra). Fontos nyersanyag a gyógyszer és kozmetikai ipar számára [Jörning et al. 2002]. Felhasználható például C-vitamin alapanyagként, vagy különböző zsírsavakkal észterezett formában, mint felületaktív ágens. Emellett még az élelmiszeriparban is alkalmazzák, pl. csökkentett kalóriájú szénhidrát (L-galaktóz) vagy élelmiszeripari savanyítószer (L-galakton-1,4-lakton; L-galakton-sav) előállítására [Pilnik et al. 1982].



2.1.7. ábra: A galakturonsav szerkezeti képlete

2.1.2 A pektinek előfordulása

A pektin mennyisége és kémiai szerkezet a különböző növényekben, a növény egyes részeiben valamint a növény életkorának változása során más és más. Az érés folyamán a pektin a növényben lévő különböző pektinázok és pektinészterázok közreműködésével töredezetté válik, így a növényi szövet puha lesz, a sejtek elkülönülnek egymástól.

A 2.1.2 táblázatban foglaltam össze az egyes növények pektintartalmára vonatkozó szakirodalmi adatokat. Látható, hogy az egyes növények pektintartalma igen nagy különbséget mutat, másrészt az egy növényfajtára megadott adatok is jelentős szórást mutatnak.

Manapság megkülönböztetett figyelemmel fordulnak egyes kutatócsoportok [International Berry Health Benefits Symposium 2007] a bogyós gyümölcsök (szeder, fekete ribizli, bodza) felé, amelyek beltartalmi, táplálkozási értékei egyre inkább felértékelődnek. Magas vitamintartalmuk antioxidáns hatású színezékeik, pigmentjeik (anticianinok, polifenolvegyületek... stb.) és nem utolsósorban pektintartalmuk igen előkelő helyezést biztosít számukra az egészséget védő táplálékok listáján.

2.1.2. táblázat: Különböző növények pektintartalma:

Növény	Összes pektin tartalom (%)	
Alma	4,00-7,00**	<i>Neukom 1967</i>
Alma törköly	15,00-20,00**	<i>Neukom 1967</i>
Avokádó levél	4,30-16,20**	<i>Haas et al. 1936</i>
Banán	0,70-1,20*	<i>Jayani et al. 2005</i>
Borsó	0,90-1,40*	<i>Jayani et al. 2005</i>
Burgonya	2,50 **	<i>Neukom 1967</i>
Citrus héj (albedo)	30,00-35,00**	<i>Neukom 1967</i>
Cukorrépa préselt szelet	15,00-20,00**	<i>Neukom 1967</i>
Eper	0,6-0,73*	<i>Lampitt et al. 1928</i>
Fekete ribizli	1,37-1,79*	<i>Lampitt et al. 1928</i>
Málna	0,58-0,86*	<i>Lampitt et al. 1928</i>
Napraforgóvirág (mag nélkül)	25,00**	<i>Neukom 1967</i>
Narancs (albedo)	27,50**	<i>Gaddum et al. 1934</i>
Narancs (lé és mag nélkül)	4,17*	<i>Money et al. 1950</i>
Narancs (rost)	27,6**	<i>Gaddum et al. 1934</i>
Őszibarack	0,66-0,77*	<i>Conrad 1926</i>
Paradicsom	3,00**	<i>Neukom 1967</i>
Piros ribizli	0,91-1,50*	<i>Lampitt et al. 1928</i>
Kajszibarack	1,03*	<i>Lampitt et al. 1928</i>
Sárgarépa	10,00**	<i>Neukom 1967</i>
	2,92*	<i>Buston et al. 1931</i>
Szeder	0,68-1,19*	<i>Lampitt et al. 1928</i>
Torma	15,00**	<i>Neukom 1967</i>
Tök	2,70-3,30**	<i>Bennett 1944</i>

*Friss gyümölcs tömegére vonatkoztatva; **Gyümölcs száraz anyagra vonatkoztatva

2.1.3. A pektin feltárása

A pektin a növényi sejtfalban kötött állapotban található meg, és csak speciális módszerrel nyerhető ki.

A kereskedelemben kapható pektineket elsősorban citrusfélék héjából, almatörkölyből [May et al. 1990] állítják elő. Pektin forrásként azonban számos más, magasabb pektin tartalmú növény is szóba jöhet.

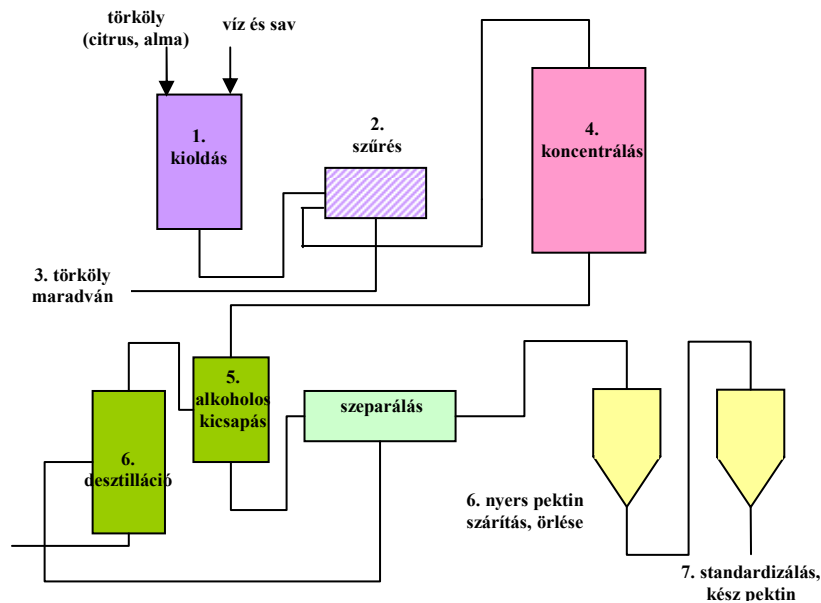
E munka során elsősorban a pektin tartalmú gyümölcsök feldolgozása során melléktermékként keletkező törkölyökből történő pektin kinyerés tanulmányozása a cél, így elsősorban az ehhez kapcsolódó feltérési eljárásokra vonatkozó szakirodalmakat tekintettem át.

Az 1950-es években fejlesztették ki a következő módszert. A gyümölcsöt zúzás után hosszú időn keresztül főzték intenzív keverés mellett, hogy a pektin a folyadék fázisba kerüljön, majd a kapott pépet szűrték, hogy szétválasszák a két fázist. A folyadék fázisban, azaz a szűrletben oldott pektint etil-alkohol hozzáadásával csapták ki. Az így nyert kristályos anyagot hosszú időn keresztül szárították, hogy a maradék víz- és alkohol tartalom eltávozzon belőle [Kertész, 1951].

A pektin kinyerés hatásfokát igen nehézkes mérni, mivel – a 2.1.1. fejezetben idézett definíció értelmében – maga a pektin sem egyértelműen meghatározható vegyület. Az egyes növények hozzátevéleges pektin tartalma az irodalomból általában ismert, de ezek az értékek fajtánként és évszázatonként függően is változnak.

A pektin kinyerése, izolálása során – az irodalmi leírások alapján – tulajdonképpen az alapanyagból forró vizes extrakcióval kinyerhető komponensek közül az alkoholból kicsapható, alkoholban nem oldható vegyület csoportot (alcohol insoluble solids, AIS [Emaga et al. 2008]) szokták elfogadni pektinszerű anyagként. Ennek jellemzésére a galakturonsav (monomer) tartalmat szokták meghatározni, illetve e mellett jelenlevő többi szénhidrát monomerek koncentrációját. Mivel azonban a galakturonsav tartalom a különböző pektinforrásoknál eltérő lehet, így a pektin kinyerési hatásfokot nagyon nehéz egzakt módon megadni.

Az iparban manapság a legelterjedtebb eljárás a híg, savas extrakcióval történő feltérás (2.1.8. ábra).



2.1.8. ábra: Az ipari pektin gyártás sematikus rajza (Obipektin 2008, Herbstreith&Fox 2008)

Az első lépés a növényi sejtfalban található oldhatatlan protopektin híg-savas extrakciója, amit egy tisztítási lépés követ. Ez általában centrifugálás, szűrés beiktatását jelenti, hogy az oldhatatlan komponenseket eltávolítsák az extraktumból. A megmaradt pektinmentes törkölyt szárítják, és pogácsákat készítenek belőle, amit később takarmányozásra lehet felhasználni. A pektint tartalmazó oldatot koncentrálnak, majd az alkoholos kicsapás következik. A kicsapásnál használt alkoholt desztillálás után újra felhasználják. Az alkoholos pektin csapadékot összepréselik, szárítják és őrlik. Az utolsó lépés az előállítási sorban a pektin standardizálása. Ennek oka, hogy a pektin tulajdonságát erősen befolyásolja a gyümölcs fajtája és annak érettségi foka. A különböző tételből származó pektineket összekeverik, vagy pedig cukrot adnak hozzá, hogy mindig azonos minőségű pektin kerüljön a kereskedelmi forgalomba [Seymour et al. 2002].

Az előbb említett két feltárás sokban hasonlít egymásra, azonban az irodalomban más, továbbfejlesztett megoldással is találkozhatunk. E kutatások célja legtöbbször a feltárási határfok és a kapott termék mennyiségének növelése.

Alternatívát jelent többek között a különböző savakkal [Yapo et al. 2007] és lúgokkal való feltárás, valamint a mikrohullámmal [Wang et al. 2007] illetve enzimmel [Ptichkina et al. 2008] támogatott kezelés egyaránt.

Savas extrakciót alkalmaztak a pektin kinyerésére őszibarack törkölyből [Faravash et al. 2007], banánhéjból [Emaga et al. 2008], további trópusi gyümölcsökből

és melléktermékekből (pl. passió gyümölcshéj [Pinheiro et al. 2007], ambarella héj [Koubala et al. 2008], egyéb trópusi gyümölcsök [Simpson et al. 2007]).

Az adott módszer hatékonysága és a kapott pektin szerkezeti felépítése (molekulaméret, észterezettségi fok, stb.) nagyban függ a feltárási körülményektől. Ezt legegyszerűbben egy példán keresztül lehet szemléltetni. Cukorrépa pektint savas feltárással [Yapo et al. 2007] állítottak elő. Az extrakciónál eltérő volt a savasság erőssége (pH=1,5 és 2) illetve a feltárási ideje (1 ill. 4 óra). Ezekről a paraméterektől függően a kapott pektinek molekulamérete a következő határok között mozgott: 20200-90100 g/mol. Kiseb molekulatömegű pektint nyertek abban az esetben, ha a savasság erősebb volt, illetve a feltárási ideje hosszabb.

Az erőteljes reakciókörülmények [Yapo et al. 2007]: a magas hőmérséklet és alacsony pH, szintén hatással van a kapott pektin minőségére. Minél szélsőségesebb körülmények mellett történik a feltárási, annál kevesebb metoxi és acetát csoport fog kapcsolódni a pektin molekulához, mivel a pektin molekula részleges hidrolízist szenved a feltárási művelet alatt.

A savas feltárási egyik nagy hátránya, hogy a feltárási lépésbe egy költséges semlegesítést kell beiktatni, valamint környezetvédelmi szempontból sem előnyös savak használata az eljárásban. Ezen okokból kiindulva számos világszerte ismert pektin gyártó cég támogat kutatásokat környezetbarát biotechnológiai módszer kidolgozására. Egyik ilyen vizsgálat során sütőtökből nyertek ki pektint [Ptichkina et al. 2008] *Aspergillus awamori*-ból származó komplex enzimmészítmény felhasználásával. Ez az enzimmészítmény túlnyomórészt celluláz aktivitással rendelkezett, de emellett xilanáz, β -glükózidáz, endogalakturonáz és pektinészteráz aktivitást is mutatott. A feltárási 3 óra hosszan történt 5-ös pH mellett 45 °C hőmérsékleten. A savas feltáráshoz képest (7 %-os hozam a száraz törköly tömegére vonatkoztatva) a hozam nagysága a kétszeresére nőtt. Szükséges megjegyezni azonban, hogy a feltárási időtartamának növelésével csökken a kinyert pektin észterezettségi foka a kötött állapothoz képest, amely egyértelműen a pektinészteráz aktivitásnak köszönhető.

A szakirodalomban számos zöldség és gyümölcs felmerül, mint pektinforrás, azonban a bogyós gyümölcsök (piros és fekete ribizli, málna, szeder) feldolgozásánál keletkező törkölyre eddig még nem találtam utalást. Ezek a gyümölcsfélék a citrusfélékkel ellentétben Magyarországon jól termesztettek és így a gyümölcslégyártást egy hulladék felhasználási lépéssel kombinálhatjuk.

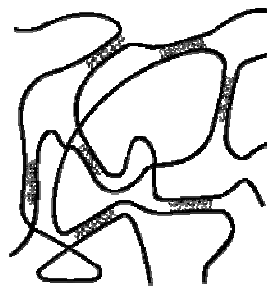
2.1.4. A pektin gélesedése

A pektinnel leggyakrabban zselésítő tulajdonsága miatt találkozunk, és talán ez is a legismertebb tulajdonsága. A gélek általános megfogalmazás szerint [Pharmtech 2008] alaktartó, könnyen deformálható, folyadékban gazdag diszperz rendszerek, amelyek egy kolloid eloszlású fonal alakú erősen elágazó vagy lapszerű részecskékből felépülő szilárd anyagból (diszperz fázis) és valamilyen folyadékból (diszperziós közeg) állnak. Gél állapotban a kolloid részecskék szabad mozgási lehetőségüket elveszítik, és a folyadék kémiai, lioszorpciós, vagy mechanikus megkötése közben hálós vagy sejtes vázakká merevednek.

A pektin zselésítési mechanizmusa [Losonczy et al. 2003] meglehetősen összetett folyamat, mivel azt jelentősen befolyásolja az adott pektin felépítése, szerkezete.

Az alacsony észterezettségi fokú (ÉF <50 %) pektin kalcium ion (Ca^{2+}) jelenlétében keresztkötést alakít ki, mivel a galakturonsav savcsoportja (COO^-) és a pozitív töltésű kalcium ion között elektrosztatikus vonzás jön létre. Az észter csoportok és a poliszacharid oldalláncok azonban gátolják a kötés kialakulását és ezzel együtt a zselésedést.

Savas gélről (pH = 2,0 - 3,5) akkor beszélünk, amikor a nagy észterezettségi fokú (ÉF >50 %) galakturonsav egységekből felépülő pektin láncok között hidrogénkötések, illetve a metilcsoportok között diszperziós kötések jönnek létre (2.1.9. ábra). Ezek a kötések úgy alakulhatnak ki, ha a vizet a jelen lévő cukrok megkötik, és ez által a pektin szálak összetapadni kényszerülnek. Háromdimenziós molekulaszervezet alakul ki, amit más néven makromolekuláris gélnak is neveznek. Az így kialakult zselének a neve: alacsony víztartalmú aktív gél vagy cukor-sav-pektin gél. Ehhez a fajta gélesedési folyamathoz elengedhetetlen, hogy a cukor minimum 55 tömegszázalékban legyen jelen az oldatban.



2.1.9. ábra: A pektin gél felépítése [Cpkelco 2008]

2.1.5. A pektinek jellemzése

A legjellegzetesebb tulajdonsága a metilészterezettségi fok. A színes gyümölcsökből nyerhető pektinek másik fontos tulajdonsága a szín megjelenése. E két fontos paraméter leírását, mérési lehetőségeit részletezem az alábbiakban.

Észterezettségi fok meghatározás

Amint az előző fejezetben is láthattuk a pektin észterezettségi fokának ismerete igen hasznos és fontos, ha zselésítő, stabilizáló tulajdonsága miatt szeretnék a későbbiekben felhasználni. A pektinek észterezettségi fokának meghatározására számos analitikai módszer áll rendelkezésünkre.

Titrációs módszer

Az észterezettségi fok, azon belül a metilészterezettségi fok meghatározásának egyik legrégebbi és legelterjedtebb módszere a titrálás [Food Chemical Codex, 1981, Singthong et al. 2004]. A meghatározás menete a következő lépésekből áll. A pektin oldatot nátrium-hidroxiddal titráljuk a pektin elszappanosítása előtt illetve után. Az első végpontnál mért lúg fogyás a nem észterezett karboxil csoportok számával, míg a második fogyás adat a teljes karboxil csoport számmal lesz arányos. A módszer hátránya, hogy az acetyl csoportok jelenléte megnöveli a lúg fogyást és így hibás eredményre juthatunk, illetve a vizsgálat elvégzéséhez viszonylag nagy mennyiségű pektinre van szükség.

A módszer előnye, hogy egyszerűen kivitelezhető, nem igényel bonyolult műszeres felszereltséget.

Enzimes meghatározás

A metilészterezettségi fok meghatározásának egy másik lehetséges módszere, ha speciális enzimmel, pektin-észterázal lehasítjuk a metilcsoportot és a képződött metanol mennyiségét mérjük, például gázkromatográf segítségével [Walter et al. 1983]. E módszer nagy hátránya, hogy igen költségigényes, ugyanis az alkalmazott enzim meglehetősen drága [Sigmaaldrich/pektinészteráz 2008].

Kromatográfiai módszerek

Folyadékromatográfiai módszerrel lehetőség van az acetyl- és metilészter tartalom párhuzamos meghatározására.

Voragen és munkatársai (1986) ioncserélő gyanta oszlopon végezték az elválasztást, ahol a pektin megfelelő előkezelése (elszappanosítás, kicsapás izopropanollal) után meg tudták határozni a metanol és ecetsav tartalmát. A módszer hátránya, hogy viszonylag nagy mennyiségű mintára (40 mg/ analízis) van szükség, valamint kivitelezési gondok is adódtak a mérések során. Az ioncserélő gyanta oszlopot C18-as oszloppal való helyettesítéssel más kutatóknak [Levigne et al. 2002] sikerült az analízishez szükséges minta mennyiségének (5 mg) a csökkentése.

A head-space GC a pektin metilészter tartalmának egyik gyors és megbízható módszere [Huisman et al. 2004]. Szintén szükséges a minták előkezelése. Az előkezelt mintákat az 50 °C hőmérsékletűre fűtött head-space mintaadagolón keresztül injektálták az adott oszlopra. A módszer előnye még, hogy kis mennyiségű minta szükséges (2 mg/ analízis), hátránya hogy az ecetsav tartalom egyidejűleg nem határozható meg.

Infravörös spektroszkópia (FT-IR):

Az IR spektrum egyedileg azonosít egy molekulát, illetve a csoportfrekvenciákon keresztül a molekula szerkezeti felépítéséről is nyerhetünk információt. Az anyag és infravörös sugárzás kölcsönhatása következtében a molekulák rezgési és forgási viszonyai megváltoznak. Az analitikai mérések az úgynevezett közepes infravörös, a 4000- 400 cm^{-1} hullámszámú tartományba esnek. A molekulát felépítő különböző funkciós csoportok, Pl: C=O, C-H, O-H, meghatározására a 3600-1200 cm^{-1} hullámszámú tartomány alkalmas. Az ujjlenyomat tartományban (1200- 600 cm^{-1}) a hasonló energiájú egyes kötések abszorbeálódnak, a szomszédos kötések között erős kölcsönhatások lépnek fel. Összetett sávok jelennek meg, amelyek a molekula teljes vázszerkezetére lesznek jellemzőek [Kristóf, 2000].

A közepes hullámhosszúságú infravörös spektroszkópia gyors, gyakran alkalmazott és érzékeny eszköz a szénhidrátok szerkezetének, fizikai tulajdonságaik és kölcsönhatásaik megismerésére. A szénhidrátok nagy elnyelést mutatnak az 1200-950 cm^{-1} –es tartományban, ahol a kötések helye és intenzitása az egyes poliszacharidoknál más és más [Kačuráková et al. 2001, Filippov 1992].

Ezt az analitikai módszert már sikeresen alkalmazták a sejtfalból feltárt pektin és hemicellulóz [Coimbra et al. 1998] illetve a keményítő [Galat 1980] szerkezeti

vizsgálatára, valamint a különböző típusú karragén [Chopin et al. 1993] frakciók pontos meghatározására, elkülönítésére.

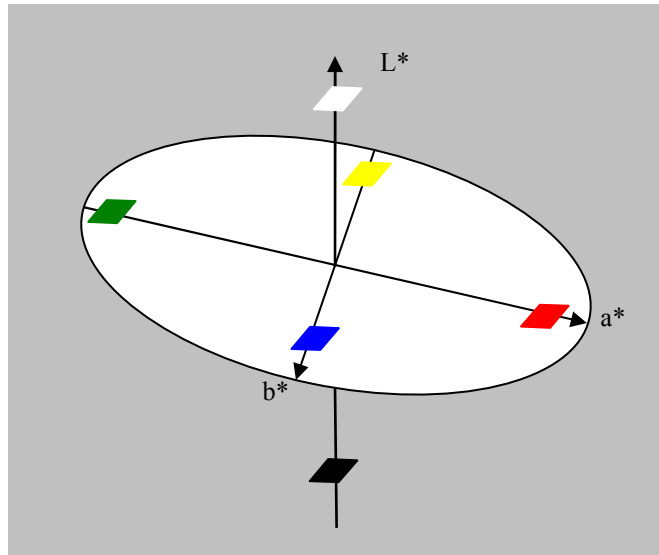
A különböző pektinek észterezettségi fokának FT-IR spektroszkópiával történő meghatározását több kutatócsoport is vizsgálta. A vizsgálatok egyik célja volt a titrálással és az FT-IR spektroszkópiával nyert eredmények összehasonlítása [Gnanasambanbam et al. 2000, Singthong et al. 2004]. Ehhez a vizsgálathoz részben ismert észterezettségi fokú, kereskedelemben könnyen beszerezhető pektineket illetve saját pektinek használtak fel. Egyik esetben sem tapasztaltak lényeges eltérést a két különböző módszerrel kapott eredmények között.

A vizsgálataimban az előállított új kereskedelmi forgalomban nem beszerezhető pektinek észterezettségi fokának a meghatározására tettem a hangsúlyt, mivel ez ad információt az adott pektin gélesedési viselkedéséről. A meghatározásnál a titrálásos és infravörös spektroszkópiai módszereket részesítettem előnyben.

Színmérés

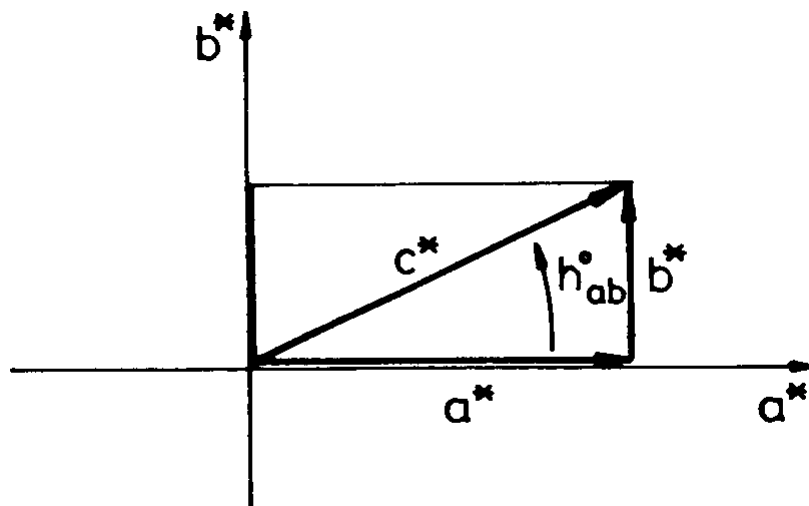
A CIE (Commission Internationale de la Éclairgie) 1986-os szabványa szerint a színek kvantitatív leírására egy virtuális tér / koordináta-rendszer alkalmazható (2.1.10 ábra), ahol az egyes színeket azok koordinátái fejezik ki [Voss, 1992]. Az L^* a CIE rendszerben a világossági tényező, az a^* a vörös-zöld, b^* pedig a kék-sárga színezetre jellemző. A rendszer úgy képzelhető el, mint két, egybevágó, talpával összeillesztett kúp a térben, az alsó csúcsa a fekete pont ($L^*=0$), a legszélesebb része az a^* , vagy b^* értékkel jellemezhető telített színeket tartalmazza, majd felfelé újra keskenyedik, és csúcsa a fehér pont ($L^*=100$).

Az előjelek: $+a^*$ piros $-a^*$ zöld $+b^*$ sárga $-b^*$ kék



2.1.10. ábra: A CIELAB színingertér ábrázolása

A CIELAB színingertér a színezet jellemzésére tehát vektorformájú mennyiségeket használ. A CIELAB a króma értékét az a^* , b^* síkban értelmezi (2.1.11. ábra), amely a vektor abszolút értéke, tulajdonképpen a színtelítettségi jellemző [Voss, 1992]. Számítása: $C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$. A h -val jelölt (az angol „hue” – színárnyalat – szóból) színezeti szögét úgy kapjuk, ha egy vektort az a^* tengely irányától a C_{ab} vektorig forgatunk, tehát értéke 0° -tól 360° -ig terjedhet. Számítása: a $h_{ab} = \arctg b^*/a^*$ összefüggéssel történik. A színezeti szög értékeinek megfelelő színek: vörös-lila 0° , sárga 90° , kékeszöld 180° és kék 270° [McGuire, 1992].



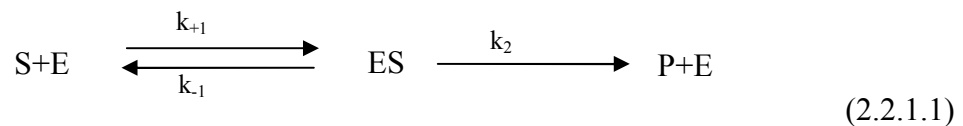
2.1.11. ábra: A C^* króma és a h_{ab} színezeti szög értelmezése

2.2. Enzimkinetika

A pektinek lebontása végtermékként galakturonsavat eredményez. A hidrolízis enzimmel is végezhető, az enzimes folyamat tanulmányozásához pedig szükséges a reakció kinetikai hátterének ismertetése.

2.2.1. Az enzimes reakciók kinetikája

Az enzimreakciók kinetikáját [Dixon, 1964] először 1913-ban Leonor Michaelis és Maud Menten értelmezte. A Michaelis-Menten modell szerint az enzim (E) egy intermedier komplexet (ES) képez a szubsztráttal (S). Ez az intermedier alakul át később terméké (P = product), miközben az enzim regenerálódik, az alábbi séma szerint:



A modell reakciónál tehát az első lépés reverzibilis, a második pedig irreverzibilis (a k_{-2} elhanyagolható). Feltételezzük, hogy a szubsztrát koncentrációja (S) sokkal nagyobb, mint az enzimé, továbbá, hogy a rendszerben az enzim koncentrációja állandó:

$$(E_t) = (E) + (ES) \quad (2.2.1.2)$$

ahol (E_t) = a teljes enzimkoncentráció

(E) = szabad állapotban lévő enzimkoncentráció

(ES) = az enzim-szubsztrát komplexben lévő enzimkoncentráció

A sztöchiometriai egyenletre felírhatjuk a koncentrációk időbeli változását:

$$\frac{d(P)}{dt} = k_2(ES) \quad (2.2.1.3)$$

E szerint a termékképződés időbeli változása arányos az enzim-szubsztrát komplex koncentrációjával.

A fenti összefüggésből kiindulva kaphatjuk meg az enzim-reakciók kinetikáját leíró alapegyenletet:

$$v = \frac{k_2(E_t)(S)}{K_m + (S)} \quad (2.2.1.4)$$

ahol a reakciósebesség (v) és a szubsztrát koncentráció, a kinetikai konstansok (K_m , Michaelis-Menten állandó) valamint a teljes enzim koncentráció kapcsolata látható.

A (2.2.1.4) egyenletnél feltételezhetjük, hogy $(S) \gg K_m$. Ekkor a nevezőben lévő K_m elhanyagolásakor a következő egyenlethez jutunk:

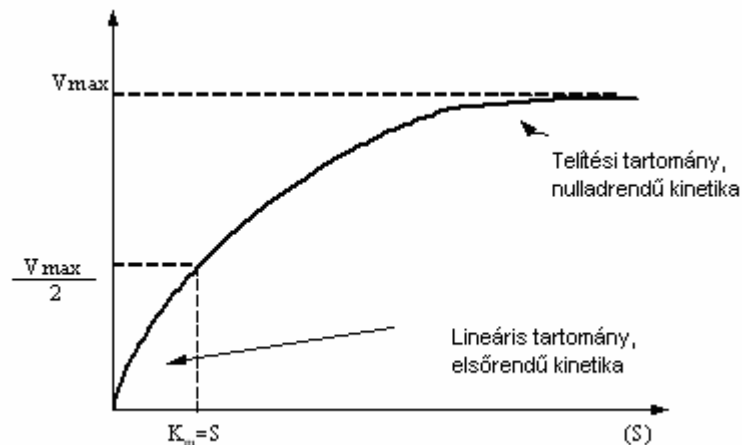
$$v = k_2(E) = v_{\max} \quad (2.2.1.5)$$

vagyis nagy szubsztrát koncentráció esetén az enzim teljes mennyisége (ES) komplexben található, így a reakciósebesség maximális, és a rendszer nulladrendű kinetikával jellemezhető.

A (2.2.1.4) egyenlet ennek megfelelően a következő formára hozható:

$$v = \frac{v_{\max}(S)}{K_m + (S)} \quad (2.2.1.6)$$

Ez a Michaelis-Menten egyenlet közismert formája, amelyet diagram formájában a 2.2.1. ábra mutat, s amely tulajdonképpen egy derékszögű hiperbola egyenlete.



2.2.1. ábra: Enzimreakció sebességének függése a szubsztrát koncentrációjától

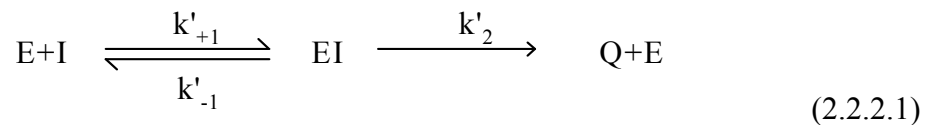
2.2.2. Enzim inhibíciós kinetika

Az enzimek által megvalósított katalízist különböző kémiai hatóanyagok, többek között a reakció során keletkezett termék, valamint a szubsztrát is befolyásolhatják.

Azokat az anyagokat, amelyek gátolják az enzimek aktivitását inhibitoroknak (I) nevezzük.

Az enzimgátlásnak (inhibíció) két fő fajtáját különböztetjük meg:

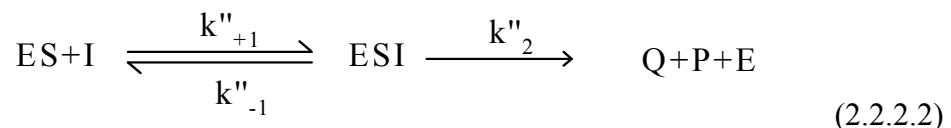
Kompetitív inhibíció akkor jön létre, ha az inhibitor kémiai felépítése hasonlít a szubsztrát szerkezetéhez. A hasonló kémiai szerkezet következtében az enzim nem a szubsztráttal, hanem az inhibitorral képez komplexet, aminek következtében sem az enzim-szubsztrát komplex, sem pedig a kívánt termék nem tud kialakulni. A kompetitív inhibitorok nem szubsztrátjai az enzimnek. A kapcsolódás vagylagos természetű, hiszen az inhibitor és a szubsztrát verseng az enzim aktív centrumához történő kapcsolódásért.



A (2.2.2.1) egyenlet szerint az I az enzimhez reverzibilisen kapcsolódhat. Ha a $k'_2=0$, akkor az I az enzim inhibitora, ha $k'_2 \neq 0$, akkor az enzim alternatív szubsztrátja, amely a katalízis során Q terméket eredményez.

Nem kompetitív inhibíció akkor következik be, ha az inhibitor nem az enzim molekula aktív csoportjához, hanem egy másik részéhez kapcsolódik és az enzim-szubsztrát komplexszel (ES) kombinálódva egy ESI hármass komplexet képez.

A fellépő sztérikus gátlás következtében a szubsztrát nem tud kiszabadulni az ESI komplexből.



A (2.2.2.2) egyenlet azt mutatja, hogy az I azzal az enzim-molekulával kapcsolódik, amelyik már kapcsolódott a szubsztráthoz. Ha $k''_2=0$, akkor az ESI az enzim inaktív formája, ami inhibíciót jelent, viszont ha a $k''_2 \neq 0$, de $k_2=0$, és $k'_2=0$, akkor kettős szubsztrát reakcióról van szó, tehát I és S együttes jelenléte szükséges a reakcióhoz.

A K_i inhibíciós konstans bevezetésével az alábbi kinetikai egyenletek nyerhetők.

Kompetitív inhibíció esetén:

$$v_i = \frac{v_{\max}(S)}{K_m \left(\frac{K_i + (I)}{K_i} + (S) \right)} \quad (2.2.2.3)$$

melynek reciproka:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m \frac{K_i + (I)}{K_i}}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (2.2.2.9)$$

Nem kompetitív inhibíció esetén:

$$v_i = \frac{\frac{K_i}{K_i + (I)} \cdot v_{\max} (S)}{K_m + (S)} \quad (2.2.2.10)$$

s ebből a reciprok egyenlet:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{\frac{K_i}{K_i + (I)} v_{\max}} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{\frac{K_i}{K_i + (I)} v_{\max}} \quad (2.2.2.11)$$

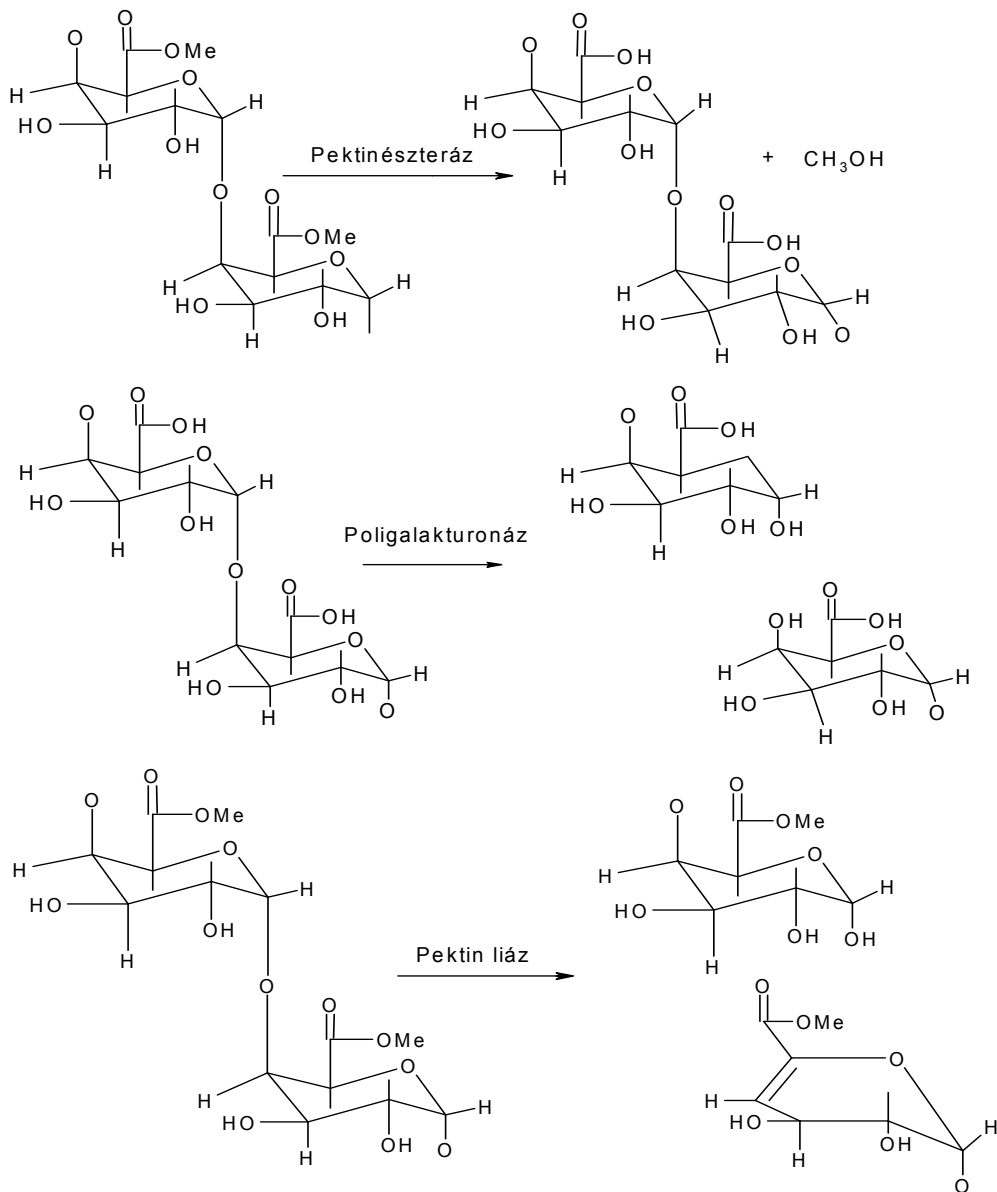
A kétfajta inhibíciós mechanizmus akár grafikus úton is megkülönböztethetők egymástól a reciprok egyenletek alapján.

2.3. Pektin enzimés lebontása

2.3.1. Pektinázok

A pektin lebontását végző enzimek három fő csoportba tagolhatóak aszerint, hogy milyen típusú kötéseknek hasítanak (2.3.1. ábra):

- Pektinészterázok: a pektin metilészter-csoportját hasítják le,
- Hidrolázok (polimetilgalakturonáz, poligalakturonázok: a poligalakturonsav α -1,4-glikozidos kötéseit hasítják,
- Liázok: az α -1,4-glikozid kötés hasítását katalizálják transz-eliminációval.



2.3.1. ábra: Pektinbontó enzimek hatásmechanizmusa

A 2.3.1. táblázat a pektinázok három osztályába tartozó enzimeket és adataikat tartalmazza [Alkorta et al. 1997, Sathyanarayana et al. 2003].

2.3.1. táblázat: Pektinázok osztályozása

Javasolt név	Közönséges név	EC szám	Szubsztrát	Mechanizmus
Pektinészterázok				
Poli-metil-galakturonát-észteráz (PMGE)	Pektinészteráz	3.1.1.11	Pektin	Véletlenszerű
Hidrolázok				
Endo-poli-galakturonáz (Endo-PG)	Poligalakturonáz	3.2.1.15	Pektin-sav	Véletlenszerű
Exo-poli-galakturonáz 1 (Exo-PG)	Poligalakturonáz	3.2.1.67	Pektin-sav	Láncvégről
Exo-poli-galakturonáz 2 (Exo-PG)	Poligalakturonáz	3.2.1.82	Pektin-sav	
Endo-poli-metil-galakturonáz (Endo-PMG)	Pektin hidroláz		Pektin	Véletlenszerű
Exo-poli-metil-galakturonáz (Exo-PMG)	Pektin hidroláz		Pektin	Láncvégről
Liázok				
Endo-poli-galakturonát-liáz (Endo-PGL)	Pektát liáz	4.2.2.2	Pektin-sav	Véletlenszerű
Exo-poli-galakturonát-liáz (Exo-PGL)	Pektát liáz	4.2.2.9	Pektin-sav	Láncvégről
Endo-poli-metil-galakturonát-liáz (Endo-PMGL)	Pektin liáz	4.2.2.10	Pektin	Véletlenszerű
Endo-poli-metil-galakturonát-liáz (Exo-PMGL)	Pektin liáz		Pektin	Láncvégről

Végezhetünk csoportosítást a preferált szubsztrát és a reakció lejátszódásának térbeli elhelyezkedése alapján is.

- Pektin, pektin sav vagy oligo-D-galakturonát a preferált szubsztrát
- A hasítás véletlenszerű (endo-, elfolyósító depolimerizáló enzim) vagy a láncvégeken történik (exo-, cukrosító enzim) [Alkorta et al. 1997].

A pektinázokat optimális működési pH tartományuk alapján is meg lehet különböztetni. Vannak pektinázok, melyek a savas körülményeket részesítik előnyben,

és vannak alkálikus pektinázok is. Ezeket az egyszerűség kedvéért szintén táblázatban (2.3.2. táblázat) foglaltam össze [Kashyap, 2001].

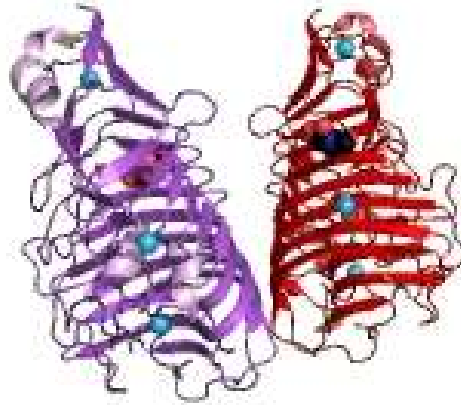
2.3.2. táblázat: A pektinázok osztályozása optimális pH szerint

Forrás	Pektináz típusa	Optimális pH	Optimális hőfok (°C)
Savas pektinázok			
<i>Aspergillus niger</i> CH ₄	Endo-pektináz	4,5 - 6,0	<50
	Exo-pektináz	3,5 - 5,0	
<i>Penicillium frequentans</i>	Endo-poli-galakturonáz	4,5 - 4,7	50
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Endo-poli-galakturonáz	3,5	55
<i>Rhizoctonia solani</i>	Endo-poli-galakturonáz	4,8	50
<i>Mucor pusilus</i>	Poligalakturonáz	5,0	40
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	Poligalakturonát-hidroláz	5,5 - 7,0	30 - 40
Alkálikus pektinázok			
<i>Bacillus sp.NT-33</i>	Poligalakturonáz	10,5	75
<i>Bacillus polymixa</i>	Poligalakturonáz	8,4 - 9,4	45
<i>Amucola sp.</i>	Pektát liáz	10,25	70
<i>Bacillus No.P-4-N</i>	Poligalakturonáz	10 - 10,5	65
<i>Penicillium italicum</i> CECT22941	Pektin liáz	8,0	50
<i>Bacillus subtilis</i>	Pektát liáz	8,5	60 - 65

2.3.2. A poligalakturonáz

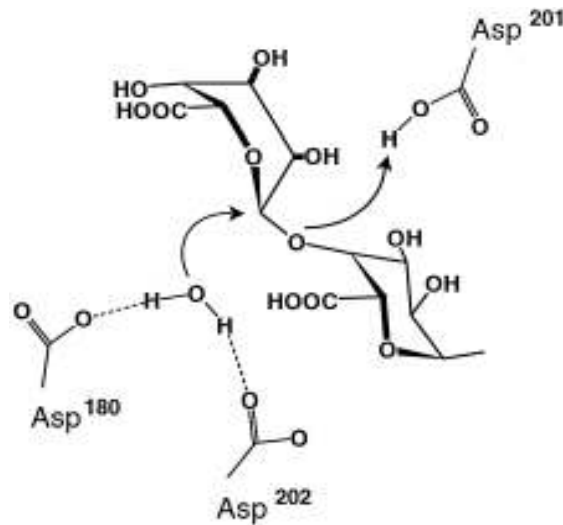
A vizes közegű pektin bontáskor alkalmazott pektináz enzimek közül talán a legfontosabb enzim típus a poligalakturonáz. Számos mikroorganizmus (gombák, baktériumok) képes előállítani, de emellett még fellelhető magasabb rendű növényekben és néhány növényi parazitában egyaránt [Sakai et al. 1993]. Az egyik leginkább kutatott mikroorganizmus a szaprofita gombákhoz tartozó *Aspergillus niger* gombafaj. Ebben a gombában található multigén család többféle poligalakturonáz (PG) enzimet képes kódolni. Hét különböző PG enzimet (PG I, PG II, PG A, PG B, PG C, PG D, PG E) izoláltak eddig a kutatók, amelyeknek az aminosav összetételük általában 66-85 százalékos egyezést mutat. A PG II (2.3.2. ábra) két alapegységéből, összesen 335 aminosavból épül fel, katalitikus aktivitásukat tekintve legkisebb aktivitása a PG C enzimnek, a legnagyobb a PG II enzimtípusnak van. A pH optimumban is különböznek

(pH = 3,9 - 5,0), azonban az optimális működési hőmérsékletük azonos, azaz 50 °C [Pařenicová et al. 2000].



2.3.2. ábra: *Aspergillus niger* törzsből kivont poligalakturonáz II szerkezete [Ebi 2008]

A PG enzim hatásmechanizmusa a 2.3.3. ábrán látható. A hidrolízisnél az Asp²⁰¹ aminosav proton donorként viselkedik, míg az Asp¹⁸⁰ és az Asp²⁰² aminosavak aktiválják a vízmolekulát.



2.3.3. ábra: A PG enzimek katalitikus hatásmechanizmusa [van Santen et al. 1999]

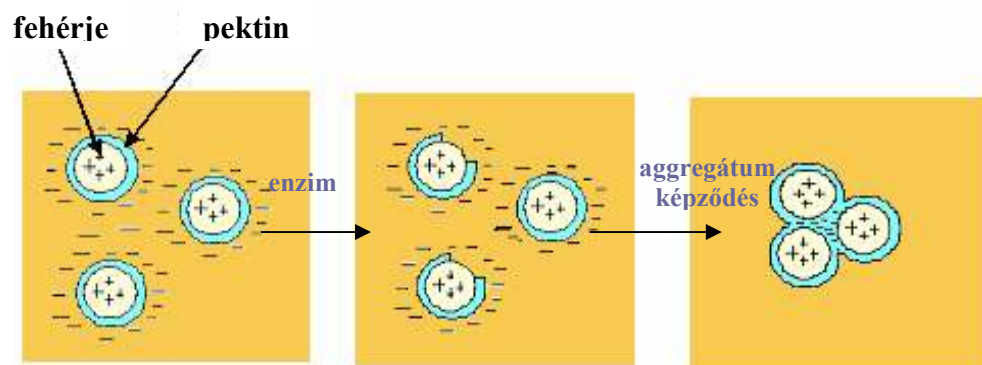
2.3.3. A pektináz enzimek ipari alkalmazása

A pektinázok felhasználási köre igen sokrétű, számos ipari eljárásban fellelhetőek [Jayani et al. 2005].

Az alkálikus pektinázokat főképp a textiliparban, a papíriparban, növényolaj-feldolgozásnál, valamint kávé és tea fermentációjánál használhatók, továbbá alkalmasak a gyümölcsipari szennyvizek előkezelésére [Kashyap et al.2001, Pilnik et al. 1982].

A savas pH tartományban működő pektinbontó enzimeket a textiliparban, különösen a cellulóz alapú szálak-anyagok (pamut, len, kender) kikészítésekor használnak. Az enzimes pamut-előkészítés kidolgozásának elsődleges célja a lúgos főzés vegyszer- és energiaigényének, valamint a lúgos kezelést követő öblítő lépések nagy vízigényének csökkentése. Az enzimek alkalmasak a kísérőanyagok eltávolítására, így segítségükkel a vegyszeres kezelések háttérbe szoríthatók, amivel az eljárás teljes mértékben környezetbaráttá tehető [Neumüller, 1981; Nyeste, 1997; Naidu et al. 1999].

A savas típusú enzimek alkalmazása azonban a gyümölcsfeldolgozó iparban a legelterjedtebb, használatukkal jelentősen nő a lényérés határfoka és javul a kapott gyümölcslé tükrösíthetősége (Alkorta et al. 1997; Kashyap et al. 2001; Pilnik et al. 1993). Az enzimek hatását a gyümölcslében legegyszerűbben az alábbi ábrával lehet szemléltetni (2.3.4.ábra):



2.3.4. ábra: Pektináz enzim hatása gyümölcslében

A nyers, préselt lé gazdag oldhatatlan részecskékben, amelyeket főként pektin vegyületek alkotnak. Ezek a részecskék teszik zavarossá a levet (*cloud particles*). Ezekben a részecskékben egy pozitív felületi töltésű „fehérje magot” vesznek körbe a negatív töltésű pektin molekulák. A negatív töltések révén a pektin molekulák taszítják egymást. A pektinázok megbontják ennek a pektinnek a szerkezetét, és ott marad a pozitív töltésű fehérje. Így az elektrosztatikus taszítás lecsökken a részecskék között, amik ennek következtében egyre nagyobb aggregátumokká állnak össze. A nagyobb aggregátumok végül leülepednek, de az eljárás javítása érdekében „flokkuláló” ágensek,

mint pl. a zselatin, tannin vagy bentonit (agyag-féleség) adagolhatók a rendszerhez. A folyamat beindításához nem szükséges a pektint teljes mértékben lebontani.

A lényérés hatásfokát úgy is növelhetjük, ha a pektinázokat más enzimekkel együtt [Gailing et al. 2000] alkalmazzuk. Ezek lehetnek például cellulázok, arabinázok, xilanázok.

2.3.4. A pektináz enzimek kinetikai viselkedése

Számos kutató [Gillespie et al. 1989; Sariodlu et al. 2001; Todisco et al. 1994] vizsgálta az oldott és rögzített pektináz enzimeket és enzimkeverékeket, hogy információt nyerjenek kinetikai viselkedésükről. Ennek ismerete gazdasági szempontból sem elhanyagolható. Ha például galakturonsavat szeretnénk előállítani, fontos, hogy az a lehetséges legnagyobb hozam mellett történjen, illetve minél kevesebb anyagi ráfordításra legyen szükség.

Pektin hidrolízisét Kulbe és munkatársai, valamint Olano-Martin és munkatársai [Kulbe et al. 1987, Olano-Martin et al. 2001] is tanulmányozták korábban. Az első esetben mindhárom típusú pektináz enzimet egyszerre használták, így a poligalakturonáz enzim külön tanulmányozására nem volt lehetőség. A második esetben pedig a cél pektin oligoszacharidok és nem galakturonsav előállítása volt.

Német tudósok [Baciu et al. 2004] citrus és cukorrépa pektin hidrolízisét tanulmányozták Pectinex 100L enzimek készítménnyel, és meghatározták a kinetikai paramétereket. Arra az eredményre jutottak, hogy mind szubsztrát, mind termék inhibíció fellép a reakció során. A szubsztrát inhibíció azonban nem mérvadó a reakcióra nézve. A kapott érték ugyanis közel hatszorosa a pektin oldhatóságának. Fontosnak érzem megemlíteni, hogy ezek a paraméterek nem egy fajta enzimre vonatkoznak, nem lehet pontosan meghatározni, hogy mely enzimre vagy enzimekre gyakorol gátlást a keletkező termék, a galakturonsav. A meghatározott értékeket (K_m , K_i , r_{max}) nem lehet teljes egészében összevetni a tiszta enzimmel történő lebontás során kapott értékekkel.

Azt, hogy az *Aspergillus niger*-ből származó poligalakturonáz enzimnek inhibitora a keletkezett monomer, már több mint húsz éve is sejtették a kutatók [Kulbe et al. 1987]. Az (endo)poli-galakturonáznak (PG, E.C. 3.2.1.15) azáltal, hogy képes a pektin és/vagy pektin sav hidrolízisére, kulcsfontosságú szerep jut a pektin

hidrolízisénel, de ezt kísérleti eredményekkel nem támasztották alá, az irodalomban nem találtam rá információt.

2.4. Membrán bioreaktorok alkalmazása

2.4.1. Membrán bioreaktorok

A membrán bioreaktorok (MBR) egyesítik a hagyományos biotechnológia és a membrán technológia nyújtotta előnyöket [Bélafi-Bakó, 2002, László et al. 2007] azáltal, hogy egy berendezésben és szinte azonos időpillanatban valósul meg a katalízis és a termék szeparációja.

A membrán bioreaktorokat többféle szempont szerint jellemezhetjük [Drioli et al. 1999]:

- Biokonverzió alapján:
 - Reakció típusa (makromolekulák hidrolízise, redox reakció)
 - Reakció közege (víz, szerves oldószer, ionos folyadék, oldószermentes)
 - Biokatalizátor típusa (hidrolitikus enzim, lipáz, észteráz, peptináz)
 - Biokatalizátor formája (sejt, enzim)
- Membrán szeparáció módja szerint:
 - Eljárás típusa (mikroszűrés, ultraszűrés, dialízis, pervaporáció, stb.)
 - Membrán anyaga (szerves polimer vagy szervesetlen, pórusos vagy pórusmentes)
 - Membrán modul (lap, cső, kapilláris, spirál)
 - Működtetés (szakaszos, keresztáramú)

A fő irányvonal a membrán bioreaktorok alkalmazását tekintve azonban mindenképpen a szennyvíztisztítás [McAdam et al. 2006, Kertész et al. 2008], ahol a biológiai lebontás és a kis molekulatömegű anyagok szeparációja egyidejűleg játszódik le. A Magyarországon is sikeresen működő Zenon vállalat [Zenon, 2008] egy bemező, üreges szálkötegekből felépülő ultraszűrő membránmodult fejlesztett ki, ahol a szűrést a permeátum oldalon szivattyúval kialakított 0,05-0,5 bar vákuum biztosítja.

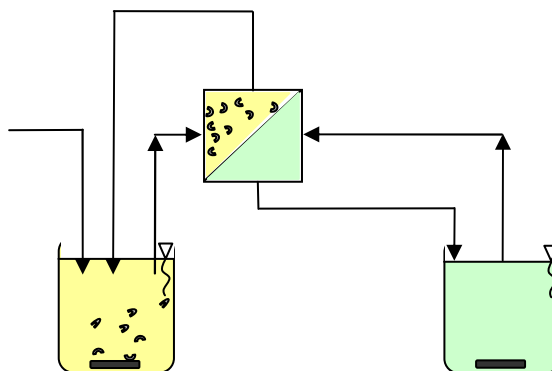
A MBR-ok nyújtotta előnyökre már az iparban is felfigyeltek és néhány biotranszformációnál meg is valósítottak ilyen típusú eljárásokat. Az L- aszparaginsav gyártását [Chibata et al. 1974] *Escherichia coli* sejtek poliakrilimid membránra való rögzítésével oldották meg, tej laktóz tartalmának hidrolízisekor [Pastore et al. 1976] β -galaktozidáz enzimet használnak, amit például cellulóz-acetát szálak közé rögzítenek.

Az L-almasav előállításánál is alkalmazni lehet MBR-t, ahol a fermentációt végző mikrobákat (*Brevibacterium ammoniagenes*) poliakrilamid membránon rögzítik [Takata et al. 1993].

Az előbb felsorolt, már működő alkalmazások mellett azonban még számos MBR-os kutatás folyik a gyógyszeriparban (aminosav, antibiotikum, rákellenes gyógyszerek), az orvos-biológia [Curcio et al. 2005] területén (műmáj, műhasnyálmirigy), a szennyvízkezelés javítása érdekében (bemerülő ultraszűrős modulok), valamint az élelmiszer- és agráriparban egyaránt.

A tejiparban, pl. tej és tejsavó kezelésénél is hasznos lehet a MBR [Cheison et al. 2006]. A sajtgyártásnál képződött savó összetétele: 0,7 % fehérje, 5 % laktóz, 93 % víz és só, amelyet kezeletlenül nem lehet semmilyen szennyvizet befogadó rendszerbe juttatni. A savó megfelelő kezelésével azonban a probléma kiküszöbölhető, valamint új értékes anyagokat állíthatunk elő. A savó laktóz tartalma pl. tejsavvá konvertálható, amely MBR-ban igen jó hatékonysággal elvégezhető. Savófehérjék (α -laktalbumin) ultraszűréssel kombinált hidrolízise során gyógyszeripari intermedierek állíthatók elő.

Olajok és zsírok kezelésére illetve enzimes lebontásukra [Bélafi-Bakó et al. 1994] kiváló alternatívát jelent a membrán reaktor, amelyhez egy speciális, ún. kettős cirkulációs rendszerű reaktorkialakítás szükséges (2.4.1. ábra). A lipáz enzimet adszorpciós úton rögzítették a hidrofil membrán anyagához. Az olajat a membrán-modul „enzim-oldalán” áramoltatták; míg a másik oldalon a vizes fázist keringették. A működés során a triglicerid molekulák az enzimmel kapcsolatba kerülve zsírsavvá és glicerinné alakulnak át. A reakcióhoz szükséges víz molekulák a membránon keresztül jutnak el az enzimig, s ott kapcsolódnak be a folyamatba. A termékek közül a zsírsavak a lipid fázisban maradnak, a glicerin pedig – lévén szintén viszonylag kis molekula, ráadásul vízben oldódik – áthaladva a membránon a vizes fázisba jut. Az így előállított zsírsav nagy tisztaságú, valamint a reaktor és a rögzített enzim stabilitása rendkívül jó, akár több héten keresztül is működtethető a rendszer, anélkül, hogy a produktivitás jelentősen csökkenne.



2.4.1. ábra: MBR kialakítás kettős cirkulációs rendszerrel

A kisebb molekűanyagok biotranszformációja mellett a biológiai makromolekulák lebontásánál is nagy szerepet kaphat a membrán bioreaktor.

Makromolekulák (pl. poliszacharidok) hidrolízisekor az enzimek a hosszú szénláncú, nagy molekűatűmegű szubsztrátot kisméretűvé bontják le. A membránreaktorban a méret szerinti szeparáció is megvalósul. A jól kiválasztott, megfelelő pórusméretű membrán ugyanis képes visszatartani a még el nem hidrolizált szubsztrátot, illetve elválasztani a képződött terméket. Ennél a folyamatnál a szubsztrát és a biokatalizátor közvetlen érintkezése szükséges a reakció lejátszódásához, illetve a biokatalizátornak a membrán azon oldalán kell elhelyezkednie, ahol a szubsztrát oldat áramlik. Ezen makromolekulák, mint például keményítő [Paolucci-Jeanjean et al. 2000] vagy cellulóz [Gan et al. 2002], hidrolízisekor gyakran fellépő termék inhibíció is elkerülhető membrán bioreaktor alkalmazásával, hiszen a keletkező kis molekűatűmegű termék (pl. glükóz) könnyedén átjut a membránon, és így folyamatosan eltávolításra kerül a rendszerből. A pektin hidrolízise a keményítő és a cellulóz lebontásával analóg reakciónak tekinthető. Sok közös jellemvonás fedezhető fel a folyamatoknál. Így az ott elért eredmények nagy valószínűséggel jól alkalmazhatók lesznek a különféle forrásokból származó pektinek enzimikus lebontásánál

2.4.2 A pektin lebonthatóságának vizsgálata enzim-membrán reaktorban

A legnagyobb érdeklődést a membránreaktorok iránt talán a gyümölcslegyártás mutat. Ugyanis, mint korábban már tárgyaltam, jelentős lényerési hatásfokjavulást lehet elérni a pektinbontó enzimek használatával. Több irodalomban [Alkorta et al. 1997, Alvarez et al. 1996, Rodriguez-Nogales et al. 2008] találkozhatunk olyan kutatással,

ahol különböző pektinbontó enzim, illetve enzimkeverék aktivitását vizsgálták membrán reaktorban, illetve hatékonyságát a viszkozitás csökkentésében.

Alkorta és munkatársai [Alkorta et al. 1997] folyamatosan működő ultraszűrő membrán reaktort alakítottak ki, ahol nyomon követték citrus pektin β -transz eliminációját *Penicillium italicum*ból származó pektin liázzal. Azt tapasztalták, hogy az alkalmazott enzim az idő múlásával jelentősen veszített aktivitásából, azonban még így is 55 százalékos viszkozitás csökkenést mértek 50 óra működést követően. Ezt a kísérletet megismételték gyümölcslevekkel (sárgadinnye, vörös szőlő), majd a kapott eredményt szakaszos reaktorban végzett mérésekkel hasonlították össze. Az elért viszkozitás csökkenés minden esetben hasonló volt, azonban a membrán reaktort kilencszer hosszabb ideig lehetett működtetni.

Spanyol kutatók [Rodriguez-Nogales et al. 2008] szabad enzimet tartalmazó membrán reaktorban (FEMR) vizsgálták az almapektin lebonthatóságát. Az alkalmazott enzimkeveréket (poligalakturonáz és pektinliáz) saját maguk állították elő *Aspergillus niger* CECT 2088 törzset alma törköly tápanyagon fermentálva. Azt találták, hogy az FEMR katalitikus aktivitása 15 napos működést követően sem csökkent jelentősen.

A membrános művelet hatékonyságának a növelése [Giorno et al. 1998] pektináz enzim membrán anyagában való rögzítésével is lehetséges. A kapott fluxus értékek ezzel a megoldással közel 30 százalékkal javultak az oldott enzimes membránreaktorban mért értékekhez képest.

A kiragadott pár irodalmi példa is jól szemlélteti, hogy lehetséges pektin enzimes lebontása membrán reaktorban. Az új, bogyós gyümölcstörkölyökből nyert pektinek enzim-membrán reaktorban történő lebontását, valamint az enzim és a permeátum oldalon történő vákuum együttes hatását ez idáig még senki sem tanulmányozta. A vákuum alkalmazásának ugyanakkor számos pozitív hatása ismert a fluxus és így a membránreaktor hatékonyságának növelésére főképp a szennyvíztisztítás területéről.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált anyagok

3.1.1. Enzimek

A gyümölcsök enzimés előkezelése és gyümölcsle hozam optimalizálás során használt enzimek:

Pectinex Ultra SP-L: Komplex enzimek készítmény *Aspergillus aculeatus*-ból (Novozymes, Dánia) Standard aktivitása 26000 PG/ml (pH=3,5), a standard aktivitást a kezelt pektinsav oldat viszkozitás csökkenésével határozzák meg, pH=3,5 és 20 °C-on. Ez egy hagyományosan gyümölcs pépek kezelésére kifejlesztett enzimek készítmény, mivel pektináz enzimek mellett hemicelluláz és celluláz aktivitást is mutat. Az iparban főként alma és körte kezelésére használják. Legnagyobb aktivitását 4,5 pH értéken mutatja.

Mycrozyme 200: Por alakú, teljesen tiszta enzimek készítmény, mely nagy mennyiségben tartalmaz pektinészterázt, poligalakturonázt és poligalakturonáz-liázt. Elsősorban borok és mustok kezelésére javasolja a gyártó.

Pektopol PT-400: Sűrű, barna folyadék, amely szintén tartalmazza a pektin bontó enzimeket a gyümölcs pép és gyümölcsle pektintartalmának bontására. Emellett még celluláz, hemicelluláz valamint proteáz és más enzimek is megtalálhatók benne. Nincs genetikailag módosítva, 3,1-3,7 pH értékek között mutatja a legnagyobb aktivitást.

A pektin hidrolízisnél alkalmazott enzim

Poligalakturonáz enzim *Aspergillus niger*-ből (Fluka). Standard aktivitása 1,7 U/mg, ahol az aktivitás 1 egysége megfelel annak a mennyiségnek, ami percenként 1 µmol galakturonsavat szabadít fel poligalakturonsavból pH=4,1 és 50 °C-on.

3.1.2. Vegyszerek

A pektin feltárásnál, a pektinkészítmények vizsgálatánál és a reakció kinetikai méréseknél felhasznált vegyszerek az alábbi 3.1.1. táblázatban láthatók.

3.1.1. Táblázat: A mérések során felhasznált anyagok

Név	Gyártó	Tisztaság	R és S mondatok
3,5-dinitroszalícilsav	Fluka	> 98%	R22-37/38, S22-24/25
Aszkorbinsav	Sigma	≥ 99 %	-
Cianidin-3-glükozid	Sigma		-
Citromsav	Reanal	> 99,5 %	R36, S24/25
D-(+) galakturonsav	Fluka	> 93 %	-
Etanol	SPEKTRUM 3D	> 99,7 %	R11, S7-16
FeCl ₃	Sigma	≥ 97%	R22-38-41, S26-39
Fenol	Reanal	≥. 99 %	R24/25-34, S6-28-45
Folin reagens	Sigma-Aldrich	-	R34, S 26-36/37/39-45
Galluszsav	Sigma	-	R36/37/38, S26-36
Kálium-klorid	SPEKTRUM 3D	≥ 99,5 %	-
Kálium-nátrium tartarát-4-hidrát	SPEKTRUM 3D	≥ 99 %	-
Marhaszérum-albumin (BSA)	Fluka	-	R22
Metil-alkohol	SPEKTRUM 3D	≥ 99,9 %	R: 11-23/24/25-39/23/24/25 S:7-16-36/37-45
Monoszacharid standardok (ramnóz, galaktóz, arabinóz, glükóz, mannóz)	Fluka	≥ 99 %	-
Nátrium-hidroxid	SPEKTRUM 3D	≥ 98 %	R35, S26-37/39-45
Nátrium-karbonát vízmentes	Reanal	> 99,5 %	R 36, S22-26
Nátrium-szulfít	Reanal	≥ 95 %	R 31
pektin (citrus) (GENU pectyn type LM-5 CS)	Polding Kft.	-	-
Pektin (DE ~ 30, citrus)	Sigma	-	-
Pektin (DE ~ 60, citrus)	Fluka	-	-
Pektin (DE ~ 90, citrus)	Sigma	-	-
Réz-szulfát	SPEKTRUM 3D	> 99 %	R22-36/38-50/53, S2-22-60-61
Sósav	Reanal	≥ 37 %	R36/37/38, S1/2-26-45
TPTZ (tripiridil-triazin)	Fluka	≥ 99 %	R36/37/38, S26-36
trifluor ecetsav	Reanal	≥ 99,5 %	R20-35-52/53, S9-26-27-28-45-61

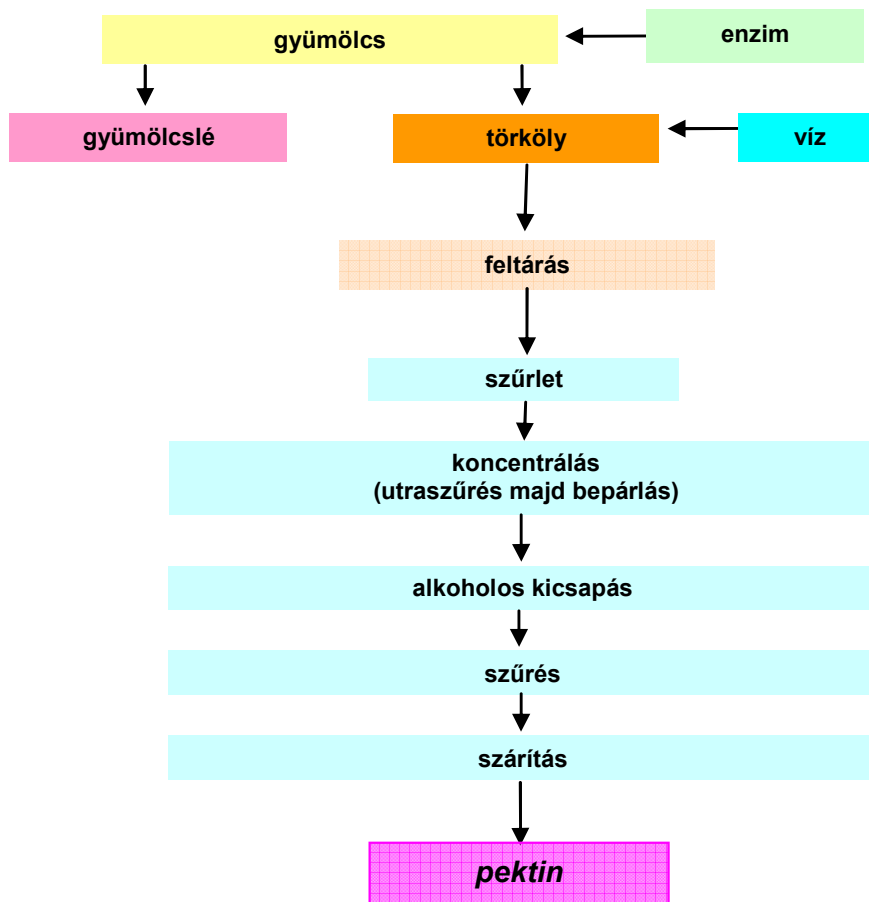
3.2. Mérési módszerek

3.2.1. Pektin feltárás

Vizsgálataimhoz kiindulási anyagként bogyós gyümölcsökből származó törkölyt használtam, továbbá összehasonlításként a gyümölcsökből (*fekete ribizli - fertődi 1 fajta; piros ribizli - fertődi hosszú fürtű fajta; málna - fertődi zamatos fajta; szeder - thornfree fajta; bodza - Haschberg fajta*) történő pektin izolálást is tanulmányoztam. A gyümölcsök Tolcsváról (Fitomark 94'kft.) származtak.

A cukorrépaszeletből történő feltárás tapasztalatai alapján a pektin feltárást enyhén savas (pH=3, citromsavval), enyhén lúgos (pH=9, NaOH) és semleges pH-n is elvégeztem, alkalmaztam előzetes mechanikai feltárást, valamennyi kísérletet elvégeztem 100 és 60 °C hőmérsékleten is.

Mivel mind gazdasági, mind környezetvédelmi szempontból a vizes feltárás bizonyult a leghatékonyabbnak, a további pektin feltárási kísérleteket a következő módon végeztem el (3.2.1. ábra).



3.2.1. ábra: A pektin feltárás egyszerűsített folyamatábrája

A gyümölcsöt illetve gyümölcs-törkölyt először összezúztam, és desztillált vizet adtam hozzá 1:4 arányban. Enzimes előkezelés hiányában a pektin feltárását 100 °C hőmérsékleten végeztem autoklávban 30 percen keresztül. Enzimes (Pectinex ultra SP-L) előkezelés alkalmazásakor az oldatba megfelelő mennyiségű enzimet juttattam.

A pektinre nézve híg, vizes oldatot először egy kéméletes membrános művelettel, ultraszűréssel sűrítettem be 3-DTA teszt készülékünk segítségével 5 % szárazanyag tartalomra, majd bepárlással 30 % szárazanyag tartalmú pektin oldatot kaptam. Ezt követően alkoholos kicsapással nyertem ki a pektint, és a kapott nedves csapadékot 12 órán át vákuumszárítóban 60 °C hőmérsékleten szárítottam az alkohol maradéktalan eltávolítása céljából.

3.2.2. Enzimes előkezelés és gyümölcslé hozam optimalizálás

A mérésekhez fagyasztott bogyós gyümölcsöt használtam (piros ribizli: 2,7 pH, fekete ribizli: 3 pH, málna: 3 pH, szeder: 4 pH). Minden mérésnél 30 g összetört gyümölcspépet mértem be egy 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba, majd rázógéppen inkubáltam adott hőmérsékletűre. Csak ezután adtam hozzá a megfelelő mennyiségű enzimet. Az inkubálási időt 30, 60 és 120 percrek választottam. A rázatás mindig 200 rpm intenzitású volt.

Az inkubálási idő elteltével az összehasonlíthatóság miatt minden egyes alkalommal pontosan 30 percen keresztül szűrtem 75 g/ m²-es ipari szűrőpapíron (Spektrum 3D) a kezelt gyümölcspépet. Minden kezelés után meghatároztam a kapott szűrőlepeny és szűrlet szárazanyag tartalmát is.

A fehérje-meghatározást Folin reagenssel végeztem. A reagens alkalikus pH értéken kék színreakciót ad fehérjékkel, amely spektrofotometer segítségével 750 nm-en mérhető. A színreakcióért főleg a fehérjék tirozin és triptofán tartalma a felelős.

3.2.3. Pektinkészítmények jellemzése

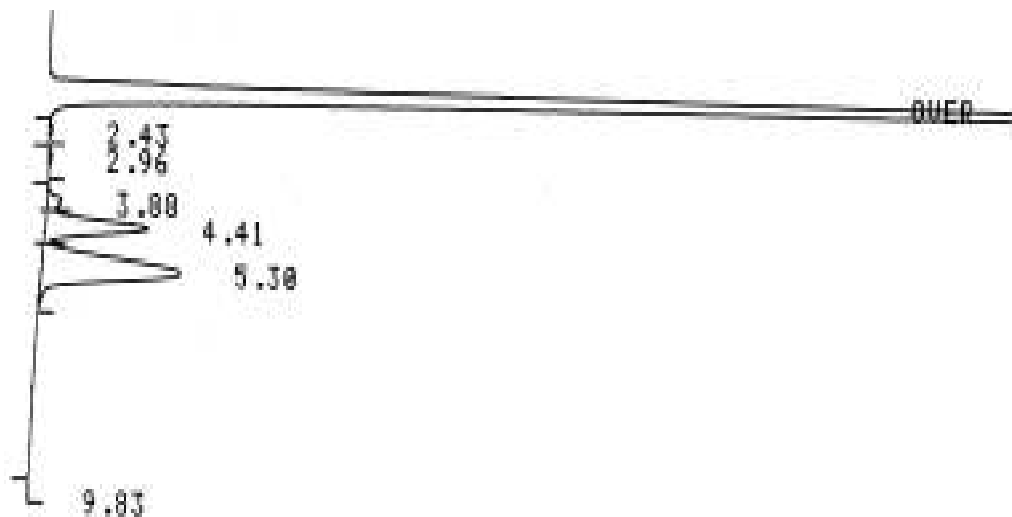
A kinyeréshez kapcsolódó vizsgálatok

A kinyert pektinkészítmények galakturonsav tartalmát egy enzimes kezelést követő HPLC elemzéssel határoztam meg, a pektint alkotó további komponensek analizéséhez trifluorecetsavas feltárót végeztem, majd anioncserélő HPLC oszlopon elemeztem a monoszacharidokat. Mindkét HPLC elemzéshez felvettem kalibráló sorozatokat, s ezek alapján számítottam ki a pontos értékeket.

Savas hidrolízis

A hidrolízishez 2 M-os trifluorecetsavat használtam. A gömblobbikba 500 mg pektint mértem be, amihez 20 ml (2 M) trifluorecetsavat adtam, majd olajfürdőn 120 °C hőmérsékleten 1 órán keresztül hidrolizáltam a pektint. A trifluorecetsavat /vizet vákuum desztillációval távolítottam el 40 °C-on. Az így kapott pektin hidrolizátumot 5 ml (100 g/l) vízben feloldottam, majd meghatároztam a monoszacharid összetételt.

A monoszacharidok meghatározása mono és diszacharidok elválasztására alkalmas Zorbax (Agilent) oszlopon történ. Az oszlop töltetét 3-amino-propilszilán és Zorbax szilika gél reakciójával állították elő. Az oszlop hossza 150 mm, belső átmérője 4,6 mm, a gömb alakú töltetek 5 µm átmérőjűek voltak. Az oszlop működése során maximum 400 bar nyomást és 60 °C hőmérsékletet viselt el. A méréseket 1,3 cm³ min⁻¹ áramlási sebesség mellett, 30°C hőmérsékleten Merck Hitachi gyártmányú L-6200A típusú készülékkel végeztem, amely AS-2000A Autosampler automatikus mintaadagolóval rendelkezett. A detektálást RI-71 típusú törésmutató detektor (Merck) végezte. A mozgó fázis (eluens) acetonitril-víz 80:20 arányú keveréke volt, amelyen keresztül héliumot buborékoltattam át, hogy az oldott oxigént eltávolítsam. D-2520 GPC típusú integrátor (Merck-Hitachi) értékelte ki a kromatogramokat. A 3.2.2.-es ábrán a kalibrálás során nyert egyik kromatogram látható. Az egyes monoszacharidokhoz tartozó retenciós időket a 3.2.2. táblázatban foglaltam össze.



2.2.2. ábra: HPLC kromatogram monoszacharid tartalom meghatározásnál (10 g/l)

3.2.2. táblázat: A monoszacharid komponensekhez tartozó retenciók idők

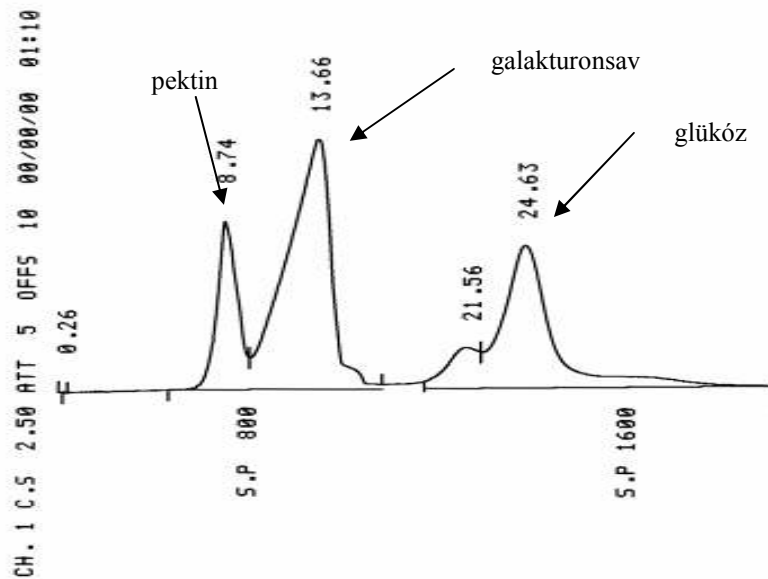
monoszacharid	retenciók idő
glükóz/galaktóz	5,30
mannóz	4,41
arabinóz	3,88
ramnóz	2,96
fukóz	2,43

Enzimes hidrolízis

1,3 l desztvízben feloldottam 26 g piros ribizli/fekete ribizli/ alma/citrus pektint (20 g pektin/l, kivéve citrus: 25,4 g citrus pektin/l), majd 1300 µl Pektopol mértem az oldatba. 40 °C-on elhidrolizáltam a pektin oldatot, majd a hidrolízis végén 5 ml mintát kivettem, melyet felforraltam (enzim inaktiválás) és 10 ml-es normállombikba töltöttem amit azután desztillált vízzel jelig töltöttem. Az így előkészített mintákat használtam fel a HPLC-vel történő méréseknél.

A HPLC-s galakturonsav meghatározásához a 300 mm hosszú, 7,8 mm belső átmérőjű Aminex HPX-87H típusú oszlopot (Bio-Rad) használtam. Az álló fázis ezüst-szulfonát-divinil-benzol-sztirol kopolimer ioncserélő töltetű oszlop volt. A méréseket 0,3 cm³ min⁻¹ áramlási sebességnél, 30°C hőmérsékleten végeztem. Az L-6200A típusú készülék (Merck Hitachi) egy AS-2000A Autosampler automatikus mintaadagolót tartalmazott. A detektálás Merck gyártmányú RI-71 típusú törésmutató detektorral

történt, míg a kromatogramok kiértékelése D-2520 GPC típusú integrátorral (Merck-Hitachi). A 3.2.3.-as ábrán a kalibrálás során nyert egyik kromatogram látható.



3.2.3. ábra: HPLC kromatogram galakturonsav meghatározásnál

Színmérés

A mérések a Szegedi Egyetemen történtek az ott előállított pektinek vizsgálatával párhuzamosan. A pektin porok és az abból készített oldatok és gélek színkoordinátáit a következő műszerekkel vizsgáltam meg.

A gélek CIE (Commission Internationale de la Éclargie) standard L^* a^* b^* koordinátáinak mérése Hunter Miniscan spektrofotometriás színmérővel, folyadékmérő feltétellel történt, optikai üveg mérőtégelyben, 1 cm rétegvastagságban, fehér kerámia háttér alkalmazásával, úgynevezett transz-reflexiós mérési móddal. A vizsgált felület 25 mm átmérőjű volt.

A porok mérése a minták kis mennyisége miatt csak egy másik konstrukciójú (Minolta tristimulusos színmérő) műszerrel, 8 mm átmérőjű mérő felületen vált lehetségessé.

1 %-os pektin vizes oldatok színkoordinátáinak elemzése szintén Minolta színmérővel 0,5 cm rétegvastagságnál, fehér háttérnél, 8 mm² területen történt.

Észterezettségi fok meghatározása

A pektinek egyik fő jellemzője az észtereztettségi fok (ÉF), amely jelentős hatással bír az adott pektin zselésítő tulajdonságára, illetve az enzimes lebonthatóságra egyaránt.

Titrlásos módszer:

Különböző, 2-4 g/l koncentrációjú, 50 ml térfogatú pektin oldatokat titrltam pH mérés mellett.

Először lúggal (0,1 NaOH) pH=8-ra állítottam be az oldatot és a fogyást feljegyeztem (f_1). Ez a fogyás adja a savcsoportról az információt. Ezután az addig fogyott lúggal együtt, annyi ml nátrium-hidroxidot ($f_{\text{összlúg}}$) adagoltam az oldathoz, hogy a pH 12-nél nagyobb legyen. Ilyen lúgos körülmények mellett 15 percig keverttem szobahőfokon az oldatot, hogy a pektin elszappanosítása megtörténjen Ezt követően savval (0,1 n HCL) visszatitrltam pH=8-ig és a fogyást szintén feljegyeztem (f_2). Az összes lúgfogyásból kivonva a sav fogyását kapok egy térfogat adatot ($f_{\text{észter}}$), amely az észtereztettségi szinttel arányos.

Az észtereztettségi fokot a következő módon lehet kiszámolni.

$$\text{ÉF} = f_{\text{észter}} / (f_{\text{észter}} + f_1) * 100$$

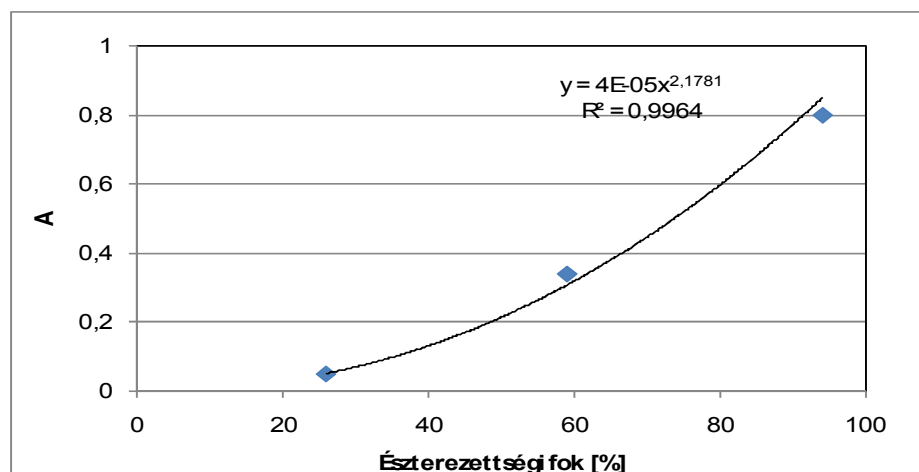
Infravörös spektroszkópai vizsgálatok:

A mérések Bruker Vertex 70 infravörös spektrométer segítségével történtek abszorbancia módban, a 4000-tól 400 cm^{-1} hullámszámú tartományban, 4 cm^{-1} -es felbontással, A pektinek FT-IR spectrumát Golden-Gate ATR rendszer segítségével vettem fel, amiben egy egyszeres ATR gyémánt kristály található. A műszernél alkalmazott detektor MCT (Bruker) volt. A minták elemzése három párhuzamos mérés alapján valósult meg. A mérések elvégzéséhez nem volt szükség a minta előkészítésére, a pektinpor közvetlenül a gyémánt felületére volt helyezve.

Az 1730 cm^{-1} –es hullámszámnál kapott abszorbancia értékek az észtereztett karboxil csoportok számával, az 1600 cm^{-1} -es hullámszámnál mért abszorbancia értékek pedig a nem észtereztett karboxil csoportok számával arányos [Manrique et al. 2002].

Tehát:
$$A = A_{1730} / (A_{1730} + A_{1600})$$

A pontos meghatározáshoz kalibrációs egyenest vettem fel (3.3.2. ábra) ismert észtereztettségi fokú pektin standardok segítségével.



3.3.2. ábra: Kalibrációs görbe

Antioxidáns, összesfenol és antocianin tartalom meghatározás

A pektin minták antioxidáns aktivitásának meghatározása

Az összes antioxidáns aktivitás meghatározásához Benzie és Strain [Benzie et al. 1996] módosított, ún. FRAP módszerét alkalmaztam. A módszert eredetileg a plazma antioxidáns kapacitásának meghatározására dolgozták ki. A FRAP módszer lényege, hogy a ferri (Fe^{3+}) ionok az antioxidáns aktivitású vegyületek hatására ferro (Fe^{2+}) ionokká redukálódnak, amelyek alacsony pH értéken a tripiridil-triazinnal (TPTZ) komplexet képezve színes (kék) terméket adnak és 593 nm-en fotometrálnak.

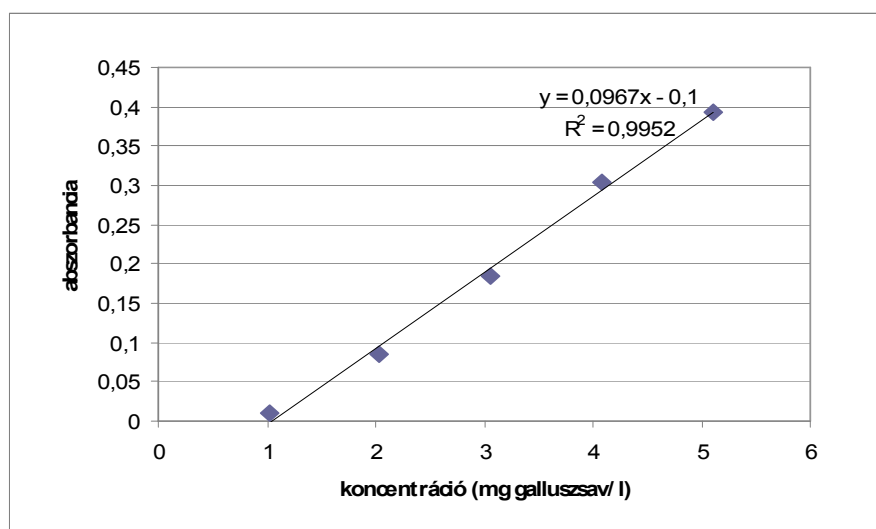
A FRAP értéket meghatározásához ismert (Fe^{2+}) koncentrációjú reakcióelegyet felhasználva kalibrációt készítettem. Abban az esetben, ha aszkorbinsavat is mérek ezzel a módszerrel ismert koncentrációban, akkor az aszkorbinsav ekvivalens aktivitást is meg lehet adni.

Az antioxidáns méréshez szükséges oldatok: acetát puffer (pH 3,6; 300 mM); 20 mM FeCl_3 desztillált vízben; 10 mM TPTZ oldat 40 mM HCl-ben oldva; 1 mM aszkorbinsav oldat. A FRAP reagens összetétele a következő: 25 ml acetát puffer, 2,5 ml FeCl_3 oldat, 2,5 ml TPTZ oldat. A mérések során 50 μl mintához 1,5 ml FRAP reagenst mértem össze és 5 perc várakozás után megmértem az oldatok abszorbanciáját.

Az összes fenol tartalom meghatározása

Az összes fenol meghatározás Singleton- módszere [Singleton et al. 1965] szerint történt. A mérésnél Folin-Ciocalteu reagenst, 80 %-os metil alkoholt, tízszeresre hígított Folin reagenst, 0,7 M NaCO_3 oldatot, és a metanolban feloldott 0,3 M galluszsav oldatot használtam. A reagensek összemérése után az oldatot tartalmazó

kémcsöveket 5 percre 50 °C-os vízfürdőbe helyeztem, majd 760 nm-en fotometráltam. A galluszsavra felvett kalibrációs görbe (3.3.3. ábra) alapján meghatároztam a minták összes fenoltartalmát.



3.3.3. ábra: Kalibrációs görbe az össz fenoltartalom meghatározásához

Antocianin tartalom meghatározása

A KCl pufferben (pH = 1) és nátrium acetát pufferben (pH = 4,5) feloldott megfelelően hígított mintáknak, spektrofotometer segítségével, megmértem az abszorbanciáját 517 és 700 nm-en egyaránt, majd az alábbi összefüggés szerint meghatároztam az abszorbancia értékét:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

Az antocianin színezék koncentrációját (cianidin-3-glükozidban kifejezve) a következő egyenlet segítségével határoztam meg.

$$TA = (A * MW * DF * 1000) / \epsilon/l$$

ahol,

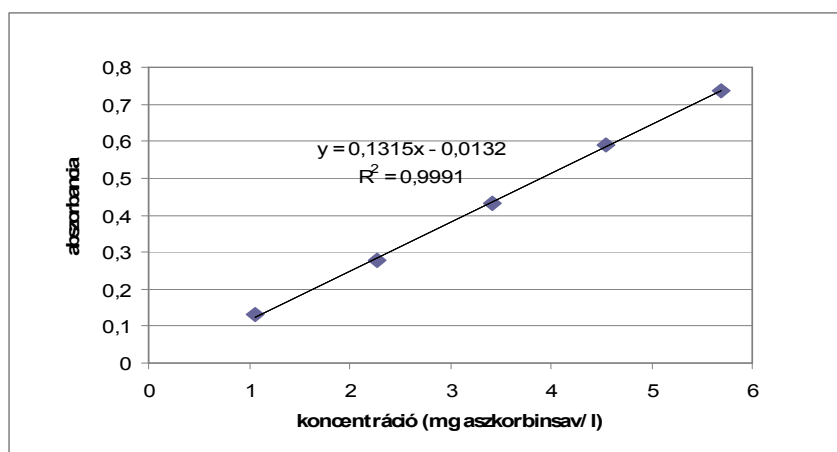
TA: mg/l

MW: 449,2 g/mol

DF: hígítási faktor

l: kuvetta szélesség (1 cm)

ϵ : moláris abszorptivitás (cianidin-3-glükozidra: 26 900).



3.3.4. ábra: Kalibrációs görbe az össz antioxidáns-kapacitás meghatározásához

3.3.4. Az enzimes hidrolízis nyomon követése

A hidrolízis nyomon követése redukáló cukor tartalom mérésével történt. Mivel a kinetikai vizsgálatoknál a minta csak kis mennyiségben tartalmazott redukáló cukrot (galakturonsavat) a DNS-módszert (Miller, 1959) választottam.

A módszer azon alapszik, hogy lúgos környezetben a 3,5-dinitro-szalicilsav redukáló cukor, jelen esetben (oligo)galakturonsav, hatására 3-amino-5-nitro-szalicilsavvá alakul, amely 540-590 nm-en fotometrálnak. Mivel a mérés hibája meglehetősen nagy, minden esetben három párhuzamos mintát vettem, és a kapott eredményeket átlagoltam.

3.3.5. Rázott lombikos kísérletek

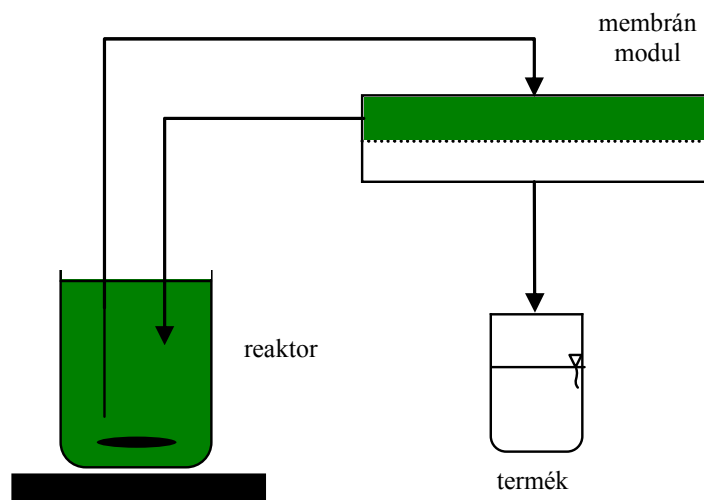
A reakciókinetikai vizsgálatokat rázatott lombikban, rázógépből végeztem el. Különböző koncentrációjú (1,2 és 4 g/l) pektin oldatokat készítettem. A mérési körülmény 50 °C és 150 rpm volt, mivel az enzim működése ezen a hőfokon a legjobb. A termék inhibíció meghatározásához D-(+)-galakturonsavat, vagyis a reakcióterméket adtam a kiindulási elegyek egy részéhez. A kezdeti galakturonsav koncentrációk a következők voltak: 0,5, 1 és 2 g/l. Az alkalmazott enzimkoncentráció 0,001 g/l volt. A reakcióelegyet a rázógépből tettem és ott 50 °C-ra termosztáltam. A reakciót az enzim hozzáadásával indítottam el. Mivel elsődleges célom a kinetikai paraméterek meghatározása volt, így a mintavételek időpontjait ehhez igazítottam: A 2., 15., 45., 90. és 240. percen vettem mintát.

A pektint citrát pufferben oldottam fel, így a reakció teljes időtartama alatt biztosítani tudtam az optimális 4,1 pH értéket a poligalakturonáz enzim számára.

Az észtermentesített pektin előállításához először 0,1 M NaOH oldattal 12-es pH-ra beállítva 15 percig szobahőmérsékleten kevertettem a pektinoldatot. Majd 0,1 M koncentrációjú citromsav oldattal 4,1 pH-t állítottam be, hogy egy puffer rendszert alakítsak ki és ezután végeztem el az enzimes hidrolízist.

3.3.6. Kísérletek membrán reaktorban

A reakciót membrán reaktorban (3.3.5. ábra) is lejátszottam. Enzimet tartalmazó híg szubsztrát oldatot keringettem egy mágnes kevertetésű termosztált reaktorból a membrán modulon át, ami szintét termosztálva volt. A síklap típusú ultraszűrő membrán anyaga 30 kDa cut-off értékű regenerált cellulóz volt. A membrán pórusméretéhez képest nagy méretű enzimet visszatartotta, viszont az alacsony molekulatömegű anyagok, mint a galakturonsav könnyen átjuthattak rajta. A szekunder oldalon kialakított vákuumot vákuum szivattyúval hoztam létre.



3.3.5. ábra: A membrán bioreaktor egyszerűsített vázlata



3.3.6. ábra: A mechanikus egalizátor

A kevert reaktorban levő szubsztrát oldat szintjét a mérések egy részénél mechanikus egalizátorral (szintkiegyenlítővel) (3.3.6. ábra) szabályoztuk. Ennek a berendezésnek a működése igen egyszerű, de nélkülözhetetlen a folyamatos rendszer jó működéséhez. Az egalizátor két egymásba helyezhető ovális alakú üvegedényből áll, melynek alsó és felső vége le van szűkítve, és szorosan illeszkednek egymáshoz, így szelepként tud működni. Az alsó csövet összekötve a reaktorral, ha annak szintje lecsökken, a szelep kinyit, és pótolja az eltávozott mennyiséget miközben a szelep fokozatosan lezár.

A membrán reaktoros kísérleteknél a reakciókörülmények a következők voltak: 50 °C, 4.1-es pH (puffer oldat segítségével). A membrán felülete 0.01 m² volt.

4. Eredmények és értékelésük

Az agráripárban fellelhető hulladékok és melléktermékek számos értékes anyagot tartalmaznak. A különböző gyümölcstörkölyök értékes anyagokban igen gazdagok, ezek egyike a pektin.

Dolgozatom elkészítése során célom volt, hogy új, kereskedelemben nem beszerezhető pektinkészítményeket állítsak elő bogyós gyümölcsök feldolgozásakor keletkező törkölyökből egy megbízható, egyszerű és környezetbarát feltárási módszer segítségével. Az így előállított készítményeket jellemeztem és vizsgáltam enzimes lebonthatóságukat.

Pektin poligalakturonáz enzimmel történő lebontásakor elsősorban D-galakturonsav keletkezik. Az enzimes lebonthatóságra azonban több tényező is hatást gyakorolhat, a keletkező terméknek inhibíciós hatása lehet a reakcióra nézve. Emellett gazdasági szempontból sem elhanyagolható megvizsgálni a hidrolízis reakciókinetikai szempontból. Ha galakturonsavat szeretnénk előállítani, fontos, hogy az a lehetséges legnagyobb hozam mellett, minél hatékonyabb módon történjen.

A fellépő termék-inhibíció elkerülése érdekében mindenképpen célszerű a membránreaktor, mint alternatíva tanulmányozása a hidrolízis kivitelezéséhez.

4.1. Pektin feltárás

4.1.1. Új pektin készítmények előállítása

A kereskedelmi forgalmú pektineket ma citrusfélék héjából és almatörkölyből állítják elő. A szakirodalomban azonban [Iglesias et al. 2004; Ptichkina et al. 2008; Yapo et al. 2007; Kar et al. 1999; Wang et al. 2007; Pagán et al. 2001] számos utalást találhatunk arra, hogy pektinek előállítását vizsgálták más alapanyagokból, mint pl. napraforgóból, őszibarackból, sütőtökből, stb., illetve pektin tartalmú növények feldolgozásánál keletkező melléktermékekből.

A méréseimnél különböző, Magyarországon is megtalálható bogyós gyümölcsök feldolgozása során keletkező melléktermékekből, mint pl. fekete és piros ribizli, málna, szeder, bodza törkölyből tártam fel pektint. Összehasonlításként pektin kinyerési vizsgálataimat a gyümölcsökre is kiterjesztettem.

Célom volt, hogy egy olyan egyszerű és hatékony megoldást találjak, amely lehetővé teszi, hogy jó hatásfokkal és megfelelő tisztaságban tudjunk pektint kinyerni. A különböző citrus és alma pektinek nagyon könnyen beszerezhetőek, alkalmazásuk széles körben elterjedt, ugyanakkor a bogyós gyümölcsökből, törkölyökből nyert pektinnel nem találkozhatunk a boltok polcain.

Ahhoz, hogy a legnagyobb mennyiségű pektint lehessen kinyerni, többféle módszert is megvizsgáltam, majd a kapott eredményeket összehasonlítottam.

A sejtfalban lévő poliszacharidokat, köztük a pektint savas, semleges, lúgos termikus feltárással [Jördening et al. 2002] lehet oldhatóvá tenni. Az extraktumban található poliszacharidok közül a pektinszerű anyagokat alkoholos kicsapással lehet kinyerni [Kertész 1951]. Az alkoholban oldhatatlan anyagok (alcohol insoluble solids, AIS [Hilz et al. 2005]) többségét a pektinszerű poliszacharidok alkotják. A kicsapást többször elvégezve tisztasági foka javítható. Kutatómunkám első lépéseként a savas, lúgos és vizes feltárási módszereket hasonlítottam össze. Ehhez korábbi, cukorrépa préselt szeletetből történt feltárási kísérleteink tapasztalatai alapján savas (citromsav pH=3), lúgos (NaOH pH=9) és semleges pH-jú desztillált vizes extrakciót alkalmaztam.

Az extrakciós méréseket 60 °C ill. 100 °C hőmérsékleten is elvégeztem. A 60 °C-n végrehajtott mérések jóval kisebb pektin kinyerést eredményeztek, mint a 100 °C-osak. Az extraktumot ezután (3.3.1. ábra) membrános eljárással ill. vákuumbepárlással (rotadeszt) koncentráltam, s a 25-30 % szárazanyag tartalmú vizes

oldatból azonos tömegű etanollal kicsaptam a pektint. A pektin csapadékot leszűrtem, vákuumszárító segítségével a maradék etanolt eltávolítottam, majd a pektint vízben feloldva a kicsapást megismételtem. Minden kiinduló anyagból legalább három párhuzamos mérést végeztem.

A magasabb hőfokon végzett méréseknél leghatékonyabbnak a savas feltárás mutatkozott, de nem sokban maradt el tőle a semleges körülmények alatt végzett feltárás sem, aminek az oka az lehet, hogy a gyümölcs törkölyök pH-ja eleve igen savas volt.

Így a további feltárásokat desztillált vizes extrakcióval végeztem. A 4.1.1. táblázatban a különböző forrásokból kinyert pektinre vonatkozó adatokat foglaltam össze. Az adatok minden esetben a kiinduló anyag 100 g tömegére vonatkoznak.

4.1.1. táblázat: A pektinkinyerés során nyert adatok

Pektin forrás	g kinyert pektin/ 100 g kiindulási anyag	pektin tartalom [%]	irodalom
fekete ribizli	1,4±0,4	1,37-1,79	<i>Lampitt et al. 1928</i>
fekete ribizli törköly	1,1±0,3	n.a.	
piros ribizli	1,3±0,3	0,91-1,5	<i>Lampitt et al. 1928</i>
piros ribizli törköly	0,95±0,2	n.a.	
málna	1±0,3	0,58-1,86	<i>Lampitt et al. 1928</i>
málna törköly	0,9±0,4	n.a.	
szeder	1,4±0,5	0,68-1,89	<i>Lampitt et al. 1928</i>
szeder törköly	1,2±0,3	n.a.	
bodza	3,1±0,6	3,96	<i>Vulić et al. 2008</i>
bodza törköly	2,9±0,6	n.a.	

Összehasonlításként a gyümölcstörkölyök mellett a gyümölcsöknél mért mérési eredmények is szerepelnek a táblázatban, valamint az irodalomban talált pektin tartalom adatok is. Ahogy az várható volt, a gyümölcstörköly esetén, valamivel kisebb pektin hozamot kaptunk, mint a gyümölcsöknél. A kinyert pektinre vonatkozó átlag adatok mellett feltüntetett szórás értékek viszonylag magasak, ez az eljárás összetettségének tulajdonítható. A táblázatból látható, hogy pektintartalomra vonatkozó irodalmi adatok meglehetősen tág határok közt változnak. Így nem tűnt szélszerűnek ezekre vonatkoztatva extrakciós hozam értékeket számítani. Ehelyett a kinyert pektineket

további analitikai vizsgálatoknak vetettem alá. Első lépésként enzimes hidrolízist végeztem, hogy az összes galakturonsav tartalmat meghatározzam. Ezután az egyes pektineket trifluorecetsavval kezeltem, s a lebontás után a monoszacharid komponenseket HPLC-vel határoztam meg. Ennél az elemzésnél csak a semleges monoszacharidok határozhatók meg, a galakturonsav nem jelenik meg.

A fekete és piros ribizli törkölyből kinyert pektinek esetén végeztem el az összetételi vizsgálatokat, továbbá – összehasonlításként – kereskedelmi forgalmú citrus pektinnél is. Az eredményeket a 4.1.2. táblázat mutatja.

4.1.2. táblázat: A különböző forrásokból előállított pektinek monoszacharid összetétele

pektin	galakturonsav	ramnóz	arabinóz	mannóz	glükóz/galaktóz
	tömeg %				
fekete ribizli törköly	37,1±7,2	7,4±2,3	5,7±1,9	15,4±3,4	31,4±7,5
piros ribizli törköly	49,7±7,9	0,2±0,05	2,3±0,7	16,0±4,2	25,3±7,1
citrus	50,3±8,2	1,2±0,4	8,7±2,1	11,9±2,3	25,5±6,4

A különböző forrásokból kinyert pektin galakturonsav tartalma tág határok között változhat, pl. citrus pektin esetén pl. 46 – 78 tömeg % [Iglesias, 2004], napraforgó pektinnél 53 – 80 tömeg % [Iglesias, 2004], alma törkölynél 33 – 43 tömeg % [Marcon, 2005], fekete ribizlinél 20-51 tömeg % [Hilz, 2005]. Az általunk meghatározott adatok is e tartok is e tartományon belül vannak. A galakturonsav mellett jelenlévő semleges monoszacharidok koncentrációja is jellemző az egyes pektinre. Az általánosan előforduló monoszacharidok: arabinóz, ramnóz, galaktóz, glükóz, mannóz, fukóz és xilóz. A monoszacharid összetételt nagymértékben befolyásolják a kinyerési körülmények. A szakirodalomban a bogyósok közül csak a fekete ribizliből kinyert pektinre találtam monoszacharid összetételi adatokat [Hilz, 2005]. Ezek szerint a friss gyümölcsből nyert, alkoholban oldhatatlan frakcióban a glükóz tartalom (20 mol%) a legnagyobb, ezt követi a mannóz (13), ill. az arabinóz (11), majd a galaktóz, xilóz (6-6 mol%). A ramnóz illetve a fukóz tartalom elenyésző.

A táblázat egyes soraiban szereplő adatok összegezve nem adják ki a 100 %-ot, ez a kétféle eljárás összeadódó hibáinak következménye. A meghatározásokhoz (legalább) három párhuzamos mérést végeztem, ezek átlaga és a szórás látható a táblázatban. Ez utóbbi értéke több esetben meglehetősen magas, ez a többlépéses kinyerés, illetve meghatározási módszernek tulajdonítható. A fekete és piros ribizli

pektinnél a galakturonsav tartalom kisebb, mint a citrusnál. A semleges monoszacharidok közül xilóz illetve fukóz jelenlétét nem tudtam kimutatni. A HPLC meghatározásnál alkalmazott anioncserélő oszlop a glükóz és a galaktóz mérését bizonytalaná tette, mivel e két komponens ilyen körülmények között epimerizálódhat, így ezek összegzett %-os eredményét tüntettem fel a táblázatban. A mannóz esetén mindkét ribizli fajtánál magasabb értékeket kaptam, mint a citrusnál, arabinóznál pedig alacsonyabbakat. Kiugróan magas a ramnóz tartalma a fekete ribizli törkölyből kinyert pektinnek.

A pektinek fehérje tartalmát Folin-módszerrel vizsgáltuk, s kiderült, hogy 2,5-4,5 %-ban jelen van fehérje is. A kinyert pektinek – a kereskedelmi forgalomban kapható fehér színű citruspektintől eltérően – színesek, tehát színanyagokat is tartalmaznak. Ezek a vegyületek is megjelennek tehát az összetételi adatok között (a színes komponensek ezen felül jelentősen megnehezítik pl. a fehérjék, vagy keményítő kimutatását).

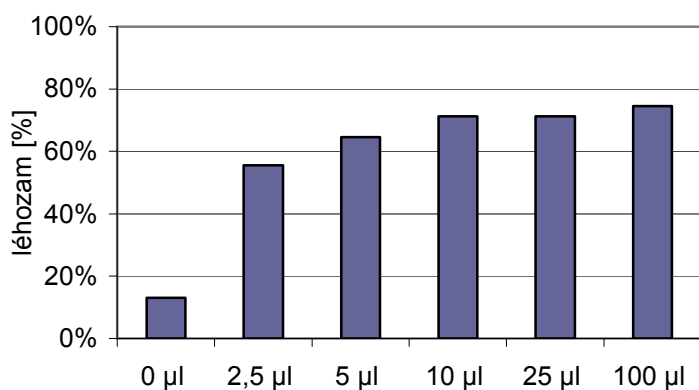
Ezek az egyéb komponensek azonban nem tesznek ki többet az adott pektin készítményben, mint 10-15 %, s ez – amint az a következőkben kiderül – számottevően nem befolyásolja a pektin legfontosabb tulajdonságát, a gélképzést.

4.1.2. Enzimes előkezelés és gyümölcslé hozam optimalizálás

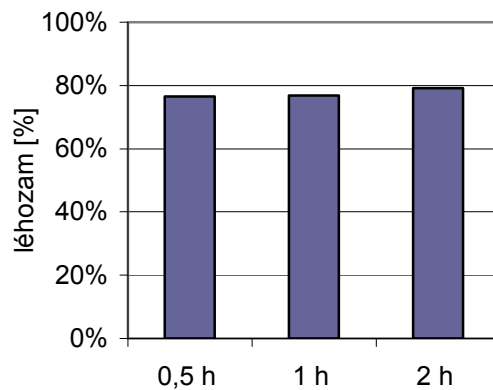
A pektináz enzimek készítményeket gyümölcslé hozam növelő hatása miatt már régóta alkalmazzák az iparban [Alkorta et al. 1997; Kashyap et al. 2001]. Azt azonban, hogy hazai ipari partnerünk (Fitomark '94 Kft., Tolcsva) adott fajtájú bogyós gyümölcsöknek (piros és fekete ribizli, málna, szeder) lényerésénél melyik kereskedelmi forgalmú pektináz készítményt célszerű felhasználni, enzim-optimalizálási kísérlet sorozattal kívántuk eldönteni a kutatómunka keretein belül. Úgy érzem, hogy ez a fajta kutatás-fejlesztési munka fontos eredményekkel járult hozzá a téma, ill. projekt megvalósításához, noha nem tekinthető szigorú értelemben vett új tudományos eredménynek, így a tézisek között nem szerepeltetem.

Vizsgálataimban három különböző komplex enzimek készítmény hatását vizsgáltam meg a léhozam javításának érdekében és gazdasági szempontból egyaránt.

Pectinex Ultra SP-L: A méréseket először állandó hőmérsékleten (40 °C) és 1 óra rázatási idő alatt hajtottam végre. Ahogy az 4.1.1. ábrán is látható, 2,5 µl enzimek készítménnyel való kezelés már látványos eredményhez vezet, ugyanakkor 50 µl feletti enzimmennyiség már nem növelte tovább a léhozamot. A rázatási idő növelésével (4.1.2. ábra) nem nőtt arányosan a léhozam. Fél óra inkubálás után 76,5%-os léhozamot, míg két óra inkubálásnál is csak 79,2%-os léhozamot sikerült elérni.



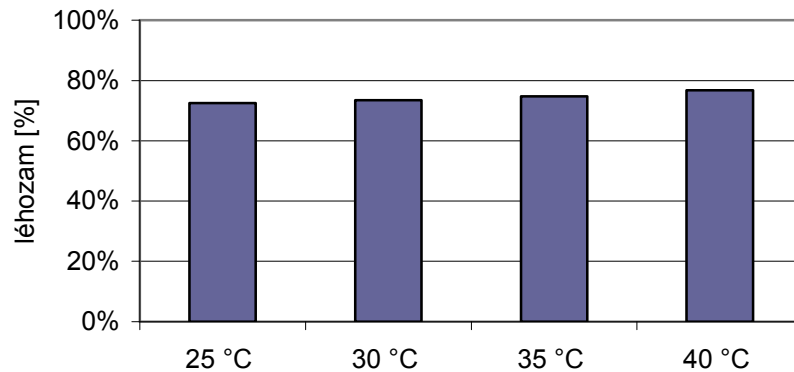
4.1.1. ábra: Az enzimek koncentráció hatása a léhozamra (40 °C, 1 óra, 200 rpm, Pectinex Ultra Sp-L)



4.1.2. ábra: A rázatási idő hatása a léhozamra (40 °C, 200 rpm, 50 µl Pectinex Ultra Sp-L)

A hőmérséklet változtatása kis mértékben befolyásolta az eljárás hatékonyságát. A 4.1.3. ábra is azt mutatja, hogy a hőmérsékletet növelésével kissé javul a léhozam. A gyakorlatban gyakran nincs mód a hőmérséklet szabályozására, ugyanakkor ezt az

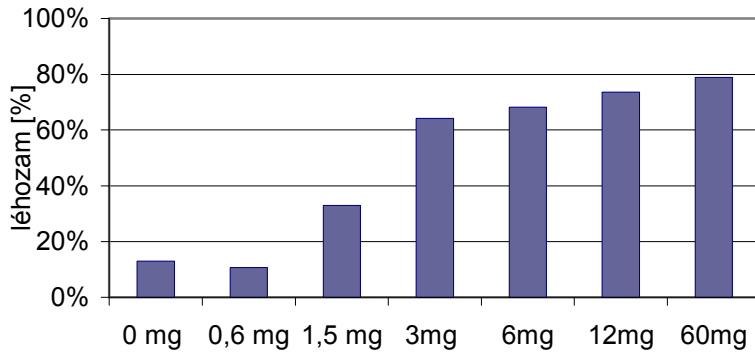
enzimet bátran alkalmazhatjuk alacsonyabb hőfokon is, mivel aktivitása nem csökken lényegesen.



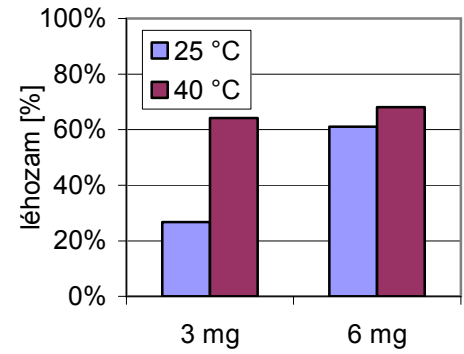
**4.1.3. ábra: A hőmérséklet hatása a léhozamra
(200 rpm, 50 µl, 1 óra, Pectinex Ultra SP-L)**

Mycrozyme 200: Ez egy közismert, borászati szakboltokban beszerezhető enzimekészítmény. Mivel a borok és mustok pH értéke 2,8 - 3,5 értékhatárok között mozog, úgy gondoltam, hogy alkalmazható lehet piros ribizli kezelésére is, annak hasonló savassága miatt (pirosribizli: 2,7 pH, fekete ribizli: 3 pH, málna: 3 pH, szeder: 4 pH).

A gyártó által javasolt mennyiség 0,5-2 g/hl szőlőmust. Ebben a koncentrációban adagolva a piros ribizli péphez, nem tapasztaltam javulást a léhozamban, így a következő lépésben tízszeresére növeltem az enzimekoncentrációt. A 4.1.4. ábrán is megfigyelhető, hogy a megnövelt enzimekoncentráció már jelentős mértékben javította a piros ribizli pép szűrhetőségét és növelte a léhozamot. Alacsonyabb hőfokon (25 °C) ez az enzim jóval kisebb aktivitást mutatott, mint a korábban vizsgált Pectinex Ultra SP-L (4.1.5. ábra).

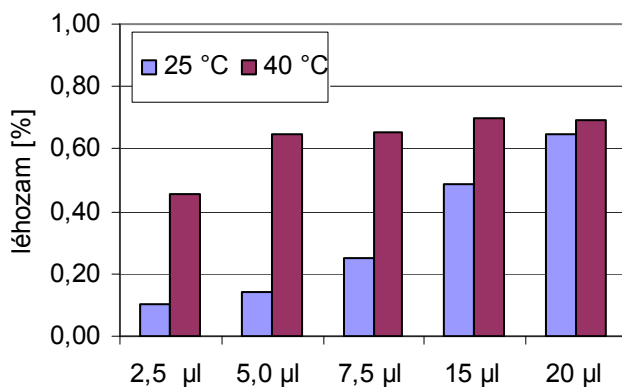


4.1.4. ábra: Az enzimkoncentráció hatása a léhozamra (40 °C, 1 óra, 200 rpm, Mycrozym)

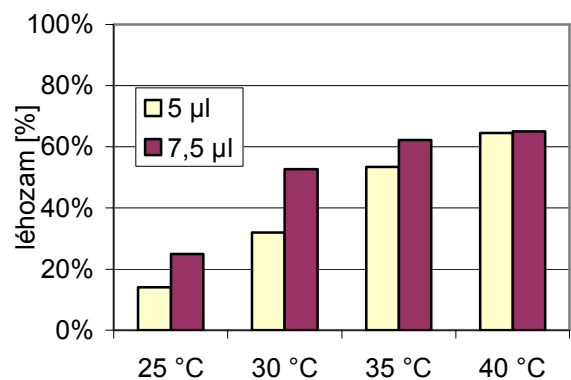


4.1.5. ábra: Két különböző hőmérsékleten végzett mérés összehasonlítása (1 óra, 200 rpm, Mycrozym)

Pektopol PT-400: A gyártó által ajánlott dózis 100-200 g enzim/t piros ribizli pép, a kezelési hőfok pedig 40-50 °C. Ezt a dózist, 5 µl nem hígított enzimet, alkalmazva 40 °C-on történő kezelésnél 64,6 százalékos léhozamot értem el, ugyanakkor tovább növelve az enzimkoncentrációt számottevő javulást már nem figyeltem meg. A méréseket megismétem 25 °C is, a kapott eredmények a 4.1.6. ábrán láthatók. A 4.1.7. ábra jól mutatja, hogy az enzim aktivitása szobahőmérsékleten jóval alacsonyabb, mint 40 °C hőmérsékleten. Ha az enzimet termosztálás nélkül szeretnénk alkalmazni, akkor célszerű kb. 2,5-3-szor több enzimmennyiséget adagolni a gyümölcspéphez, mint amennyit a gyártó javasol.



4.1.6. ábra: Az enzimkoncentráció hatása a léhozamra (1 óra, 200 rpm, Pektopol Pt-400)

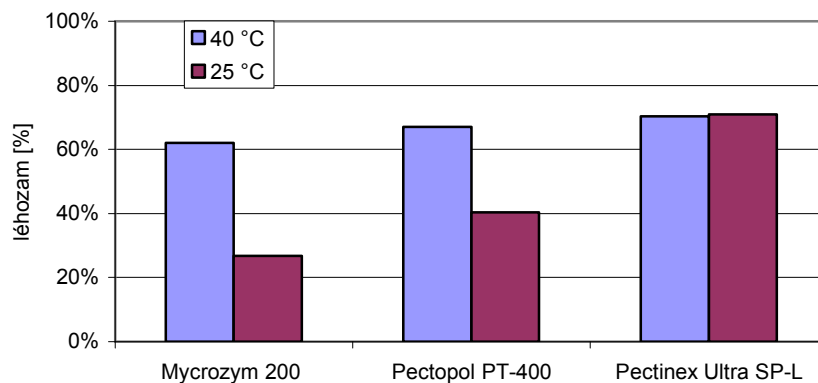


4.1.7. ábra: A hőmérséklet hatása a léhozamra (1 óra, 200 rpm, Pektopol PT-400)

A három enzimekészítmény összehasonlítása:

Az enzimekészítményeknek összehasonlíthatónak kell lenniük ahhoz, hogy biztonsággal meg tudjuk állapítani, melyik a legalkalmasabb a piros ribizli pép kezelésére. Mivel a három alkalmazott enzim közül csak a Pektopol PT-400-nak az aktivitás adata áll rendelkezésemre, úgy döntöttem, hogy egy másik szempont szerint teszek köztük különbséget. Mivel az enzimek fehérjék, jó alternatívának tűnt a különböző enzimekészítmények fehérjetartalmának meghatározása.

A fehérje-meghatározást Folin reagenssel végeztem. Arra az eredményre jutottam, hogy a Pektopol PT-400 (240,14 mg fehérje/ml enzim) fehérje tartalma közel háromszorosa a Pectinex Ultra SP-L (87,96 mg fehérje/ml) enzim fehérjetartalmának. A Mycrozymet tiszta fehérjének lehet tekinteni, illetve $\text{mg}_{\text{fehérje}}/\text{ml}$ enzim koncentrációban nem tudtam feltüntetni, mivel egy por alakú enzimekészítményről van szó.



**4.1.8. ábra: Az enzimekészítmények összehasonlítása
(3 mg fehérjének megfelelő enzimekészítmény, piros ribizli pép, 1 óra, 200 rpm)**

A 4.1.8. ábrán azonos fehérjetartalom mellett végzett mérések eredményeit tüntettem fel. A 40 °C-on végzett kísérletek között lényeges különbséget nem lehetett megfigyelni. Mycrozym 200-zal 62%-os léhozamot, Pektopol PT-400-zal 67,1%-os léhozamot, míg Pectinex Ultra SP-L-lel 70,4%-os léhozamot tudunk elérni. Számottevő különbséget csak a szűrések időtartama között tapasztaltam. Míg a Pectinexszel és a Pektopollal kezelt piros ribizli pillanatok alatt leszűrődött, addig a Mycrozymmlel kezelt ribizlinek 10 perc szűrési idő kellett. A 25 °C-on egyértelműen a Pectinex Ultra SP-L működik legeredményesebben, a hőmérséklet csökkenésével sem változott az aktivitása. Ezzel szemben a másik két enzimmél jelentős aktivitáscsökkenést lehet megfigyelni.

Egy másik lényeges szempont az enzimek ára (2006-ban érvényes árak) és beszerezhetősége.

A Mycrozyme 200 Magyarországon kereskedelemben kapható 38274 Ft/kg-os egységáron, azonban már 50 g-os kiszerelésben is beszerezhető, melynek ára 1915 Ft.

A Pectopol PT-400 enzimeket Lengyelországból lehet beszerezni. Az 500 ml-es kiszerelés ára 35 zl + postaköltség.

A Pectinex Ultra SP-L 500 250 ml-es kiszerelésben 159 €-ba kerül.

4.1.3. táblázat: 1 kg piros ribizli feldolgozásához szükséges enzim mennyisége és ára

Enzim	25 °C		40 °C	
Pectinex Ultra SP-L	170 µl/kg	25,2 Ft	170 µl/kg	25,2 Ft
Pektopol PT-400	670 µl/kg	3,4 Ft	170 µl/kg	0,87 Ft
Mycrozym 200	300 mg/kg	11,5 Ft	100 mg/kg	3,83 Ft

A 4.1.3-as táblázatban azt a minimális enzimmennyiséget tüntettem fel, ami ahhoz szükséges, hogy legalább 65 százalékos léhozamot érjünk el. A táblázatból is kitűnik, hogy a leggazdaságosabb, ha a választásunk a Pektopol PT-400-ra esik. Az összehasonlíthatóság érdekében Ft-ban tüntettem fel az árakat.

A megfelelő enzim kiválasztásakor a hatékonyság mellett még meghatározó tényező volt a könnyű beszerezhetőség és a kedvezőbb ár. Ezen szempontokat figyelembe véve a Pektopol Pt-400 enzimeket bizonyult a legalkalmasabbnak a gyümölcspekpek kezelésére, a többi gyümölcs kezelésénél ezt használtam.

A fekete ribizli pektin tartalma ~1,8 g/100 g friss gyümölcs, ami magasabb a piros ribizli pektin tartalmánál (0,8 g/100 g friss gyümölcs) [Hilz et al. 2005]. A két gyümölcs szárazanyagra nézve közel egyenlő (~22%). Ezeket az információkat figyelembe véve végeztem a méréseket.

A gyártó javaslata szerint kb. 10 µl enzim szükséges 30 g fekete ribizli kezeléséhez ahhoz, hogy megfelelő léhozamot érjünk el. A mérések során azonban ez a mennyiség kevésnek bizonyult, a gyári koncentráció háromszorosa volt csak hatásos. Míg 10 µl enzim/30 g fekete ribizli koncentrációnál 27,5%-os léhozamot értem el, addig 30 µl/30 g fekete ribizli koncentrációnál már 61,5%-os léhozamot kaptam.

Málna kezelésekor a leirat szerint kb. 40 µl enzimet szükséges 30g gyümölcshöz a megfelelő léhozam elérése érdekében, ez azonban szintén kevés volt, a gyári

koncentráció ötszöröse volt csak hatásos. Amíg 4 µl enzim/30 g málna koncentrációnál 19,3%-os léhozamot értem el, addig 20 µl/30 g fekete ribizli koncentrációnál már 69,6%-s léhozamot kaptam.

A szeder enzimes kezelésére nem ad információt a leirat. Először szobahőmérsékleten rázattam a gyümölcsöt eltérő enzimkoncentrációk mellett. A maximális léhozam kb. 57-59% volt 25 °C-on 30 µl enzim/30 g gyümölcs illetve 40 °C-on 20 µl enzim/30 g gyümölcs koncentrációk mellett.

4.1.4. Táblázat: 1 kg gyümölcs feldolgozásához szükséges enzim mennyisége és ára

Gyümölcsök	25 °C		40 °C	
	Enzim koncentráció (µl/kg)	Ár(Ft)	Enzimkoncentráció (µl/kg)	Ár (Ft)
Piros ribizli	670	3,4	170	0,87
Fekete ribizli	1670	8,5	1000	5,1
Málna	1000	5,1	334	1,76
Szeder	1000	5,28	667	3,52

A 4.1.4.-es táblázatban a minimális enzimmennyiségeket tüntettem fel, ami ahhoz szükséges, hogy legalább 60 százalékos léhozamot érjünk el. Az ár az egy kilogramm gyümölcs kezeléséhez szükséges enzim mennyiségére vonatkozik.

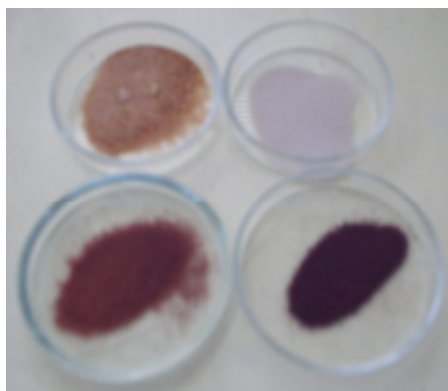
A táblázatból jól kivehető, hogy a legkevesebb enzimre piros ribizli kezeléséhez van szükség.

4.2. Pektinkészítmények jellemzése

Az előállított pektineket további vizsgálatoknak vettem alá, hogy a különböző forrásokból származó pektineket jellemezni tudjam. A kinyert pektin színét a CIE 1986-os szabvány szerint mértem, a színezettségért felelős antioxidáns hatású vegyületeket fotometriás analitikai módszerekkel határoztam meg. A pektinek észterezettségi fokának megállapításához titrálásos ill. FT-IR módszert alkalmaztam.

4.2.1. A pektin porok, oldatok és gélek színkoordinátáinak értékelése

A bogyós gyümölcsökből, törkölyökből származó pektineknek van egy előnye a többi hagyományosan elterjedt pektinnel szemben. Ahogy a fényképen is látszik (4.2.1. ábra), színes termékekről van szó, amely akár előnyt jelenthet a többi színtelen termékekkel szemben. A felhasználás során, pl. zselé készítésekor elkerülhető a mesterséges színező anyagok használata.



4.2.1. ábra: Por alakú alma, cukorrépa, piros és fekete ribizli pektinek

A szín az élelmiszeriparban felhasználásra kerülő termék egyik legfontosabb érzékszervi jellemzője. A feldolgozási folyamat során az adott termék színtartalma sokat változhat, a termék elveszítheti színét. Vizsgálataimban a kiindulási pektinporok és az abból előállított oldatok és gélek színmérését is elvégeztem, és a kapott eredményeket a következőkben foglaltam össze.

Az ábrákon különböző jelölések láthatóak. A C^* vagyis a króma érték a szín telítettségéről nyújt információt. Az L^* jelölés a szín világosságáról ad információt, amit a szem retinájára eső sugárintenzitás határoz meg, a hullámhossztól függetlenül [Lásztity et al. 1987].

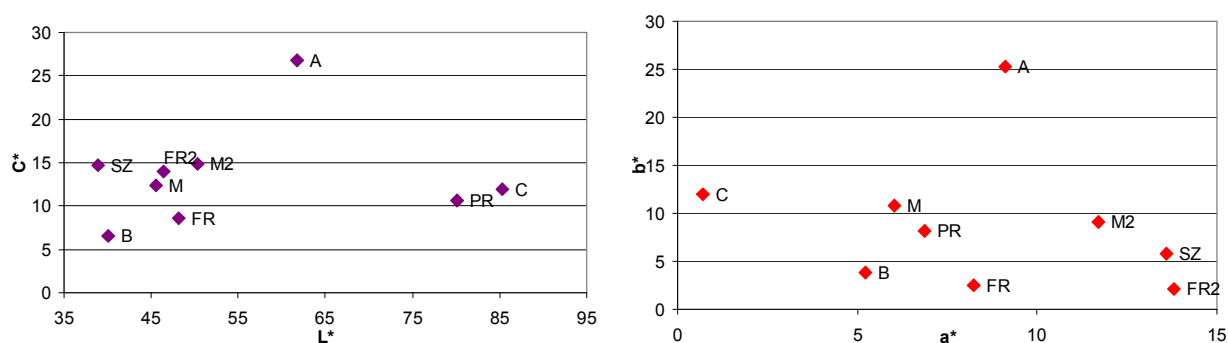
A C^* értéken belül az a^* és b^* koordináták a piros illetve sárga színek részeseződéséről adnak információt, azaz a színárnyalatot tükrözik [Voss 1992].

Az ábrákon használt jelölések:

FR2	Fekete ribizli pektin (vizes feltárás)
FR	Fekete ribizli pektin (mikrohullámú kezelés, Szeged)
B	Bodza (pektin) Szeged
Sz	Szeder pektin
M2	Málna pektin (vizes feltárás)
M	Málna pektin (mikrohullámú kezelés, Szeged)
PR	Piros ribizli pektin
C	Citrus pektin (kereskedelmi)
A	Alma pektin (kereskedelmi)

Pektin porok színkoordinátáinak elemzése:

Az L^* - C^* koordináta rendszerben ábrázolt (4.2.2. ábra) pontok elhelyezkedéséből látható, hogy a szegedi és veszprémi fekete ribizli és málna pektinek, valamint a bodza és szeder pektinek színpontjai egy csoportot képeznek a kis világosságú és alacsony krómájú, tehát sötét szürke, sötét barnás tartományban. A piros ribizli és a kontrollként használt citrus pektin por nagy világossági tényezőjű és mellette alacsony krómájú. A szintén kontrollnak használt alma pektin pora jelentősen sötétebb a citrusnál és színezetdúsabb is, ami egy jelentős b^* sárga koordináta értékben jelentkezett mérésnél.

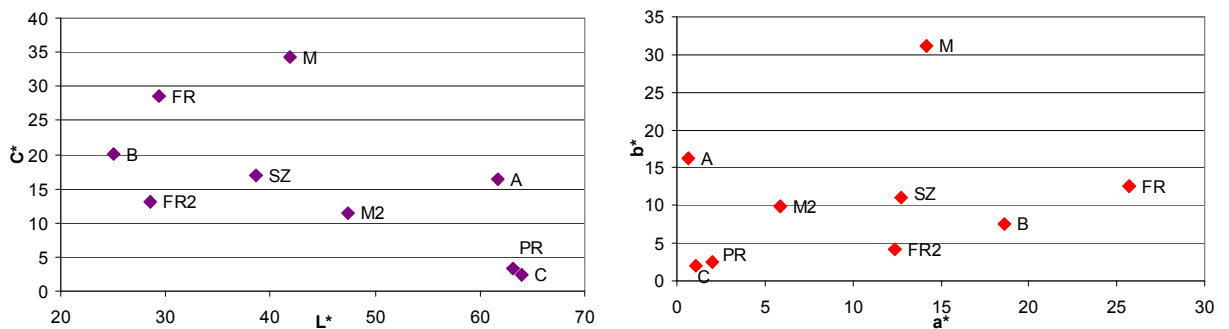


4.2.2. ábra: A különböző pektin porok színkoordinátáinak ábrázolása

1%-s pektin vizes oldatok színkoordinátáinak elemzése:

Az L*-C* ábra (4.2.3. ábra) alapján látható, hogy a minták közül a piros ribizli és a kontroll citrus pektin oldat csaknem azonos értékű nagy világosságú minta, nagyon alacsony krómával, tehát ebben a rétegvastagságban, ebben a koncentrációban áttetsző.

Az almapektin oldatának világosság mértéke hasonló a citrus pektinéhez, egy kicsit nagyobb króma mellett, amit itt is a sárga koordináta értékének nagyságából ered. A 6 sötét színű pektin oldat ebben a koncentrációban és rétegvastagságban színesebb, kisebb világosságú, tehát sötétebb.



4.2.3. ábra: A különböző pektinoldatok színkoordinátáinak ábrázolása

A 4.2.4. ábrán a különböző forrásokból előállított pektinek 1%-os oldatáról készített kép látható.

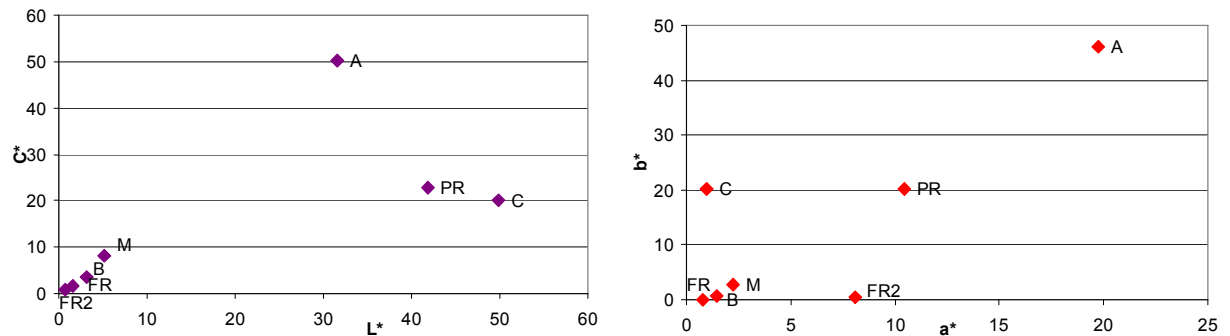


4.2.4. ábra: Különböző pektinekből előállított 1%-os oldatok

A különböző pektinekből előállított gélek színkoordinátáinak elemzése:

A szegedi és veszprémi fekete ribizli, bodza, málna pektinek géljei sötétek és alacsony krómájúak (4.2.5. ábra). Az alma gélje kevésbé sötét, jelentősen nagyobb színezettel. A piros ribizli pektin gélje nagy világosságú, alacsony színezetű.

A kontrollként mért citrus pektin gélje a legvilágosabb és hasonlóan alacsony színezetűségű, mint a piros ribizli pektinből készített gél.



4.2.5. ábra: A különböző pektinekből előállított gélek színkoordinátáinak ábrázolása

A 20 egységnyi krómájú (C*) piros ribizli 10 egységgel nagyobb piros koordinátával (a*) rendelkezik a hasonló színezetűségű citrus pektin géljéhez képest.

Bár az L*-C* alapján mindkettő nagyon világos és áttetsző 1 cm rétegben fehér háttérnél, de az a*- b* ábra mégis kimutatja, hogy míg a citrus pektinből készített gél inkább sárga (b*=20, a* csaknem nulla), addig a szintén áttetsző kis színezetűségű piros ribizli pektin gél rózsaszín.

A 4.2.6. ábrán a pektinekből készített gélek fotója látható. Különösen a fekete ribizli és bodza pektinből előállított gélek színezete érdemel említést.



4.2.6. ábra: Különböző pektinekből előállított gélek

A színjellemzés összefoglalásaként a 4.2.1-es táblázatba tüntettem fel a különböző pektin porok, gélek és oldatok számított színezeti szög értékeit. A 0 fokos színezeti szögnek a vörös-lila, a 90 fokosnak a sárga, a 180 fokosnak a kékeszöld valamint a 270 fokosnak a kék szín felel meg.

4.2.1. Táblázat: A vizsgált pektin porok, oldatok, és gélek színezeti szög értékei

pektin	h_{ab} por	h_{ab} oldat	h_{ab} gél
Mikrohullámú kezelés:			
Fekete ribizli	16,82	26,06	2,12
Bodza	36,54	21,96	27,95
Málna	60,79	65,48	51,56
Piros ribizli	49,7	51,28	62,62
Citrus	86,68	62,99	87,30
Alma	70,14	87,65	66,82
Vizes feltárás:			
Fekete ribizli	8,63	18,85	3,87
Málna	37,95	59,22	-
Szeder	23,04	41,04	-

Az adatok jól mutatják, hogy a porok, oldatok és gélek színezete a vörös-lila és sárga színárnyalatok közé esik, valamint a feketeribizli és bodza pektinek színezetét a

vörös-lila színárnyalatokkal lehet jellemezni ellentétben a kereskedelemben kapható pektinek (alma, citrus) színezetével, amelyek a sárga színárnyalattal jellemezhető.

Ez az eredmény, valamint az oldatokról és gélekről készült fotók mindenképpen arra engednek következtetni, hogy egy esetleges élelmiszerben (pl. zselés cukor, tortazselé) való felhasználásnál feleslegessé válhat a különböző (mesterséges) színezőanyagok hozzáadása a termékhez, mivel azt - természetes módon - tartalmazza a pektin.

4.2.2 Antioxidáns aktivitás, összes fenol és antocianin tartalom

A színes gyümölcstörkölyökből kinyert pektinek színezékei – feltételezésem szerint – antioxidáns aktivitással rendelkeznek, így azon felül, hogy természetes színezékek, előnyös hatású lehet emberi fogyasztásuk is. Az ilyen irányú kutatás [International Berry Health Benefits Symposium 2007] nem új keletű és számos tudományos eredményt adtak már közre az antocianinok egészséget kedvezően befolyásoló (rákmegelőző, öregedést késleltető, gyulladáscsökkentő, stb.) tulajdonságairól.

Ahhoz, hogy megbizonyosodjak az új pektinkészítményekben található színanyagok tényleg antioxidást hatással rendelkeznek, egy mérésorozatot végeztem. Az antioxidáns aktivitás meghatározásához az ún. FRAP módszert alkalmaztam, s emellett mértem az egyes minták összes fenol és antocianin tartalmát is. A meghatározásokat a színes pektin mintákon kívül – összehasonlítás céljából – elvégeztem a kiindulási gyümölcsökre is. Az eredményeket a 4.2.2. táblázat összegzi. A táblázatban feltüntettem néhány szakirodalmi adatot is, amelyek a gyümölcsökre, ill gyümölcslevekre vonatkoznak.

4.2.2.táblázat: Antioxidáns (FRAP), fenol és antocianin tartalomra vonatkozó adatok

Minta	FRAP	Összes fenol	Antocianin
Fekete ribizli lé (Bánvölgyi, 2009)	21,76 mmol AS/l	2,5 g GAE/l	1,79 g/l
Fekete ribizli lé	6,2 mmol (1,1 g) AS/l	0,7 g GAE/l	1,38 g/l
Fekete ribizli (Buchert, 2005)			1,5 mg/g gyümölcs
Pektin fekete ribizli törkölyből	32 mg AS/g	35 mg GAE/g	0,4 mg/g
Piros ribizli (Pantelidis, 2007)	60,2-63,3 μ mol AS/g száraz anyag	1,1-1,2 g GAE/100g száraz anyag	7,5 mg/ 100 g gyümölcs
Piros ribizli lé	1,3 mmol (240 mg) AS/l	0,67 g GAE/l	430 mg/l
Pektin piros ribizli törkölyből	90 mg AS/g	80 mg GAE/g	0,4 mg/g

A táblázatban szereplő adatokat igen nehéz összevetni, hiszen az előkezelési eljárást nem mindenütt írják le a szerzők kellő alaposággal ráadásul a koncentráció adatok vonatkoztatási alapja sem mindenütt egyértelmű. A fekete ribizlire vonatkozó antioxidáns (FRAP) és összes fenol tartalomra mindössze egyetlen adatot találtam, ehhez hasonlítva az általam a fekete ribizli lére meghatározott értékek jóval alacsonyabbak. Az antocianin tartalom viszont jó egyezést mutat. A piros ribizli esetén még bizonytalanabb irodalmi értékekkel találkoztam.

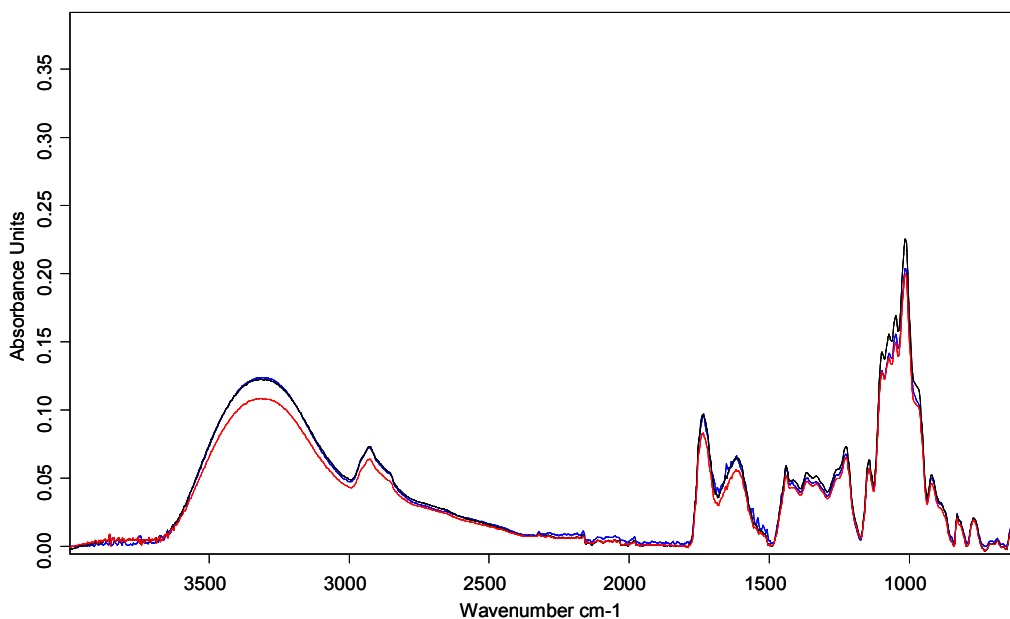
A fekete és piros ribizli törkölyből kinyert pektinekben is meghatározható volt mindhárom érték, ami azt jelenti, hogy feltevésünk beigazolódtott: a pektinben jelenlevő színyanyagok nagy része antioxidáns tulajdonságú, s a fenol illetve antocianin típusú vegyületek közé sorolható.

4.2.3. Az észterezettségi fok meghatározása

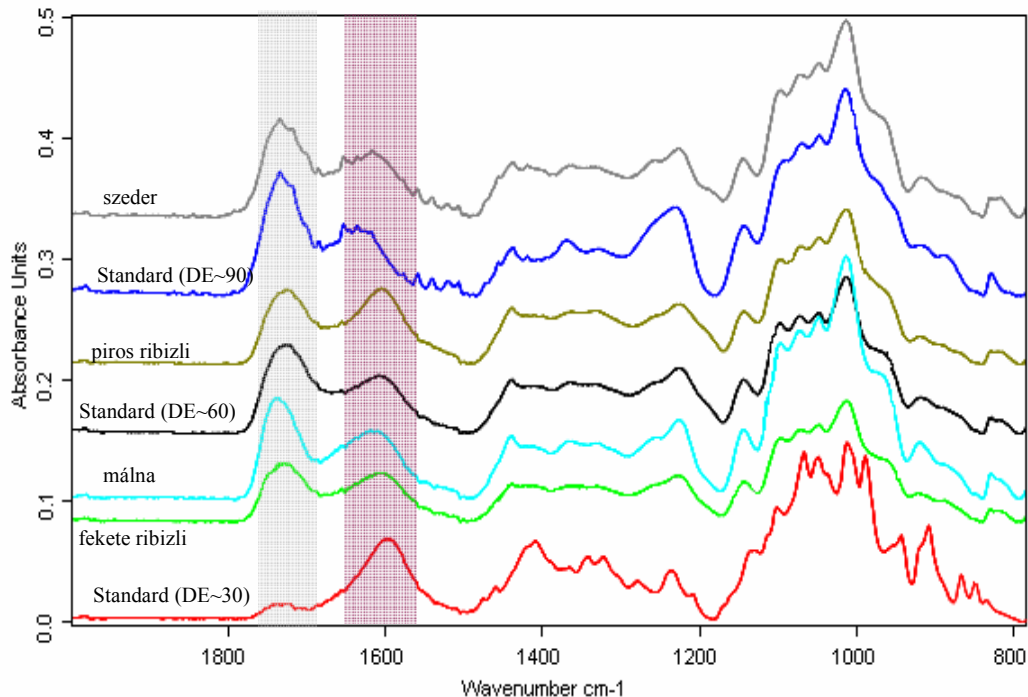
Ahhoz, hogy a pektint az iparban, mint zselésítő, sűrítő anyag fel lehessen használni, nélkülözhetetlen az adott pektin észterezettségi fokának ismerete.

Amint korábban már leírtam, a pektinek feltárása magas hőfokon rövid ideig történt, illetve a feltárás során nem alkalmaztam sem savas, sem lúgos körülményeket. Ez azért is fontos információ, mivel a magas hőmérséklet és alacsony pH [Yapo et al. 2007] nagymértékben befolyásolja a feltárt pektin minőségét. Kutatók [Levigne et al. 2002] azt tapasztalták, hogy savas illetve lúgos körülmények mellett a pektin molekulához kapcsolódó metanol és ecetsav csoportok hidrolizálhatnak, így csökkentve a feltárt pektin észterezettségi fokát.

Az észterezettségi fok meghatározásához a kutató munkám során kétfajta módszert választottam. Az egyik egy egyszerű, szinte bármelyik laboratóriumban elvégezhető titrálós módszer, a másik pedig egy nagyműszeres FT-IR spektrometriás úton történő meghatározás.



4.2.8. ábra: Málnatörkölyből nyert pektin teljes IR-spektruma



4.2.9. ábra: A különböző pektinek FT-IR spektruma az 1800-800 cm⁻¹-es tartományban

A 4.2.8-as ábrán málna törkölyből nyert pektin teljes IR spektruma látható. A 4.2.9-es ábrán a vizsgált pektinek 1800-800 cm⁻¹ tartományban kapott FT-IR spektrumai láthatóak kinagyítva és egymás fölé tolva. A szürke színnel jelült 1730-1760 hullámszámú tartományban található adszorpciós sávért az észterezett karbonil csoportok a felelősek, ugyanakkor a lila színnel jelölt, 1630-1600 hullámszámnál látható sávot a karboxilát ion rezgése okozza.

A 4.2.3. táblázatban adtam meg a különböző pektinek észterezettségi állapotát. Ahol a két módszerrel nyert eredményeket egymás mellett tüntettem fel. A százalékos értékek a teljes poliszacharid molekulára vonatkoznak.

4.2.3. táblázat: A különböző pektinek észterezettségi foka

Pektin forrás	ÉF [%] (FT-IR)	ÉF [%] (titrálás)
Piros ribizli (törköly)	75,8	65
Piros ribizli	85,7	85
Fekete ribizli (törköly)	73,8	68
Fekete ribizli	83,5	77
Szeder (törköly)	81,7	81
Málna (törköly)	78,8	75

A két módszerrel nyert eredményeket összehasonlítva kijelenthető, hogy az FT-IR spektrométerrel mért értékek a magasabbak, valamint ez az eltérés törkölyből nyert pektinek esetében kisebb, illetve nem számottevő.

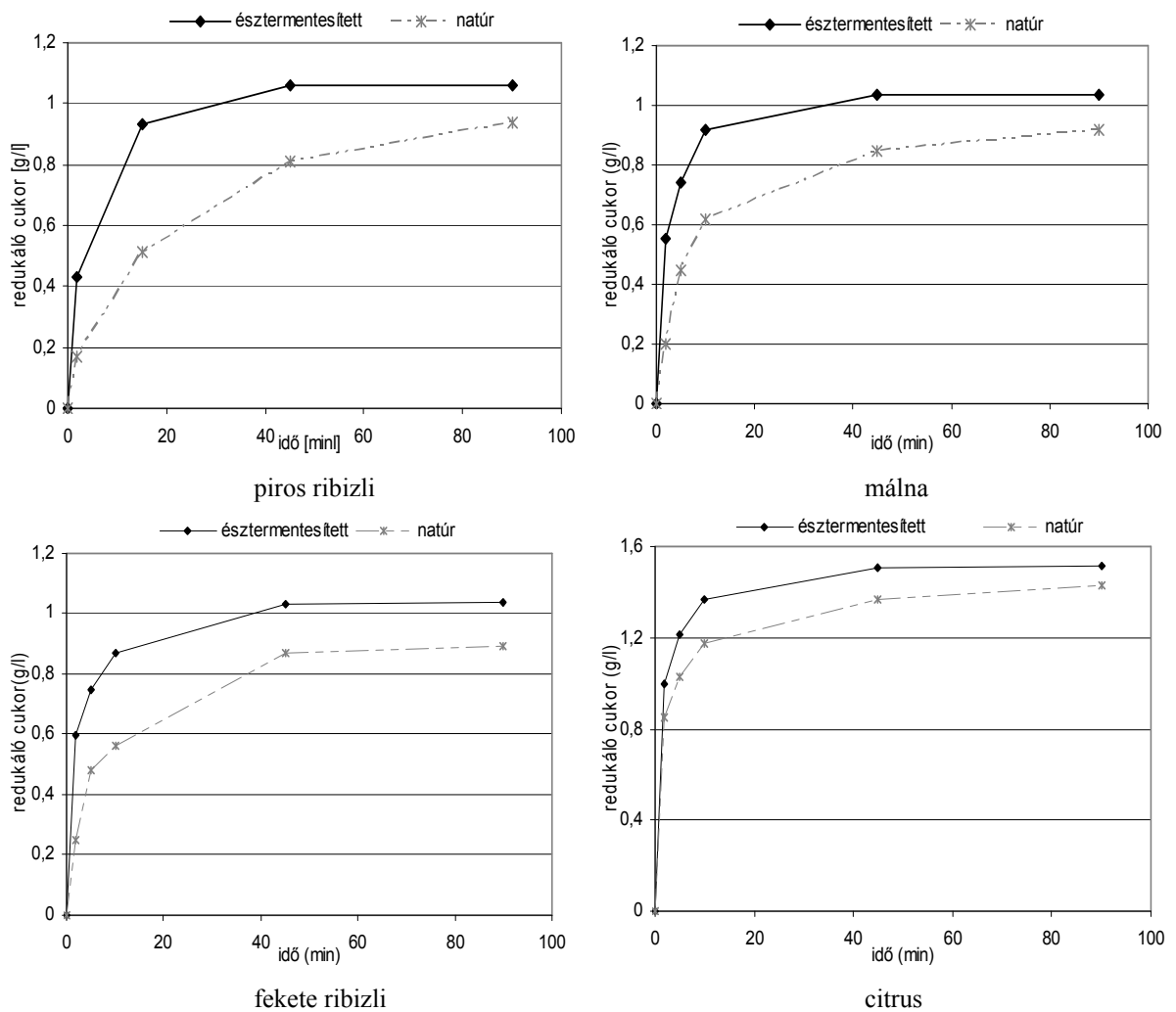
Az enzimes előkezelés hatással volt a pektin észterezettségi fokára is. Az adatok fekete ribizli valamint piros ribizli pektin esetében is azt mutatják, hogy kb. 10%-kal csökkent a feltárt pektin észterezettségi foka abban az esetben, ha a feltárás törkölyből történt, de még ezek a pektinek is magas észterezettségi fokúnak tekinthetők.

Mind a piros és fekete ribizli valamint a málna és szeder pektinek is nagy észterezettségi fokúnak tekinthetők, 50%-os érték felett vannak, ami arra enged következtetni, hogy nem szükséges sók, pl. kalcium ion jelenléte a gélesedési folyamathoz.

Az észterezettségi fok hatása az enzimes lebonthatóságra:

A következő lépésként megvizsgáltam az észterezettségi fok hatását az enzimes lebonthatóságra.

Ahhoz, hogy a mérési eredményeket hitelesen össze tudjam hasonlítani, megvizsgáltam a natúr, tehát nem észtermentesített pektinek enzimes lebonthatóságát is teljesen hasonló reakció körülmények mellett, majd a kapott eredményeket összehasonlítottam. A vizsgált pektinek minden esetben törkölyből származtak.



**4.2.10. ábra: Észtermentesített és natúr pektinek enzim katalitikus lebontása
2,17 g/l, 0,02 g PG enzim**

A diagramokból is (4.2.10. ábra) jól kivehető, hogy bogyós gyümölcs-törkölyökből származó pektinek esetén a poligalakturonáz enzim jóval lassabban bontja a nem kezelt, tehát nagyobb észterezettségi fokú pektint, a kezdeti reakciósebesség sokkal lassabb. A kisebb észterezettségi fokú citrus pektin esetében viszont az észtermentesítésnek nincs jelentős hatása a reakció lefutására.

4.3. A pektin enzimes lebonthatóságának vizsgálata

A pektint bontó enzimeket évtizedek óta sikeresen alkalmazzák az iparban. A pektináz enzimekről kinetikai viselkedésük szempontból azonban még csak nagyon kevés információ áll rendelkezésünkre. A cukorrépa pektin lebontását komplex enzimekészítménnyel már vizsgálták kutatók [Baciu et al. 2004], és arra az eredményre jutottak, hogy termékinhibíció lép fel a reakció során. A termékinhibíció kiméréséhez galakturonsavat adtak a kiindulási reakcióelegyhez, és szintén megvizsgálták a reakció lefutását. Arra azonban nem adtak választ, hogy az enzimekészítményben lévő különböző enzimek (pektin-liáz, poligalakturonáz, pektin-észteráz, hemicelluláz és celluláz) közül pontosan melyiket gátolhatja a keletkező termék. A pektinek lebontásában a poligalakturonázoknak nagy szerep jut, mivel ezek képesek a galakturonsav egységeket összetartó glikozidos kötések hasítására. A vizsgálataim során a hangsúlyt ennek az enzimeknek a vizsgálatára helyeztem.

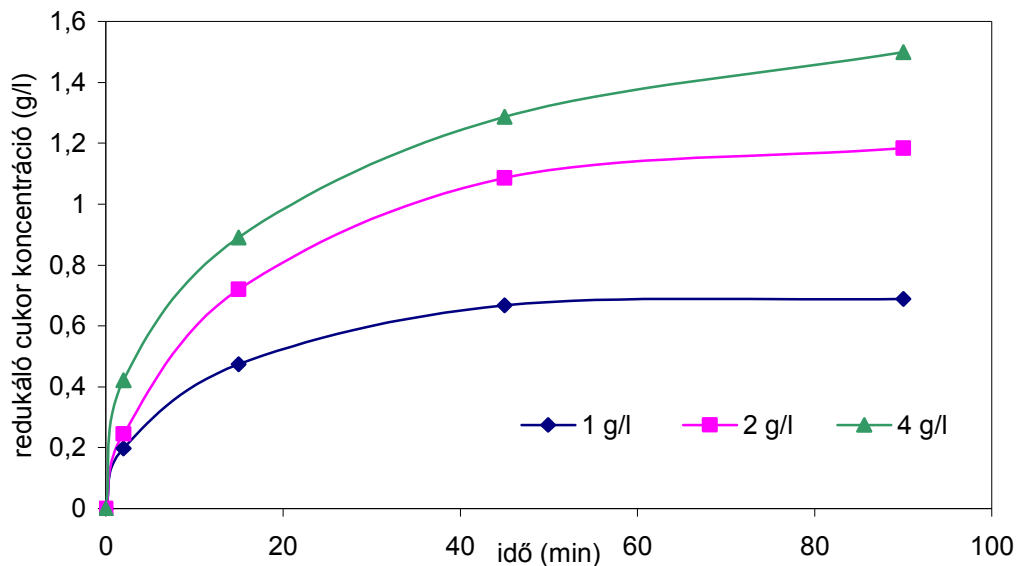
4.3.1. A rázatott lombikos kísérletek értékelése

A pektin enzimes hidrolízise vizes közegű, egy szubsztrátos reakciónak tekinthető. A víz végtelen feleslegben van jelen. A méréseknél alkalmazott enzim tisztított endo-poligalakturonáz volt. Ez az enzimetípus a pektinlánc bármely szakaszán képes kötések hasítására, így előfordulhat, hogy a keletkezett termék nem galakturonsav, hanem oligo-galakturonát lesz. Ezt mindenképpen érdemes figyelembe venni. A reakciók nyomonkövetése redukáló cukor tartalom méréssel történt, ami magában foglalja annak a lehetőségét, hogy a mért redukáló vég nem egy molekulához tartozik, hanem oligo-galakturonsavhoz.

Első lépésben citrussal pektin, mint modell pektin lebonthatóságát vizsgáltam meg, amit piros és fekete ribizlitörkölyből feltárt pektinek hidrolízisének tanulmányozása követett.

A reakciókinetikai vizsgálatokat mind modell pektin (citrussal) mind a saját piros és fekete ribizli törkölyből feltárt pektinek esetében is hasonló mérési körülmények mellett végeztem el. A bogyós gyümölcsökből feltárt pektinokat észterezett és észtermentesített formában is vizsgáltam. A kísérletek bemutatásához a piros ribizli pektin hidrolízisekor kapott eredményeket használtam fel.

A rázatott lombikos mérések eredményei alapján lefutási görbéket vettem fel. A különböző kiindulási szubsztrát koncentrációjú reakcióelegyekben meghatároztam a redukáló cukor tartalmat (galakturonsav) az idő függvényében (4.3.1. ábra).



4.3.1. ábra: A piros ribizlitörköly pektin hidrolízis lefutási görbéi, eltérő kezdeti szubsztrát koncentráció mellett (50 °C, 150 rpm, 1,5 óra reakcióidő, 0,001g/l enzim koncentráció)

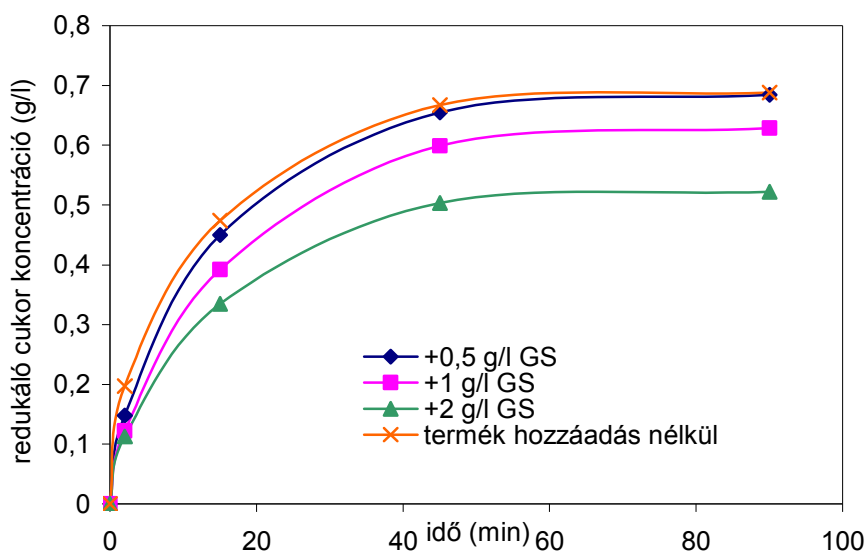
Minden egyes pektin lebontása során nagyobb kezdeti szubsztrát koncentrációnál nagyobb reakció sebességet és nagyobb hozamot figyeltem meg, ugyanakkor azt vettem észre, hogy a kapcsolat a reakció sebesség és a szubsztrát koncentráció között nem lineáris. Növelve a kezdeti szubsztrát koncentrációt a kapott hozamok értéke azzal nem nőtt arányosan. 100%-os konverziót egyik pektin esetében sem lehet elérni, mivel a pektineket nem csak galakturonsav egységek építik fel.

A piros ribizlitörköly pektin példájánál maradva 1 g/l –es kezdeti pektin koncentrációnál közel 65%-os konverziót értem el, míg 4 g/l –es kezdeti szubsztrát koncentrációnál ez az érték lecsökkent közel a felére, azaz 34,7%-ra. Ez a tendencia minden általam vizsgált pektin esetében elmondható. Ezen eredmények is arra engednek következtetni, hogy nagy valószínűséggel inhibíció lép fel a reakció során, így további kísérleteket végeztem.

4.3.2. A termékinhibíció és a kinetikai paraméterek meghatározása

A következő lépésben tehát inhibíciós mérések következtek. A vizsgálat célja az volt, hogy megbizonyosodjak arról, valóban termékinhibíció lép-e fel a reakció során és annak mekkora a mértéke.

Az inhibíció kiméréshez különböző mennyiségű galakturonsavat adtam a különböző kiindulási pektin koncentrációjú elegyhez, és szintén követtem a reakció időbeni lefutását.



4.3.2. ábra: A termékinhibíció tanulmányozása
(1 g/l piros ribizlitörköly pektin, 50 °C, 150 rpm, 1,5 óra reakcióidő, 0,001g/l enzim koncentráció)

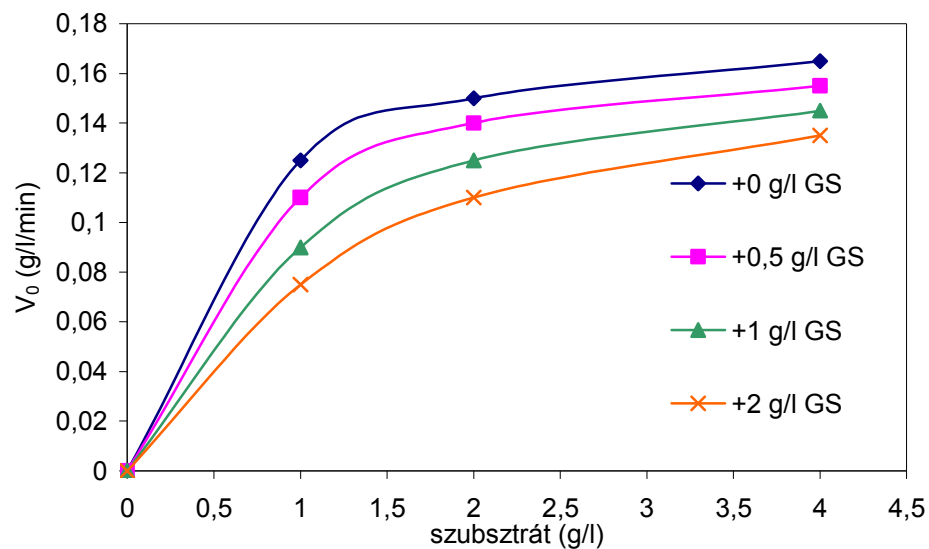
A 4.3.2 ábrán jól látható, hogy a galakturonsavnak jelentős inhibíciós hatása van a reakcióra. Minél több terméket adunk a reakcióelegyhez, annál lassabban játszódik le a reakció, tehát a poligalakturonáz által végzett pektin hidrolízis során termék inhibíció lép fel.

A 4.3.1. táblázatban a különböző kezdeti pektin és hozzáadott galakturonsav koncentráció mellett elért konverziókat tüntettem fel. A táblázatból is jól kivehető, hogy növelve a kezdeti szubsztrát, illetve a hozzáadott kiindulási galakturonsav koncentrációt, az elért konverzió jelentősen csökkent.

4.3.1. táblázat: A mért konverzió értékek piros ribizlitörköly pektin enzim lebontása során (50 °C, 150 rpm, 1,5 óra reakcióidő, 0,001 g/l enzim koncentráció)

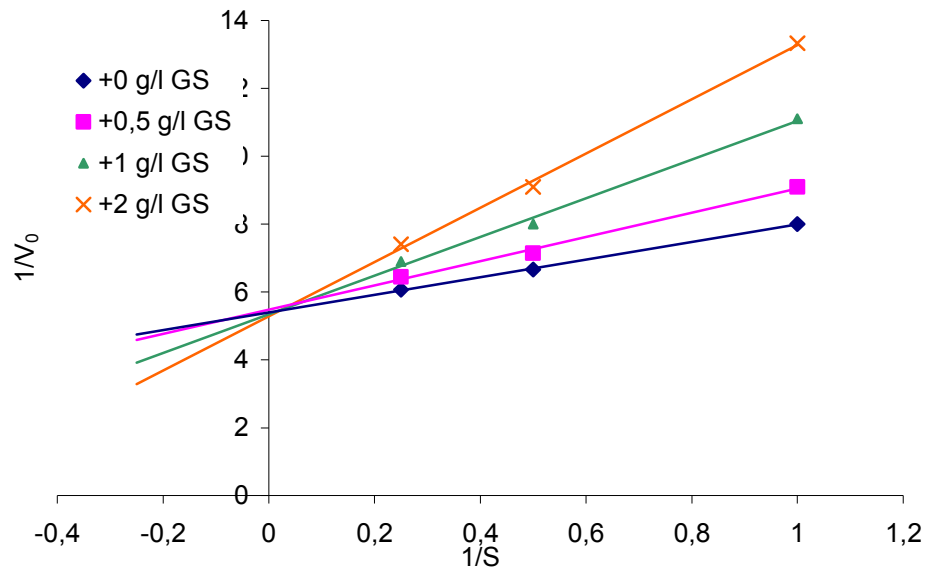
Pektin koncentráció [g/l]	Hozzáadott galakturonsav [g/l]			
	0	0,5	1	2
1	64,4%	63,5%	46,3%	39,1%
2	46,3%	36,7%	27,7%	22,2%
4	34,7%	21,37%	14,23%	9,8%

A kísérleti adatokból (lefutási görbék) kiszámoltam a kezdeti reakció sebességeket (4.3.3. ábra), és a Lineweaver-Burk transzformációt alkalmazva a kapott adatokat ábrázoltam (4.3.4. ábra).



4.3.3. ábra: A kezdeti reakciósebesség eltérő GS koncentráció mellett (piros ribizlitörköly pektin)

Az 4.3.4.-es ábrán látható, hogy az $1/v$ egyenesek közel azonos pontban metszik az ordináta tengelyt, tehát nagy valószínűséggel kompetitív termékkihívásról van szó.



4.3.4. ábra: Lineweaver-Burk linearizálás (piros ribizlitörköly pektin)

A Michaelis-Menten modellt kompetitív termék inhibícióval kiegészítve a következő egyenletet kapjuk:

$$v_i = \frac{v_{\max}(S)}{K_m \frac{K_I + (I)}{K_I} + (S)}$$

- v_i reakciósebesség
- S szubsztrát koncentráció
- I inhibitor (termék) koncentráció
- V_{\max} maximális reakciósebesség
- K_m Michaelis-Menten konstans
- K_I inhibíciós konstans

A Lineweaver-Burk linearizálást használva meghatároztam a paramétereket, amelyeket a táblázatban (4.3.2. táblázat) foglaltam össze.

4.3.1. táblázat: A kapott kinetikai paraméterek

Pektin	K_m [g/l]	v_{max} [g/l*min]	K_I [g/l]
Citrus	8,3	1,06	3,13
Citrus*	3,5	0,23	1,05
Piros ribizlitörköly	0,48	0,19	0,88
Piros ribizlitörköly (észtermentesített)	0,48	0,47	0,93
Fekete ribizlitörköly	0,79	0,31	0,94
Fekete ribizlitörköly (észtermentesített)	0,95	0,82	1,04

A kapott értékeket szerettem volna irodalmi adatokkal is összehasonlítani, azonban ezzel az enzimek készítménnyel ez idáig nem végeztek kinetikai méréseket. A csillaggal jelölt citrus pektinhez tartozó értékek irodalmi adatok, azonban az alkalmazott enzim a pektines 100L komplex enzimek készítmény volt, amire már korábban utaltam. Az azonban mindenképpen jól látható, hogy az általam és az irodalomban megtalálható adatok egy nagyságrendbe esnek. A két különböző enzimek készítménnyel végzett mérésekből arra lehet következtetni, hogy a termék-inhibíció az irodalomban közölt mérések esetében is nagy valószínűséggel a poligalakturonáz enzim működése közben lépett fel.

Látható, hogy a különféle forrásból származó pektineknél a kapott kinetikai paraméterek értéke eltérő, az észtermentesítés hatása elsősorban a maximális reakciósebességnél szignifikáns. A további eltéréseket a pektinek között lévő strukturális differenciák okozhatják.

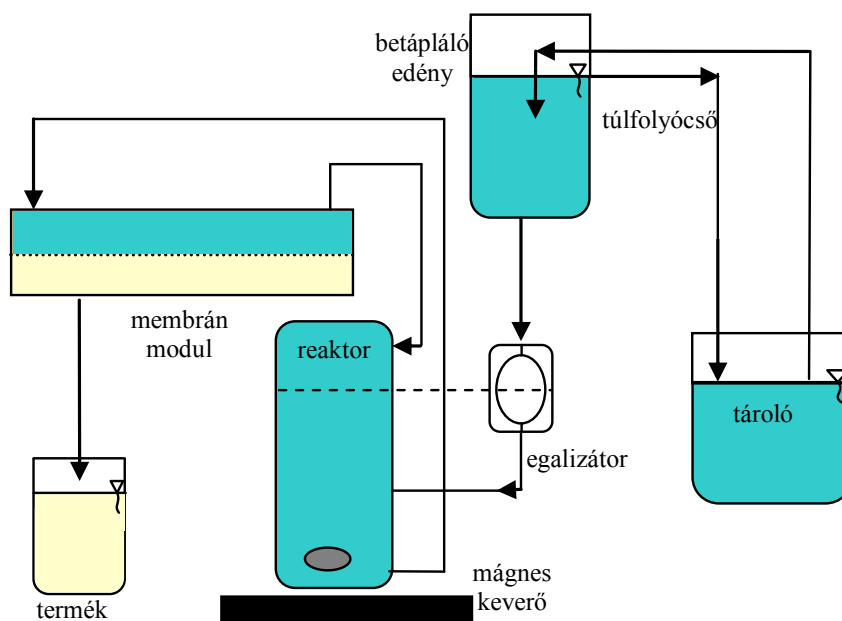
4.4. Pektin enzimes hidrolízisének vizsgálata membrán reaktorban

Korábban [Bélafi-Bakó et al. 2002] már sikeresen alkalmaztunk lap-membrán és kapilláris membrán modulokat poliszacharidok enzimes hidrolízisére. Mivel pektin hidrolízise során erős termékinhibíció lép fel, ezért kézenfekvő megoldásnak tűnt megvizsgálni a reakciót membrán bioreaktorban.

4.4.1 Citrus pektin hidrolízis vizsgálata membrán reaktorban

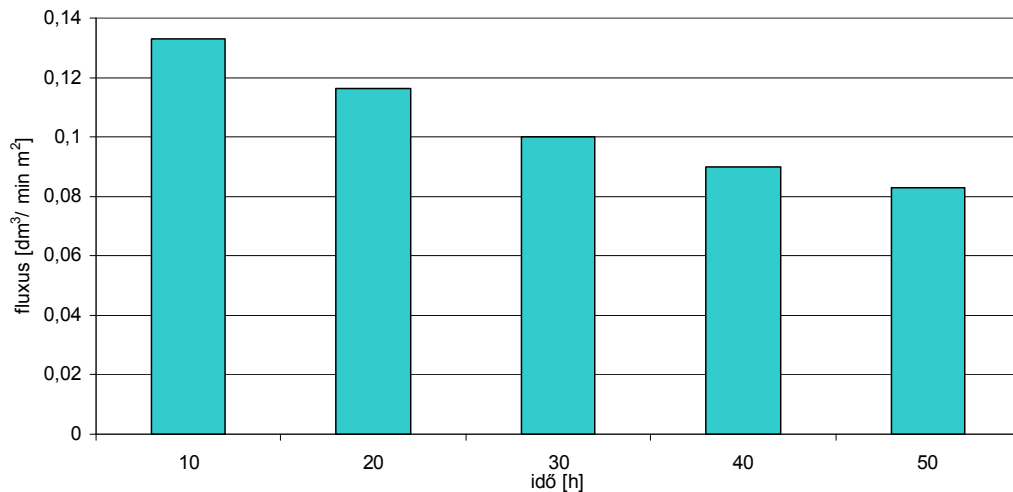
Először citrus pektin, mint modell pektin hidrolízisét vizsgáltam meg.

A folyamatos működtetés megvalósítása érdekében a 4.4.1. ábra szerinti, termosztált síklapmembrán modult alkalmaztam. A reaktorban a szubsztrátoldat mennyiségét egalizátorral szabályoztam. A fluxussal arányos szubsztrát rátáplálással ugyanis lényegesen megnövelhető a rendszer hatékonysága. A mérési körülmények teljesen megegyeztek a rázatott lombikban végzett kísérletekkel. 2 g/l kezdeti szubsztrát koncentrációjú citrus pektin oldatot keringettem a 0,01 m² membránfelületű lapmembrán bioreaktorban, a következők paraméterek mellett: 4,1 pH értékű citrát puffer, 50 °C hőmérséklet, szubsztrát-enzim arány 20.

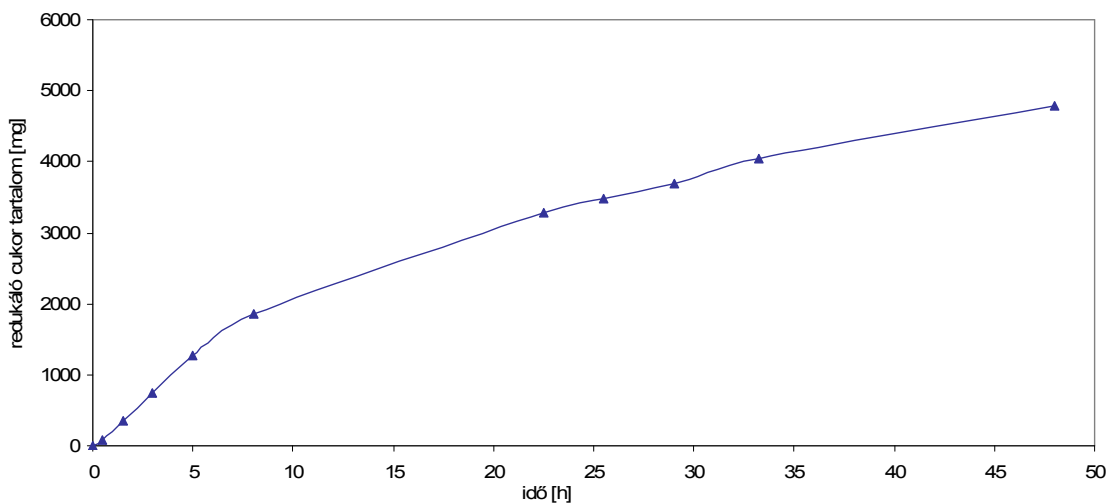


4.4.1. ábra: A membrán bioreaktor berendezés egalizátorral

A terméket tartalmazó reakció elegyet cirkuláltattam a termosztált lapmembrán primer oldalán és a galakturonsav oldatot a membrán szekunder oldalán gyűjtöttem össze. A transzmembrán nyomás, vagyis a membrán két oldala közt lévő nyomáskülönbség 100 mbar volt.



4.4.2. ábra: A fluxus változása citrus pektin hidrolízisekor membrán reaktorban (4,1 pH, 150 rpm, 50 °C, 0,01g enzim, 2g/l szubsztrát koncentráció)



4.4.3. ábra: A reakció alatt képződött galakturonsav mennyisége az idő függvényében (4,1 pH, 150 rpm, 50 °C, 0,01 g enzim, 2g/l szubsztrát koncentráció)

Az adott idő alatt képződött galakturonsav mennyiségét és a fluxust, amit a permeátum mennyiségéből számoltam ki a a 4.4.2. és 4.4.3. ábrán ábrázoltam. Látható, hogy 50 óra reakció idő alatt is megbízhatóan működtethető a berendezés, az enzim jó stabilitást mutatott.

A galakturonsav termék (mint vizes oldat) fokozatosan gyűlt össze a permeátum oldalon, és az egész folyamat alatt több mint 2,5 l permeátumot gyűjtöttem össze. A folyamatos hidrolízis közben a fluxus láthatóan csökkent, de komoly eltömődést nem tapasztaltam a hosszú működés alatt.

A produktivitási adatokat a szakaszos és folyamatos működés során képződött galakturonsav mennyiségből számoltam ki. A rázatott lombikban végzett kísérleteknél $6,9 \text{ g}_{\text{termék}}/\text{h g}_{\text{enzim}}$, a membrán bioreaktoros kísérleteknél $9,7 \text{ g}_{\text{termék}}/\text{h g}_{\text{enzim}}$ értékeket kaptam, ami 40,6 százalékkal nagyobb, mint az első esetben. A térfogati produktivitási értékek is hasonló arányt mutattak ki, hiszen a reaktortérfogat és az enzim mennyiség is ugyanannyi volt a rázatott lombikos és a membrán bioreaktoros kísérleteknél.

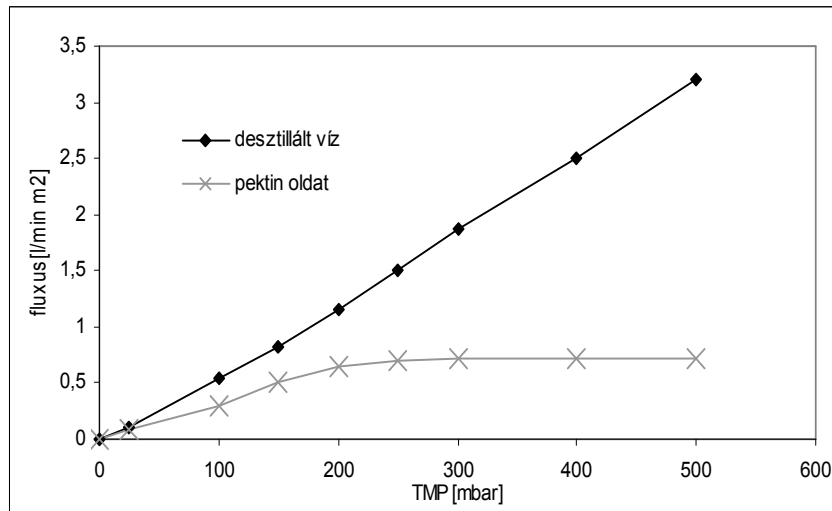
4.4.2 Vákuum alkalmazása pektin membrán reaktorban történő hidrolízise során

4.4.2.1. A vákuum hatása a fluxusra

A termék elvételi sebesség növelése és az esetleges eltömődés (fouling) esélyének csökkentése lehetséges a membrán felület/reaktor térfogat arányának növelésével illetve a transzmembrán nyomás (TMP) emelésével.

Jelen esetben a második megoldást választottam. A TMP növelése kétféle úton is lehetséges. Lehet a retentátum oldalon túlnyomást alkalmazni, illetve a permeátum oldalon vákuumot kialakítani. A permeátum oldalon történő vákuum kialakítás energetikai és gazdasági szempontból is előnyösebb. Ha például a membrán primer oldalán 500 mbar túlnyomást hozunk létre, akkor a szekunder oldalon lévő nyomáshoz képest 1,5 szer nagyobb nyomást tudunk kialakítani. A szekunder oldalon ugyanekkora vákuum létrehozásával 2 szer nagyobb nyomáskülönbséget lehet kialakítani a membrán két oldala között.

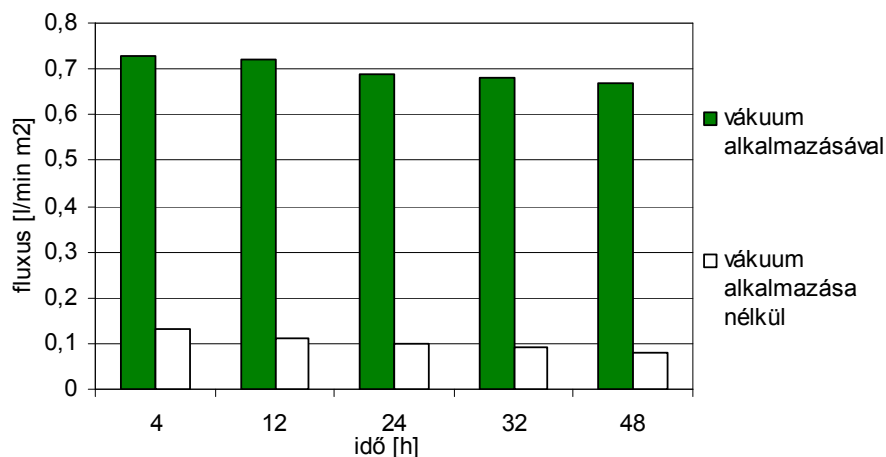
Ezen okból a permeátum oldalon enyhe vákuum alkalmazása mellett döntöttem, hogy a fluxust és vele együtt a produktivitást is megnöveljem.



4.4.4. ábra: A desztillált víz és pektin oldat fluxus értékeinek változása a transzmembrán nyomás változás függvényében

Desztillált vizet, majd pektin oldatot (2 g/l fekete ribizlitörköly) cirkuláltattunk a membrán primer oldalán és a kapott fluxus értékeket ábrázoltunk a transzmembrán nyomás függvényében (4.4.4. ábra). A desztillált víz esetében a vákuum növelésével arányosan nőtt a fluxus értéke. A kapott egyenes meredekségéből meghatároztam a hidraulikus membrán áteresztési értéket, ami $7,4 \text{ l/m}^2 \cdot \text{bar} \cdot \text{min}$ -nak adódott.

A pektin oldat esetében 250 mbar nyomás értékig arányosan változott a fluxus, azonban ennél nagyobb vákuumnál egyensúly állt be. A további méréseket ekkora TMP mellett hajtottam végre.

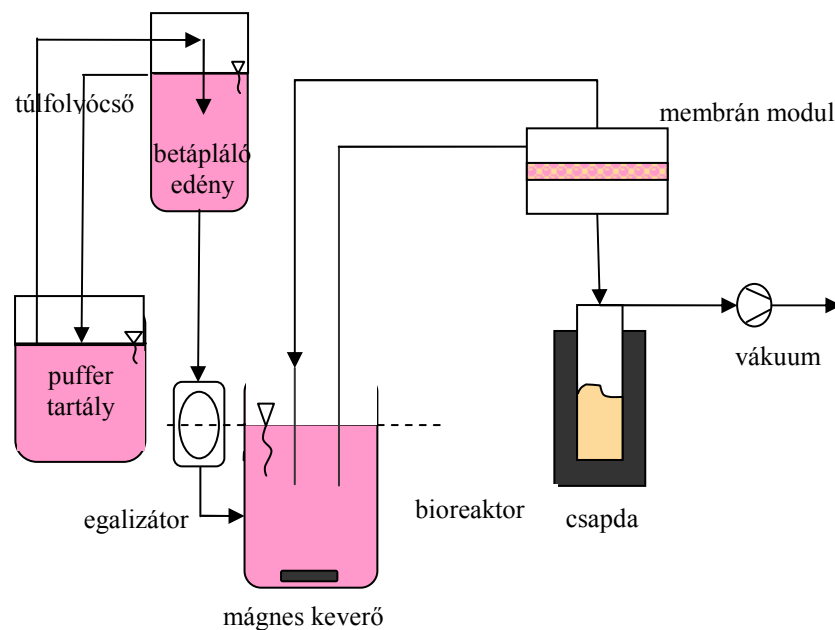


4.4.5. ábra: A fluxus változása az idő függvényében (4,1 pH, 150 rpm, 50 °C, 0,01 g enzim, 2g/l szubsztrát koncentráció)

A 4.4.5. ábrán a mért fluxus értékeket hasonlítottam össze vákuum alkalmazása mellett és vákuum nélkül. A reaktorban 2 g/l koncentrációjú fekete ribizlitörkölyből nyert pektin oldatot keringettem. Jól látható, hogy vákuum alkalmazásakor hétszer nagyobb fluxus értékeket értem el. A fluxus nagysága a kétnapos működtetés alatt vákuum alkalmazása nélkül lecsökkent a kezdeti érték 62 százalékára, míg 250 mbar permeátum oldali vákuum mellett kevesebb, mint 10 százalékos csökkenést tapasztaltam.

4.4.2.2. Folyamatos pektinbontás membrán reaktorban vákuum alkalmazása mellett

A citrus pektin membrán reaktorban történő hidrolízis tapasztalatait felhasználva az általam előállított pektinek (piros és fekete ribizlitörköly) enzimes lebonthatóságát is megvizsgáltam. A most alkalmazott berendezés (4.4.6. és 4.4.7. ábra) a korábban alkalmazott rendszerrel szinten teljesen megegyezett. A permeátum oldalon azonban vákuumot hoztam létre vákuum szivattyú segítségével.



4.4.6. ábra: Membrán bioreaktor berendezés egalizátorral és vákuummal



4.4.7. ábra: A membrán reaktor működés közben

A kísérleteket elsőnek 2 g/l-es koncentrációjú fekete ribizlitörköly pektin oldattal végeztem. Három eltérő működési körülmény mellett vizsgáltam meg a reakció lefutását a membrán reaktorban. A kapott fluxus értékeket a 4.4.1. táblázat tartalmazza:

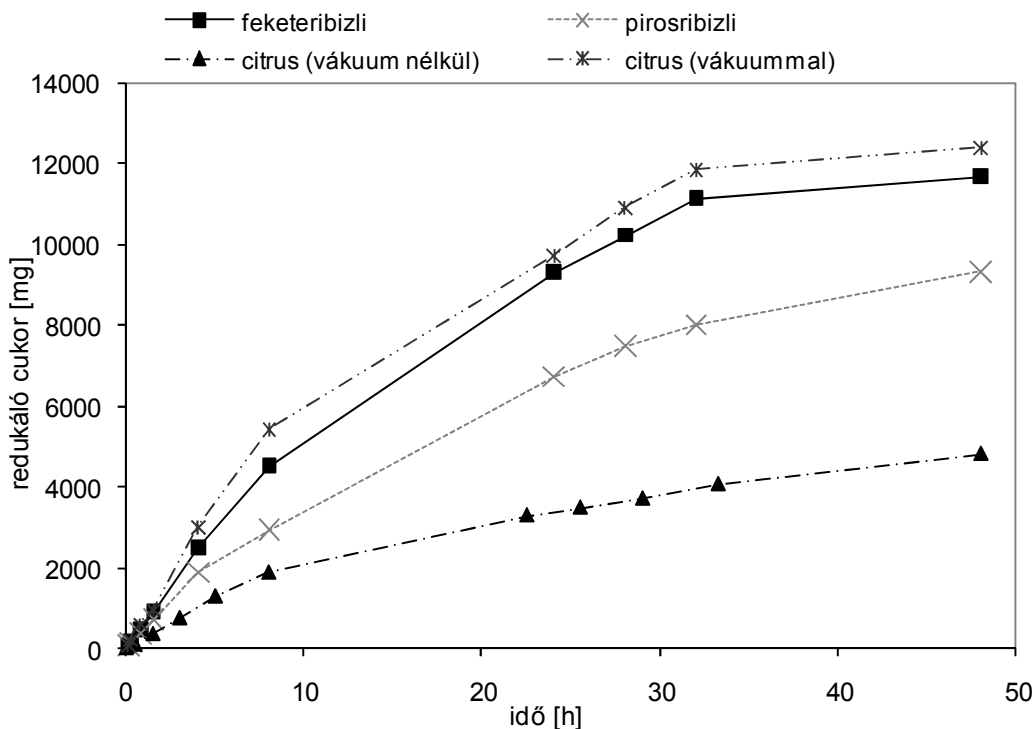
4.4.1. táblázat: A maximális fluxus értékek eltérő működési körülmények mellett (TMP: 250 mbar)

Folyamatos vákuum alkalmazásakor elért maximális fluxus:	0,7 dm ³ /min m ²
Vákuum szakaszos alkalmazásakor az átlag fluxus:	0,27 dm ³ /min m ²
Vákuum nélkül elért legnagyobb fluxus:	0,11 dm ³ /min m ²

Folyamatos vákuum alkalmazásakor több mint 20 l permeátumot gyűjtöttem össze 50 óra működési idő alatt, azonban a galakturonsav képződés sebessége nem volt arányban a termék elvétel sebességével. Ezért a vákuum szakaszos alkalmazása mellett döntöttem. Minden fél órában 10 percig volt vákuum alatt a rendszer. Ily módon a galakturonsav képződés sebessége közel azonos volt a galakturonsav elvétel sebességével. Ebben az esetben 7,8 l permeátum gyűlt össze.

Az utóbbi működési feltételek mellett megvizsgáltam a piros ribizli és fekete ribizlitörköly pektin valamint a citrus pektin enzim lebontását is membrán reaktorban, majd megállapítottam a produktívási értékeket.

4.4.8. ábra: A reakció alatt képződött galakturonsav mennyisége az idő függvényében (4,1 pH, 150 rpm, 50 °C, 0,01 g enzim, 2 g/l szubsztrát koncentráció)



A 4.4.8. ábrán a különböző pektinek lebontása során képződött galakturonsav mennyisége redukáló cukorban kifejezve látható az idő függvényében. Az értékeket minden esetben a korábban mért adatokhoz adtam hozzá (kumulált adatok) és azt ábrázoltam az idő függvényében. Jól látható, hogy a működtetés első 10 órájában közel lineárisan nőtt a redukáló cukor tartalom a permeátumban, később a növekedés mértéke lassult, de kisebb mértékben.

4.4.2 táblázat: A kapott produktivitási értékek (4,1 pH, 150 rpm, 50 °C, 0,01 g enzim, 2 g/l szubsztrát koncentráció)

Pektinek	produktivitás [g _{termék} /h*g _{enzim}]
Citrus pektin (rázatott lombik)	6,9
Citrus pektin MBR (vákuum nélkül)	9,7
Citrus pektin MBR (vákuum)	25,8
Fekete ribizli pektin MBR (vákuum)	24,3
Piros ribizli pektin MBR (vákuum)	19,4

A kapott produktivitási adatokat a 4.4.2. táblázat foglalja össze; vákuum alkalmazása mellett 2-2,5 nagyobb produktivitási értékeket értem el, összehasonlítva a kapott adatokat, mint vákuum nélkül. Ezek a magas produktivitási adatok – véleményem szerint – nem csak a megnövelt traszmembrán nyomásnak köszönhetőek,

hanem valószínűleg a vákuum szakaszos működése (ki/be kapcsolása) is kedvező hatást gyakorolt a rendszerre. Ugyanis a vákuum alatti működés során a membrán primer oldalán felépülő plusz ellenállást jelentő réteg (gélréteg) a vákuum kikapcsolásakor fellazulhat, a részecskék visszajuthatnak a főtömegbe, s így a membránszeparáció hatékonyabbá válhat.

Az eredményekből egyértelműen arra a következtetésre jutottam, hogy érdemes membrán reaktorban pektint hidrolizálni, mivel így sokkal nagyobb produktivitás érhető el és a termék inhibíció is kivédhető.

5. Összefoglalás

Ebben a doktori munkában a bogyós gyümölcsök (piros és fekete ribizli, málna, szeder, bodza) feldolgozásánál keletkező melléktermékek hasznosítása volt a cél, s ezen belül is a pektin tartalmuk kinyerése és annak jellemzése. E hulladékhasznosítási lépés beiktatásával a rendkívül értékes gyümölcsök feldolgozása környezetvédelmi szempontból is előnyösebbé tehető (kevesebb hulladék képződik), valamint a pektin, mint termék – lehetőség szerint környezetbarát, veszélyes hulladékképződés nélkül – előállítására hozzájárul a gyümölcs feldolgozás gazdaságosságának javításához.

Első lépésként a savas, lúgos és vizes feltárási módszereket hasonlítottam össze, majd a különböző forrásokból származó pektinek extrakciós hozamát és tisztaságát vettem össze. A leghatékonyabbnak a savas feltárás mutatkozott, de nem sokban maradt el tőle a semleges pH-n végzett feltárás. A környezeti és gazdaságossági szempontból is legelőnyösebb vizes feltárás esetén azonban glükóz igen csekély mennyiségben van jelen az oldatban. Ezen okból a vizes feltárás mellett döntöttem.

Az előállított pektineket további vizsgálatoknak vettem alá, hogy a különböző forrásokból származó pektineket jellemezni tudjam.

A kinyert pektinek színét a CIE 1986-os szabvány szerint mértem, a színezettségért felelős antioxidáns hatású vegyületeket fotometriás analitikai módszerekkel határoztam meg és megállapítottam, hogy antioxidáns hatással rendelkeznek.

A pektinek észterezettségi fokának megállapításához titrálásos ill. FT-IR módszert alkalmaztam. Mindkét módszerrel arra az eredményre jutottam, hogy az általam vizsgált gyümölcstörkölyökből magas észterezettségi fokú (ÉF > 50%) pektinek állíthatók elő, illetve a törkölyből feltárt pektinek észterezettségi foka alacsonyabb.

A pektint bontó enzimeket évtizedek óta sikeresen alkalmazzák az iparban. A pektináz enzimekről kinetikai viselkedésük szempontjából azonban még csak nagyon kevés információ áll rendelkezésünkre. A pektinek lebontásában a poligalakturonázoknak kulcsszerep jut, mivel ezek képesek az egységeket összetartó glikozidos kötések elhasítására. A vizsgálataim során a hangsúlyt ennek az enzimfajtának a vizsgálatára helyeztem.

Első lépésben citrus pektin, mint modell pektin lebonthatóságát vizsgáltam meg tisztított poligalakturonáz enzimmal. Ezt követte a piros és fekete ribizli törkölyből

kinyert pektinek, valamint e pektinek észtermentesét követő hidrolízisének tanulmányozása és a kinetikai, valamint az inhibíciós paraméterek meghatározása. A különféle forrásból származó pektineknél a kapott kinetikai paraméterek értéke eltérő, amelyet valószínűleg a gyümölcs pektinek között lévő strukturális eltérés okoz.

Korábban már sikeresen alkalmaztunk a Műszaki Kémiai Kutató Intézetben lap-membrán és kapilláris membrán modulokat poliszacharidok enzimés hidrolízisére. Mivel pektin hidrolízise során erős termék-inhibíció lép fel, ezért kézenfekvő megoldásnak tűnt megvizsgálnom a reakciót membrán bioreaktorban.

Az enzimés pektin hidrolízist $0,01 \text{ m}^2$ felületű síklap típusú termosztált bioreaktorban valósítottam meg, szabad poligalakturonáz enzimmel. A membrán képes volt az enzimet visszatartani, viszont az alacsony molekulatömegű anyagok, mint a galakturonsav könnyen átjuthattak rajta. A kevert reaktorban levő szubsztrát oldat szintjét mechanikus kiegyenlítővel szabályoztam. A membrán szekunder oldalán enyhe vákuumot (0,25 bar) alkalmaztam szakaszos üzemeltetéssel.

Összehasonlítva a kapott adatokat vákuum alkalmazása mellett 2-2,5 nagyobb produktivitási értékeket értem el, mint vákuum nélkül. A kapott produktivitás értékek: 25,8; 24,3; valamint $19,4 \text{ g}_{\text{termék}}/\text{h} \cdot \text{g}_{\text{enzim}}$ citrus, fekete ribizli és piros ribizlitörköly pektin hidrolízis esetén.

A kutatómunka összefoglalásaként elmondható, hogy sikerült a gyümölcsle gyártás folyamatát egy melléktermék hasznosító lépéssel kombinálni, mely során új, színes készítményeket állítottam elő, valamint e készítmények enzimés lebontásával egy értékes terméket, a galakturonsavat nyertem.

6. Irodalomjegyzék

- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., Serra, J. L.: Immobilization of pectin lyase from *Penicillium italicum* by covalent binding to nylon, *Enzyme and Microbial Technology*, 18 (1996) 141–146
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., Serra, J. L.: Industrial applications of pectic enzymes: a review, *Process Biochemistry*, 33 (1997) 21–28
- Baciu, I. E., Jördening, H. J.: Kinetics of galacturonic acid release from sugar-beet pulp, *Enzyme and Microbial Technology*, 34 (2004) 505-512
- Bélafi Bakó, K., Dombi, Á., Szabó, L., Nagy, E.: Triacylglycerol hydrolysis by lipase in a flat membrane bioreactor, *Biotechnology Techniques.*, 8 (1994) 671–674
- Bélafi-Bakó, K., Nemestóthy, N., Milisic, V., Gubicza, L.: Membrane bioreactor for utilisation of carbohydrates in waste streams, *Desalination*, 149 (2002) 329–330
- Bennett, E.: Ration of soluble sugars, pectic materials and hemicelluloses to nitrogen-free extract of some common vegetables, *Food Research*, 9 (1944) 462
- Benzie, I.F., Strain, J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measuring of „antioxidant power”: The FRAP assay. *Annals of Clinical Biochemistry*, 239 (1996) 70-76
- Buston, H. W., Kirkpatric, H. F.: The pectic substances of the carrot, with reference to their decomposition by *Bacillus carotovorus*, *Annals of Botany*, 45 (1931) 519-525
- Černá, M., Barros, A. S., Nunes, A., Rocha, S. M., Delgadillo, I. Čopíková, J., Coimbra, M. A.: Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives, *Carbohydrate Polymers*, 51 (2003) 383-389
- Cevallos-Casals, B.A., Cisneros-Zevallos, L.: Review: stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed potato to synthetic and natural colorants, *Food Chemistry*. 86 (2003) 69-77

- Cheison, S.C., Wang, Z., Xu, S.Y.: Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor I: Characterisation of permeate flux and product recovery by multivariate data analysis, *Journal of Membrane Science*, 283 (2006) 45-56
- Chopin, T. Whalen, E.: A new rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material, *Carbohydrate Research*, 246 (1993) 51-89
- Coimbra, M. A., Barros, A., Rutledge, D. N., Delgadillo, I.: FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell wall polysaccharide extracts, *Carbohydrate Research*, 317 (1999) 145-154
- Conrad, C. M.: A biochemical study of the insoluble pectic substances in vegetables, *American Journal of Botany*, 13 (1926) 531-547
- Curcio, E., De Bartolo, L., Barbieri, G., Rende, M., Giorno, L., Morelli, Drioli, S. E.: Diffusive and convective transport through hollow fiber membranes for liver cell culture, *Journal of Biotechnology*, 117 (2005) 309–321
- Dixon, M., Webb, E.C.: *Enzymes*, Academic Press, New York, 1964
- Dr. Kristóf János: *Kémiai Analízis II (Nagyműszeres analízis)*, Veszprémi Egyetemi kiadó, 2000, Veszprém
- Drioli, E., Giorno, L.: *Biocatalytic membrane reactors*, Taylor and Francis Group, London, 1999
- Emaga, T. H., Ronkart, S. N., Robert, C., Wathelet, B., Paquot, M.: Characterisation of pectin extracted from banana peels under different conditions using an experimental design, *Food Chemistry*, 108 (2008) 463-471
- Faravash, R. S., Ashtiani, F. Z.: The effect of pH, ethanol volume and acid washing time on the yield of pectin extraction from peach pomace, *International Journal of Food Science and Technology*, 42 (2007) 1177-1187
- Filippov, M. P.: Practical infrared spectroscopy of pectic substances, *Food Hydrocolloids*, 6 (1992) 115-142

- Fogarty, W.M., C.T. Kelly: Pectic Enzymes, 131-182, In Fogarty, W.M ed.
Food Chemical Codex, Washington, DC: National Academy of Science pp. 283-286
(1981)
- Gaddum, L.W.: The pectic constituents, Florida Agricultural Experiment Station, Bull.
No. 268 (1934) p. 9
- Gailing, M. F., Guibert, A., Combes, D.: Fractional factorial designs applied to
enzymatic sugar beet pulps pressing improvement, *Bioprocess Engineering*, 22
(2000) 69-74
- Galat, A.: Study of the Raman scattering and infrared absorption spectra of branched
polysaccharides, *Acta Biochimica Polonica*, 27 (1980) 135-141
- Gan, Q., Allen, S.J., Taylor, G. (2002): Design and operation of an integrated
membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis, *Biochem. Eng. J.* 12, 223-229
- Gergely, S., Bekassy-Molnar, E., Vatai, Gy.: The use of multiobjective optimisation to
improve wine filtration, *Journal of Food Engineering*, 58 (2003) 311–316
- Gillespie, A. M., Coughlan, M. P.: The pectin-degrading system of *Penicillium*
capsulatum: characterization of an extracellular polygalacturonase from solid-state
cultures, *Biochemical Society Transactions*, 17 (1989) 384–385.
- Ginter, E., Kubec, f. J., Vozár, J., Bobek, P.: Natural hypocholesterolemic agent: pectin
plus ascorbic acid. International, *Journal of Viticulture and Natural Resource*, 49
(1979) 406-408.
- Giorno L., Donato L., Todisco S., Drioli E.: Study of fouling phenomena in apple juice
clarification by enzyme membrane reactor, *Separation Science and Technology*, , 33
(5) (1998) 739-756
- Gnanasambandam, R., Proctor, A.: Determination of pectin degree of esterification by
diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, *Food Chemistry*, 68
(2000) 327-332
- Haas, A. R. C.: Californian Avocado Association, Yearbook, 1936 p. 72

- Hilz, H., Bakx, E. J., Schols, H. A., Voragen A. G. J.: Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries—characterisation in berries, juice, and press cake *Carbohydrate Polymers*, 59 (2005) 477–488
- Huber, D. J., Karakurt, Y., Jeong, J.: Pectin degradation in ripening and wounded fruits, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13 (2) (2001) 224-241
- Huisman, M. M. H., Oosterveld, A., Schols, H. A.: Fast determination of the degree of methyl esterification of pectins by head-space GC, *Food Hydrocolloids*, 18 (2004) 665-668
- Iglesias, M. T., Lozano, J. E.: Extraction and characterization of sunflower pectin, *Journal of Food Engineering*, 62 (2004) 215–223
- Jayani, R. S., Saxena, S., Gupta R.: Microbial pectinolytic enzymes: A review, *Process Biochemistry*, 40 (2005) 2931–2944
- Jördening, H. J., Baciú, I., Bremsemeyer, S., Buchholz, K.: Gewinnung von Galacturonsäure aus Zellwandbestandteilen der Rübenschnitzel, *Zuckerindustrie* 127 (2002) 845-853
- Káčuráková, M., Wilson, R. H.: Development in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates, *Carbohydrate Polymers*, 44 (2001) 291-303
- Kar, F., Arslan, N.: Characterization of orange peel pectin and effect of sugars, L-ascorbic acid, ammonium persulfate, salts on viscosity of orange peel pectin solutions. *Carbohydrate Polymers*, 40 (1999) 285–291.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari, R.: Applications of pectinase in commercial sector: a review, *Bioresource Technology*, 77 (2001) 215-227
- Kertész, I. Z.: The pectic substances, Interscience Publishers, New York, 1951
- Kertész, Sz., László, Zs., Horváth Zs. H., Hodúr, C.: Analysis of nanofiltration parameters of removal of an anionic detergent Hodúr., *Desalination*, 221 (2008) 303–311

- Kilara, A.: Enzymes and their uses in the processed apple industry: a review, *Process Biochemistry*, 23 (1982) 35-41
- Kobayashi, M., Matoh, T., Azuma, J. I.: Two chains of rhamnoglacturonan II are cross linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls, *Plant Physiology*, 110 (1996) 1017–1020.
- Koubala, B.B., Mbome, L. I., Kansci, G., Tchouanguép Mbiapo, F., Crepeau, M. J., Thibault, J. F., Ralet, M. C.: Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions, *Food Chemistry* 106 (2008) 1202-1207
- Kulbe, K. D., Heinzler, A., Knopki, G.: Enzymatic synthesis of L-ascorbic acid via D-uronic acids; Membrane reactor integrated recovery of D-galacturonic acid from pectin hydrolysates, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 506 (1987) 543–551
- Kumer, R., Kumer, A., Chauhan, K.: Removal of As(V) from water by pectin based active hydrogels following geochemical approach, *Bioresource Technology* 100 (2008) 1474-1477
- Lampitt, L. H., Hughes, E. B., The composition of fruits, *Analyst*, 53 (1928) 32-35
- László, Zs., Hodúr, H.: Purification of thermal wastewater by membrane separation and ozonation, *Desalination*, 206 (2007) 333–340
- Lásztity Radomir, Törley Dezső: Az élelmiszer-analitika elméleti alapjai I, Mezőgazdaság kiadó, Budapest, (1987)
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., Mazoyer, J.: Emulsion stabilizing properties of pectins, *Food Hydrocolloids*, 17 (2003) 455-462
- Levigne, S., Thomas, M., Ralet, M. C., Quemener, B., Thibault, J. F.: Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards, *Food Hydrocolloids*, 16 (2002) 547-550
- Losonczy A., Csiszár E.: A pektinek jellemzői és enzimes degradációja, *Papíripar*, XLVII. évfolyam, 3. szám, (2003) 96-100

- Manrique, G. D., Lajolo, F. M.: FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit, *Postharvest Biology and Technology*, 25 (2002) 99-107
- Marcon, M.V. et al.: Pectins from apple pomace, *Polimeros* 15 (2005) 34-38
- MAXFUN Project: Novel technologies for fruit and berry production (QLk1-CT-2002-02364)
- May, C. D.: Industrial pectins: Sources, production and applications, *Carbohydrate Polymers*, 12 (1990) 79-99
- McAdam, E. J., Judd, S. J.: A review of membrane bioreactor potential for nitrate removal from drinking water, *Desalination*, 196 (2006) 135–148
- McCann, M. C., Roberts, K.: Architecture of the primary cellwall. In C. W. Lloyd (Ed.), *The cytoskeletal basis of plant growth and form*, London: Academic Press, 109–129 (1991)
- McComb, McCready: Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers, *Analytical Chemistry*, 28 (1957) 819-821
- McGuire, R. G.. Reporting of objective colour measurements. *HortScience*, 27 (12) (1992) 1254–1255.
- Money, R. W., Christian, W. A.: Analytical data of some common fruits, *Journal of Science of food and Agriculture*, 1 (1950) 8-12
- Navindra P. Seeram: Berry fruits: compositional Elements, Biochemical Activities, and the impact of Their Intake on human Health, Performance, and Diseases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008) 627–629
- Nelson, D. B., Smit, C.J.B., Wiles, R.R.: Commercially important pectic substances, In *Food Colloids*, ed. By H. D. Graham, AVI, Westport USA, 1977, 418-437
- Neukom: Pectic substances, In *Encyclopedia of Chemical Technology* vol. 14, Wiley, New York (1967)

- Neumüller O.A.: Römpf Vegyészeti Lexikon, Műszaki Könyvkiadó, Budapest III. kötet 646-647., 1981
- Nyeste L.: Biomérnöki műveletek és alapfolyamatok, Műegyetemi Kiadó, Budapest, (1997)
- Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R., Rastall, R. A.: Continuous production of pectic oligosaccharides in an enzyme membrane reactor. *Journal of Food Science*, 66 (2001) 966–971
- Pagán, J., Ibarz, A., Llorca, M., Pagán, A., Barbosa-Cánovas, G. V.: Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Research International*, 34 (2001) 605–612
- Paolucci-Jeanjean D., Belleville M.P., Rios G.M., Zakhia N. Kinetics of continuous starch hydrolysis in a membrane reactor., *Biochemical Engineering Journal*, 6 (2000) 233-238.
- Pařenicová, I., Kester, H. C. M., Benen, J. A. E., Visser, J.: Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties, *FEBS Letters*, 467 (2000) 333-336
- Pectins and pectinases: International symposium, Rotterdam, The Netherlands May 6-10, 2001
- Pectins and pectinases: International symposium, Wageningen, The Netherlands December 3-7, 1995
- Pifferi, P. G., Buska, G., Manenti, L., Presti, A., Spagna, G.: Immobilization of pectinesterase on γ -alumina for the treatment of juices, *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*, 44 (1989) 173-182
- Pilnik, W., Voragen, A. G. J.: Gelling agents (pectins) from plants for food industry, *Advanced in Plant cell Biochemistry and Biotechnology*, 1 (1992) 219-270
- Pilnik, W., Voragen, A. G. J.: Pectic enzymes in fruit juice and vegetable juice manufacture. In G. Reeds (Ed.), Food and science technology, *Enzymes in food processing*, New York: Academic Press 363–399 (1993)

- Pilnik, W.: Enzyme in beverage industry. In Dubuy, P. (Ed.), *Use of Enzymes in Food Technology, Technique et Documentation Lavoisier*, Paris, 425-450 (1982)
- Pinheiro, E. R., Silva, I. M. D. A., Gonzaga, E. R. A., Teófilo, R. F., Ferreira, M. M. C., Amboni, R. D. M. C.: Optimization of extraction of highest pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology, *Bioresource Technology*, 99 (2008) 5561-5566
- Ptichkina, N. M., Markina, O. A., Romyantseva, G. N.: Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes, *Food Hydrocolloids*, 22 (2008) 192–195
- Quemener, B., Pino, J. C. C., Ralet, M. C., Bonnin, E., Thibault, J. F.: Assignment of acetyl groups to O-2 and/or O-3 of pectic oligogalacturonides using negative electrospray ionization ion trap mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 38(6) (2003) 641–648
- Research from the 2007 International Berry Health Benefits Symposium, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 56, Issue 03 (Feb. 13. 2008)
- Rodriguez-Nogales, J. M., Ortega, N., Perez-Mateos, M., Busto, M.: Pectin hydrolysis in a free enzyme membrane reactor: An approach to the wine and juice clarification, *Food Chemistry*, 107 (2008) 112-119
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., Vandammen, E. J.: Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications, *Adv Appl Biotechnology*, 39 (1993) 231-294
- Sariodlu, K., Demir, N., Acar, J., Mutlu, M.: The use of commercial pectinase in fruit juice industry, Part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase, *Journal of Food Engineering*, 47 (2001) 271–274
- Sathyanarayana, N. G., Panda, T.: Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review, *Process Biochemistry* 38 (2003) 987-996
- Schols, H. A., Voragen, A. G. J.: Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase, *Carbohydrate Research*, 256 (1994) 83–95

- Seymour, G. B., Knox, J. P.: Pectins and their Manipulation; Blackwell Publishing Ltd., 262 (2002)
- Sijin Wang, Fang Chen, Jihong Wu, Zhengfu Wang, Xiaojun Liao, Xiaosong Hu: Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, 78 (2007) 693–700
- Simpson, B. K., Egyankor, K. B., Martin, A. M.: Extraction, purification and determination of pectin in tropical fruits, *Journal of Food Processing and Presevation*, 8 (2007) 63-72
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.: Colorimetry of total phenolics with phophomolybdic-phosphotunstic acid reagents, *American Society for Enology and Viticulture* 181 (1965) 144-158
- Singthong, J., Cui, S. W., Ningsanond, S., Goff, H. D: Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin, *Carbohydrate Polymers*, 58 (2004) 391-400
- Todisco, S., Calabro, V., Iorio, G.: A kinetic model for the pectin hydrolysis using an endo-acting pectinase from *Rhizopus*, *Journal of Molecular Catalysis*, 92 (1994) 333–346
- van Santen, Y., Benen, J. A. E., Schröter, K-H., Kalk, K. H., Armand, S., Visser, J., Dijkstra, B. W.: 1.68-Å Crystal Structure of Endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and Identification of Active Site Residues by Site-directed Mutagenesis, *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (1999) 30474–30480
- Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A. V., Renart, C. M. G. C.: Pectons. In A. M. Stephen (Ed.), *Food polysaccharides and their applications* 287-396 (1995)
- Voragen, R. H., Schols, H. A., Pilnik, W.: Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h.p.l.c., *Food Hydrocolloids*, 1 (1986) 65-70
- Voss, D. H.: Relating colorimeter measurement of plant color to the Royal Horticultural Society Colour Chart, *HortScience*, 27 (1992) 1256–1260.

Vulic, J. J., Vračar, L. O., Šumić, Z M.: Chemical characteristics of cultivated elderberry fruit, *APTEFF*, 39, (2008) 85-90

Walter, R.,H., Sherman, R. M., Lee, C. Y.: A comparison of methods for polyuronide methocxl determination, *Journal of Food Science*, 48 (1983) 1006-1007

Wilson, F., Dietschy, J.: The intestinal unstirred water layer: its surface area and effect on active transport kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 34 (1974) 1034

Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, b., Paquot, M: Effect of extraxtion condition on yield, purity and surface of sugar beet pulp pectin extraction, *Food Chemistry*, 100 (2007) 1356-1364

Világhálós források:

Cpkelco 2008: <http://www.cpkelco.com/pectin/images/pectin03.gif> (2008. február 25.)

Ebi 2008: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=1czf&template=main.html> (2008. március 4.)

Herbstreith&Fox 2008: www.herbstreith-fox.de (2008. február 27.)

Obipektin 2008: www.obipektin.com (2008 március 25.)

Pharmtech 2008: http://www.pharmtech.sote.hu/files_hun/jegyzetreszlet4_5-fizika.pdf (2008. február 27.)

Sigmaaldrich 2008: http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Carbohydrate_Analysis/Carbohydrate_AnalysisIII.html#Pectin (2008. február 12.)

Sigmaaldrich/Cellwall 2008: <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/22940/Plant-Cell-Wall.jpg> (2008. február 14.)

Sigmaaldrich/pektinészteráz 2008: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P5400> (2008. február 14.)

Wikipedia/pektin 2008: <http://en.wikipedia.org/wiki/Pectin>, (2008. február 12.)

Zenon 2008: http://www.zenon.com/index_gewater.shtml (2008. április 10.)

Tézisek

Pektinek kinyerése és enzimes hidrolízise

1. Tézis

Új pektinkészítményeket állítottam elő piros (*Ribes rubrum*) és fekete (*Ribes nigrum*) ribizli, málna (*Rubus idaeus*) és szeder (*Rubus fruticosus*) feldolgozása során keletkezett törkölyökből forró vizes extrakcióval (100 °C, 0,5 h). A kinyert színes pektinek galakturonsav tartalma 37,4 és 49,7 tömegszázalék között volt, míg semleges monoszacharid összetételüket tekintve ramnóz, arabinóz, mannóz, glükóz és galaktóz tartalom volt a jellemző. [4,9]

2. Tézis

Az előállított új pektinkészítményeket színezettség alapján jellemeztem, valamint a teljes fenol és antocianin tartalmukat meghatároztam, és bebizonyítottam, hogy antioxidáns aktivitással (FRAP módszer) rendelkeznek. Megállapítottam a különböző pektinkészítmények észterezettségi fokát FT-IR spektroszkópiával valamint hagyományos titrálásos módszer segítségével. A mérések során kapott értékek 65 % és 85,7 % közé estek.

3. Tézis

Megvizsgáltam az új pektinkészítmények enzimes lebonthatóságát *Aspergillus niger*ből származó tisztított poligalakturonáz enzimmal (50 °C, 0,001g/l enzim) és megállapítottam, hogy a pektin enzimes hidrolízise egy szubsztrátos reakciónak tekinthető, valamint a reakció során kompetitív termékkihíváció lép fel. Ezen ismereteimet felhasználva meghatároztam a kinetikai állandók (K_m , v_{max} , K_I) értékeit: [1, 2, 3, 4, 7]

	K_m [g/l]	v_{max} [g/l/min]	K_I [g/l]
Citrus	8,3	1,06	3,13
Piros ribizlitörköly	0,48	0,19	0,88
Piros ribizlitörköly (észtermentesített)	0,48	0,47	0,93
Fekete ribizlitörköly	0,79	0,31	0,94
Fekete ribizlitörköly (észtermentesített)	0,95	0,82	1,04

4. Tézis

A pektin folyamatos hidrolízisét 0,01 m² felületű síklap típusú ultraszűrő membránból összeállított termosztált membrán reaktorban valósítottam meg, mely során sikerült a fellépő termékinhibíciót visszaszorítani és így az enzimre vonatkoztatott produktivitást 40,6 százalékkal sikerült megnövelnem a rázatott lombikos mérésekhez képest citrus pektinnél. A citrus pektin mellett piros és fekete ribizli pektin hidrolízisét is megvalósítottam a membrán reaktorban. A fluxus és vele a produktivitás további növelésének érdekében a membrán szekunder oldalán szakaszosan vákuumot alkalmaztam. Ily módon működtetve a membránreaktort még magasabb értékeket kaptam: 25,8, 24,3 és 19,4 g termék /h g enzim citrus, fekete és piros ribizlitörkölyből kinyert pektin hidrolízise esetén. [1, 2, 3, 7]

Theses

Extraction and enzymatic hydrolysis of pectin

1. Thesis

New pectin substrates were extracted from the press residues of red (*Ribes rubrum*) and black currant (*Ribes nigrum*), raspberry (*Rubus ideaus*) and black berry (*Rubus fruticosus*) by boiling water (100 °C, 0.5 h). The galacturonic acid content of the pectins is in the range of 37.4 and 49.7 w/w %, and it contains other monosaccharides like, rhamnose, arabinose, mannose, glucose and galactose, as well.

2. Thesis

Novel pectin substates were characterised by colour, total phenolic (FRAP method) and antocianin content. I have concluded that the pectins have antioxidant activity. Degree of esterification (DE) of the pectins was determined by titrimetric method and Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy respectively. The DE values of the pectins have been found to be in the range of 65 and 85.7 %.

3. Thesis

I have investigated the hydrolysis of the pectin substrates by purified polygalacturonase from *Aspergillus niger* (50 °C, 0.001g/l enzyme). It was found that enzymatic reaction could be described by the quasi one substrate Michaelis-Menten kinetic model completed with product inhibition. The reaction kinetic parameters (K_m , v_{max} , K_I) were determined as follows:

	K_m [g/l]	v_{max} [g/l/min]	K_I [g/l]
Citrus	8.3	1.06	3.13
Red currant	0.48	0.19	0.88
Red currant (deesterified)	0.48	0.47	0.93
Black currant	0.79	0.31	0.94
Black currant (deesterified)	0.95	0.82	1.04

4. Thesis

I have carried out the continuous pectin hydrolyses in a flat-sheet enzyme-membrane bioreactor (0.01 m² active surface area) to eliminate product inhibition. The efficiency of the continuous pectin hydrolysis in case of citrus pectin was found 40.6% higher than of the batch reaction. The hydrolysis of pectin substrate from red and black current were investigated in the same set up. To enhance flux and productivity vacuum was used in the secondary side of the membrane. I have found out the values of the specific productivity: 25.8, 24.3, 19.4 product /h g enzyme for citrus, black and red current pectins, respectively.

Publikációk és proceedingek

Publikációk

1. Bélafi-Bakó, K., Eszterle, M., Kiss, K., Nemestóthy, N., Kovács, S., Gubicza, L.: Utilisation of a membrane bioreactor for pectin hydrolysis by *Aspergillus niger* polygalacturonase, *Desalination* 200 507–508 (2006), IF: 0,917
2. Bélafi-Bakó, K., Eszterle, M., Kiss, K., Nemestóthy, N., Gubicza, L.: Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in membrane bioreactor, *Journal of Food Engineering*, 78 438-442 (2007), IF: 1,848
3. Kiss, K., Nemestóthy, N., Gubicza, L., Bélafi-Bakó, K.: Vacuum assisted membrane bioreactor for enzymatic hydrolysis of pectin from various agro-wastes, *Desalination*, 241 29-33 (2009) IF: 0,917
4. Kiss, K., Cserjési, P., Nemestóthy, N., Gubicza, L., Bélafi-Bakó, K.: Kinetic study on hydrolysis of various pectins by *aspergillus niger* polygalacturonase, *Hungarian Journal of Industrial chemistry*, 36 55-58 (2008),
5. Ziobrowski Z., Kiss K., Rotkegel A., Nemestothy N., Krupiczka R., Gubicza L.: Pervaporation aided enzymatic production of glycerol monostearate in organic solvents *Desalination*, 241 212-217 (2009) IF: 0,917
6. Kiss K., Cserjési P., Bélafiné Bakó K.: Zselésítő szerek, *Természet Világa* 139(8) 349-351 (2008)
7. Kiss, K., Cserjési, P., Nemestóthy, N., Bélafiné Bakó, K.: Pektin enzimes hidrolízise membrán bioreaktorban, *Membrántechnika* 11(1) 2-10 (2007)
8. Bélafiné Bakó K., Nemestóthy N., Kiss K., Gubicza L.: Gyümölcslevek-kíméletesen *Élet és tudomány* 37 1158-1160 (2006)
9. Kiss K, Cserjési P, Major B, Nemestóthy N, Bélafiné Bakó K: A pektináz enzimek szerepe bogyós gyümölcsök feldolgozásánál, *Membrántechnika* 10(2) 22-29 (2006)
10. Hodúr C., Szabó G., László Zs., Beszédes S., Kertész Sz., Kiss K., Bélafiné Bakó K., Békássyné Molnár E., Vatai Gy., Bánvölgyi Sz., Fogarassy E., Kozák Á., Román A., Kiss I., Lakner G.: Biogáz termelés és biológiai lebonthatóság (aerob, anaerob) növelése bogyós gyümölcsök préslepenyének mikrohullámú kezelésével, Találmányi bejelentés, P 08 00157, 2008

Proceedingek, előadások, posztterek

1. Kiss K.: Glicerín monosztearát előállítása enzimkatalitikus úton, *MTA Biomérnöki és Poliszacharidkémiai Munkabizottság tudományos ülése*, Budapest, 2005. november 29., előadás
2. Kiss K., Kelemen-Horváth I., Ziobrowski Z., Gubicza L.: Glicerín-monosztearát enzimátikus előállítása állandó víztartalom mellett, *Műszaki Kémia Napok*, Veszprém, 2006. április 25-27, előadás, pp. 75-78.
3. Cserjési P., Kiss K., Nemestóthy N., Bélafi-Bakó K., Membránok és enzimek alkalmazása a ribizli feldolgozása során, *Műszaki Kémiai Napok*, Veszprém, 2006. április 25-27, előadás, pp. 73-74.
4. Kiss K., Nemestóthy N., Bélafi-Bakó K.: Application of membranes in processing of agro wastes containing pectin, *11th Aachener Membran Kolloquium*, Aachen, 2007. március 28-29, poszter, pp. 601-604,
5. Kiss K., Cserjési P., Nemestóthy N., Bélafi-Bakó K.: Mezőgazdasági hulladékokból kinyert pektinek enzimes hidrolízisének vizsgálata, *Műszaki Kémiai Napok*, Veszprém, 2007. április 25-27, előadás, pp. 147-149
6. Kiss K., Cserjési P., Nemestóthy N., Bélafi-Bakó K.: Pektin tartalmú mezőgazdasági hulladékok feldolgozása, a kinyert pektinek enzimátikus hidrolízisének kinetikai vizsgálata, *327. Tudományos Kollokvium (KÉKI, MTA Élelmiszertudományi komplex munkabizottság, Magyar élelmiszeripari tudományos egyesület)*, Budapest, 2007. június 1. előadás, 300. füzet, p. 6,
7. Kiss K., Nemestóthy N., Bélafi-Bakó K.: Membrane bioreactor for enzymatic hydrolysis of pectin from various agro wastes, *Permea*, Siófok, 2007. szeptember 2-6, előadás, proceedings CD-ROM
8. Kiss K., Nemestóthy N., Bélafi-Bakó K.: Mezőgazdasági hulladékokból nyert pektinek enzimes hidrolízisének vizsgálata membrán bioreaktorban, *Műszaki Kémiai Napok*, Veszprém, 2008. április 22-24, előadás, pp. 221-224
9. Kiss K., Nemestóthy N., Bélafi-Bakó K.: Study on enzymatic hydrolysis of pectin from various berries in a membrane bioreactor, *35th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare, 2008. május 26-30, előadás, proceedings CD-ROM

10. Kiss K., Bélafi-Bakó K.: Bogyós gyümölcsökből feltárt pektinek enzimes hidrolízise, *XI. Fermentációs Kollokvium*, Keszthely, 2008. október 15-17, előadás, absztraktfüzet p. 37.
11. Kiss K.: Új pektinkészítmények előállítása és jellemzése, *PhD hallgatók anyagtudományi napja VIII.*, 2008. november 27., előadás

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a biztatást és a támogatást:

Bélafiné dr. Bakó Katalin

Cserjési Petra Dr. Gubicza László
Dr. Molnár Ferencné Molnár Eszter
Dr. Nemestóthy Nándor

Dr. Búcsú Dénes Dr. Kovács Sándor
Dr. Csanádi Zsófia Dr. Nagy Endre
Dr. Fehér Erika Kulcsár Edina
Dr. Fráter Tamás Lövitusz Éva
Kelemenné Horváth Ilona Major Brigitta
Dr. Koroknai Balázs Veingartner Józsefné

Családomnak

Köszönöm a Richter Gedeon Rt. Centenárium Alapítvány, a Peregrinétio I alapítvány és a Műszaki Kémiai Kutató Intézet támogatását.

Függelék

R mondatok:

- 11:** Tűzveszélyes.
- 20:** Belélegezve ártalmas
- 22:** Lenyelve ártalmas.
- 31:** Savval érintkezve mérgező gázok képződnek
- 34:** Égési sérülést okoz.
- 35:** Súlyos égési sérülést okoz.
- 36:** Szemizgató hatású
- 38:** Bőrizgató hatású.
- 40:** A rákkeltő hatás korlátozott mértékben bizonyított.
- 23/24:** Belélegezve és bőrrel érintkezve mérgező
- 23/24/25:** Belélegezve, bőrrel érintkezve és lenyelve mérgező
- 24/25:** Bőrrel érintkezve és lenyelve mérgező
- 25:** lenyelve mérgező (toxikus)
- 36/37/38:** Szem- és bőrizgató hatású, izgatja a légutakat.
- 36/38:** Szem- és bőrizgató hatású.
- 37/38:** Bőrizgató hatású, izgatja a légutakat
- 39/23/24/25:** Belélegezve, bőrrel érintkezve és lenyelve mérgező: nagyon súlyos maradandó egészségkárosodás okozhat
- 41:** Súlyos szemkárosodást okozhat
- 50/53:** Nagyon mérgező a vízi szervezetekre, a vízi környezetben hosszantartó károsodást okozhat.
- 52/53:** Ártalmas a vízi szervezetekre, a vízi környezetben hosszantartó károsodást okozhat

S mondatok:

- 1/2:** Elzárva és gyermekek számára hozzáférhetetlen helyen tartandó
- 2:** Gyermekek kezébe nem kerülhet
- 6:** . . . alatt tartandó (az inert gázt a gyártó határozza meg)
- 7:** Az edényzet hermetikusan lezárva tartandó
- 9:** Az edényzet jól szellőztethető helyen tartandó
- 16:** Gyújtóforrástól távol tartandó. Tilos a dohányzás
- 22:** Az anyag porát nem szabad belélegezni
- 24/25:** Kerülni kell a bőrrel való érintkezést és szembejutást
- 26:** Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni
- 27:** A szennyezett ruhát azonnal le kell vetni/venni
- 28:** Ha az anyag a bőrre kerül, . . . -val/vel bőven azonnal le kell mosni (az anyagot a gyártó határozza meg)
- 36:** Megfelelő védőöltözetet kell viselni
- 36/37:** Megfelelő védőöltözetet és védőkesztyűt kell viselni
- 37/39:** Megfelelő védőkesztyűt és szem-/arcvédőt kell viselni
- 39:** Szem, arcvédőt kell viselni
- 45:** Baleset vagy rosszullet esetén azonnal orvoshoz kell fordulni. Ha lehetséges, a címkét meg kell mutatni.
- 60:** Az anyagot és/vagy edényzetét veszélyes hulladékként kell ártalmatlanítani.
- 61:** Kerülni kell az anyag környezetbe jutását. Lásd a külön használati utasítást/biztonsági adatlapot