

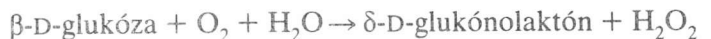
Potravinárske využitie glukózaoxidázy a katalázy z *Aspergillus niger*

STREĎANSKÝ MIROSLAV – CÍFERSKÁ GABRIELA – ŠTURDÍK ERNEST –
ROSENBERG MICHAL – KOVÁČ JOZEF – KREMnickÝ LUBOMÍR –
VAVREK RÓBERT

Súhrn. Preparáty glukózaoxidázy a katalázy získané etanolovou precipitáciou extraktu mycélia *Aspergillus niger* po glukónovej fermentácii sa testovali na niektoré potravinárske účely. Sledoval sa vplyv aktivity glukózaoxidázy na rýchlosť desacharizácie vaječného bielka. Vysoká koncentrácia kyslíka sa udržiavala pridávaním peroxidu vodíka. Ďalej sa sledovala rýchlosť odstránenia kyslíka z vína a džúsu v závislosti od aktivity glukózaoxidázy. Preparát katalázy sa testoval vzhľadom na schopnosť odstraňovať peroxid vodíka po chemickom odsírení zahusteného hroznového muštu. Skúmal sa vplyv teploty, aktivity katalázy a počiatočnej koncentrácie H_2O_2 na priebeh procesu. Preparáty glukózaoxidázy a katalázy boli vhodné pre všetky vyskúšané aplikácie.

Enzýmové preparáty nachádzajú čoraz širšie uplatnenie v potravinárskom priemysle. V tejto oblasti sa používa niekoľko desiatok enzýmov [1, 2]. Medzi ne patria aj glukózaoxidáza a kataláza, ktoré sa izolujú z rôznych mikrobiálnych zdrojov [3].

Glukózaoxidáza (EC 1.1.3.4) katalyzuje reakciu:



Glukónolaktón sa vo vodnom prostredí hydrolyzuje na kyselinu glukónovú. Glukózaoxidázu možno teda použiť na odstraňovania glukózy alebo kyslíka a na produkciu δ -glukónolaktónu, kyseliny glukónovej alebo peroxidu vodíka. Známa je desacharizácia vaječných bielkov ako prevencia Maillardových reakcií prebiehajúcich v procese ich sušenia [4, 5]. V nápojovom priemysle sa glukózaoxidáza v kombinácii s katalázou používa na odstránenie kyslíka, aby

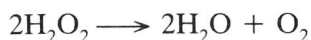
Ing. Miroslav Stredánský, Ing. Michal Rosenberg, CSc., doc. Ing. Ernest Šturdík, CSc., Lubomír Kremnický, Róbert Vavrek, Katedra biochemickej technológie, Chemicko-technologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Ing. Gabriela Cíferská, ZHZ, š. p., Staromestská 1, 917 00 Trnava.

Ing. Jozef Kováč, CSc. Výskumný ústav potravinársky, Fučíkova 45, Modra.

sa eliminoval jeho nepriaznivý vplyv na hotové nápoje, napr. pivo, víno, ovocné šťavy [6, 7]. Schopnosť odstraňovať kyslík sa využíva aj pri ochrane sfarbenia mäsa a rýb [8, 12], konzervácii tukov [9, 10] a ochrane sušených potravín [11]. Glukózaoxidáza sa aplikovala aj na znižovanie koncentrácie glukózy v glukózafruktózových sirupoch [13], v mliekárenstve na kyslú koaguláciu a predĺženie trvanlivosti mlieka [14, 15] a pri výrobe δ -glukónolaktónu a kyseliny glukónovej [16].

Kataláza (EC 1.11.1.6) katalyzuje reakciu:



Jej zdrojmi okrem mikroorganizmov sú pečeň a erytrocyty cicavcov. Využíva sa v mliekárenstve pri studenej pasterizácii mlieka určeného na výrobu syrov, na odstránenie prebytočného peroxidu vodíka. Podobné využitie by mohla nájsť pri odstraňovaní prebytočného peroxidu vodíka po chemickom odsírení muštov [17], pretože tento svojimi vedľajšími účinkami narúša organoleptické vlastnosti a nevyhovuje z hľadiska hygieny.

Táto práca sa zameriava na skúmanie využitia preparátov glukózaoxidázy a katalázy, spôsob prípravy ktorých sa opisuje v predchádzajúcej práci [18], na desacharizáciu vaječných bielkov, odstraňovanie kyslíka (deoxygenáciu) vína a jahodového džúsu (šťavy) a odstraňovanie prebytočného peroxidu vodíka po chemickom odsírení muštov.

Materiál a metódy

Desacharizácia vaječných bielkov sa robila v otvorenej nádobe s miešadlom pri 25 °C s použitím 200 ml zhomogenizovanej hmoty vaječných bielkov. Hodnota pH tejto hmoty sa vopred upravila na 7,5 zriedenou kyselinou chlorovodíkovou. Ako zdroj kyslíka sme použili 3 % H_2O_2 , ktorý sa katalázou prítomnou v preparáte rozkladal na kyslík a vodu. Koncentráciu kyslíka meranú nepretržite kyslíkovou elektródou sme udržiavali na 40–50 % nasýtení (0,032–0,040 mol \cdot l⁻¹). Každých 30 min sme odobrali vzorky a stanovili glukózu (BIO-LA-TEST Oxochrom glukóza) po precipitácii proteínov kyselinou trichlórooctovou a ich odcentrifugovaní.

Deoxygenácia nápojov. Sledovali sme úbytok kyslíka zo vzorky vína a jahodového džúsu po prídavku glukózaoxidázy. Koncentrácia kyslíka sa merala Clarkovou kyslíkovou elektródou na Oxygrafe K-ICC (Gilson). Proces prebiehal v uzavretej temperovanej nádobke objemu 1,75 ml za stáleho miešania pri teplote 25 °C. Úbytok kyslíka sa zaznamenával graficky na zapisovači.

Odsírenie zahusteného hroznového muštu. Experimenty sa robili v otvorenej

nádobe s magnetickým miešadlom. Voľný oxid siričitý a peroxid vodíka sa stanovovali jodometricky. Stanovili sme obsah voľného SO_2 v mušte a pridali ekvimolárne množstvo 3 % H_2O_2 . Po zreagovaní sme nechali mušť stáť 30 min, aby sa z viazanej formy uvoľnil SO_2 do voľnej formy a ustálila sa nová rovnováha. Stanovili sme voľný SO_2 a pridali vypočítané nadbytočné množstvo H_2O_2 . Po niekoľkých minútach sme pridali katalázu a v 5-min intervaloch stanovovali nezreagovaný H_2O_2 .

Stanovenie aktivity glukózaoxidázy. Peroxid vodíka vznikajúci v reakcii oxidácie glukózy glukózaoxidázou sa prenáša peroxidázou na chromogén *o*-dianizidín, ktorý sa sfarbuje úmerne vytvorenému peroxidu. K 2,6 ml 0,1 mol . l⁻¹ fosfátového tlmivého roztoku pH 6,0) sme napipetovali 0,05 ml peroxidázy (1 μkat . ml⁻¹) a 0,3 ml roztoku glukózy. Pridaním 0,05 ml príslušne zriedenej vzorky glukózaoxidázy sa začala reakcia. V 30-s intervaloch sme odčítali absorbanciu na spektrofotometri Specol 11 (Carl Zeiss, Jena) pri 460 nm. Na výpočet sa brali rozdiely absorbancií v 2. a 4. min.

Stanovenie aktivity katalázy. Spektrofotometricky sme sledovali úbytok peroxidu vodíka po pridaní katalázy. K 1 ml roztoku obsahujúceho H_2O_2 (0,3 ml 30 % H_2O_2 v 50 ml 0,05 mol . l⁻¹ fosfátového tlmivého roztoku pH 7,0) sme pridali 2 ml príslušne zriedenej vzorky katalázy. V 10-s intervaloch (od 10 do 70 s) sme zaznamenávali absorbanciu v UV oblasti pri 240 nm na spektrofotometri Specord M 40 (Carl Zeiss, Jena).

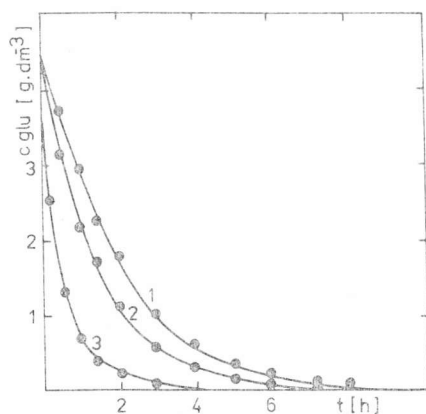
Materiály. Glukózaoxidáza a kataláza sa získali etanolovou precipitáciou extraktu mycélia *A. niger* po glukónovej fermentácii. Spôsob prípravy uvádza práca Stredanského a kol. [8]. Peroxidáza a kataláza boli zo Sigmy (USA) a všetky ostatné použité chemikálie z Lachemy (Brno).

Výsledky a diskusia

Desacharizácia vaječných bielkov. Proces desacharizácie môžu ovplyvňovať viaceré parametre, medzi ktoré patrí aktivita glukózaoxidázy, koncentrácia kyslíka, teplota a pH. Vplyv teploty je pomerne slabý, podobne vplyv pH v neutrálnej oblasti [4, 19]. Preto sa experimenty robili v takých podmienkach (laboratórna teplota, pH 7,5), ktoré sa dajú ľahko dosiahnuť aj v priemyselnom meradle. Výrazný vplyv na rýchlosť úbytku glukózy má koncentrácia kyslíka. Tento problém sa rieši tak, že vysoká hladina kyslíka sa udržiava prídávaním peroxidu vodíka a katalázy [19]. V našom prípade sa koncentrácia kyslíka udržiavala na 40–50 % nasýtení. V experimentoch sa zistilo, že táto koncentrácia je dostatočná a jej zvyšovanie už nemá vplyv na rýchlosť desa-

charizácie. Ani osobitné pridávanie katalázy nebolo potrebné, pretože náš preparát glukózooxidázy [18] má vysokú katalázovú aktivitu ($81,2 \mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$). Väčšina experimentov sa preto zameriavala na sledovanie vplyvu aktivity glukózooxidázy. Výsledky týchto experimentov znázorňuje obrázok 1. Z výsledkov vidieť, že pri aktivite enzýmu $3,33 \mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$ bol desacharizačný proces ukončený za necelých 10 h. Zvýšením aktivity enzýmu na $5,50$ a $8,33 \text{ nkat} \cdot \text{l}^{-1}$ sa tento proces skrátil na 7, resp. 4 h. Urýchlenie desacharizácie môže mať vplyv na ekonomiku procesu – klesajú prevádzkové náklady, ale stúpajú náklady na enzým. Preparát glukózooxidázy a katalázy aktivity $7,12 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$, resp. $81,2 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$ získaný etanolovou precipitáciou extraktu mycélia *Aspergillus niger* po glukónovej fermentácii [18] je vhodný na desacharizáciu a v množstve $0,49 \text{ ml}$ odstráni glukózu z 1 kg vaječných bielkov za 10 h.

Deoxygenácia vína a jahodového džúsu. Odstraňovanie kyslíka z nápojov sa robí kvôli zvýšeniu ich stability a stálosti farby. Nevyhnutnou podmienkou tohto postupu je prítomnosť glukózy v nápoji, preto sa na experimenty použili víno a jahodový džús. Vzhľadom na to, že teplota má malý vplyv na rýchlosť deoxygenácie, prakticky jediným parametrom, ktorý ju ovplyvňuje, je aktivita enzýmu. Rýchlosť úbytku kyslíka z uzavretej vzorky vína v závislosti od aktivity glukózooxidázy znázorňuje obrázok 2. Z výsledkov vidieť, že koncentrácia kyslíka klesala lineárne s časom pri všetkých sledovaných aktivitách enzýmu do

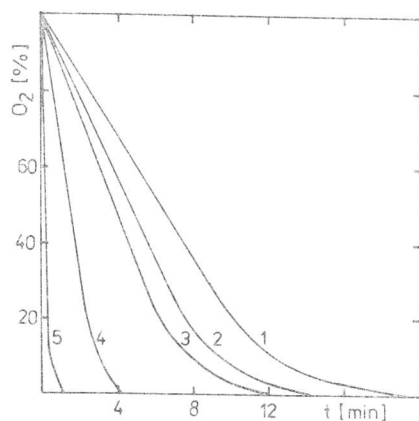


Obr. 1. Rýchlosť spotreby glukózy vo vzorke vaječného bielka v závislosti od aktivity glukózooxidázy. Experimenty prebiehali pri 25°C , hladina kyslíka sa udržiavala na 40–50 % nasýtení, počiatočné pH 7.5. Aktivity glukózooxidázy boli $3,33$ (1), $5,50$ (2) a $8,33$ (3) $\text{nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$. c glu – koncentrácia glukózy.

Fig. 1. The rate of glucose consumption in an egg white sample in dependence on the glucosoxidase activity. The experiments were run at 25°C , oxygen level was maintained at 40–50 % saturation, initial pH 7.5. Glucose oxidase activities were $3,33$ (1), $5,50$ (2) and $8,33$ (3) $\text{nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$. c glu – concentration of glucose.

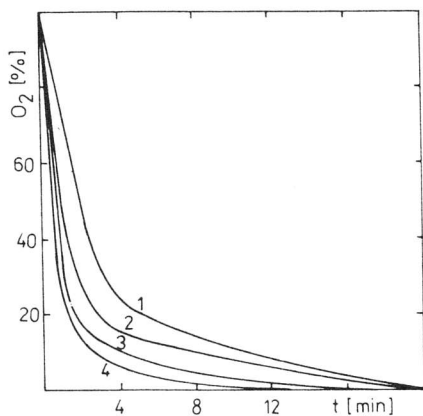
90 % úbytku rozpusteného kyslíka. Pri aktivite enzýmu $2,03 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$, čo je $0,28 \text{ ml}$ preparátu získaného etanolovou precipitáciou aktivity $7,12 \mu\text{kat} \cdot \text{ml}^{-1}$ na 1 l vína, kyslík sa úplne spotreboval za 20 minút . Rýchlosť úbytku kyslíka z uzavretej vzorky jahodového džúsu v závislosti od aktivity glukózaoxidázy znázorňuje obrázok 3. Z výsledkov vidieť, že aktivita glukózaoxidázy hodnoty vyššej ako $2,92 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ už málo vplývala na rýchlosť spotreby kyslíka. Pri tejto aktivite enzýmu sa 50 % kyslíka spotrebovalo počas 50 s a 90 % kyslíka počas 5 minút . Pri aktivite enzýmu $0,73 \text{ nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$ sa 90 % rozpusteného kyslíka spotrebovalo počas $13,5 \text{ minút}$. Pri priemyselnom použití tohto spôsobu deoxygenácie nápojov by stačila aj oveľa nižšia aktivita enzýmu, pretože glukózaoxidáza v uzavretej nádobe s nápojom môže pôsobiť podstatne dlhší čas v priebehu skladovania. Pri nízkych prídavkoch enzýmu je tiež málo pravdepodobné, že by došlo k akýmkoľvek nežiadúcim senzorickým zmenám nápoja.

Odsírenie zahusteného hroznového muštu. Chemický spôsob odsírenia muštu sa zakladá na prídavku peroxidu vodíka do zasíreného muštu. Nedostatkom tejto metódy je to, že pridaný peroxid môže meniť organoleptické vlastnosti, nezreagovaný by mohol mať nepriaznivé účinky na kvasný proces a z hygienického hľadiska je neprípustný. Tieto nedostatky sa dajú minima-



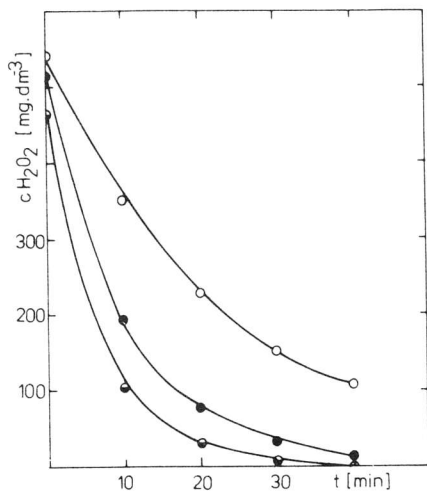
Obr. 2. Kinetiky spotreby kyslíka po prídavku glukózaoxidázy do vzorky vína v uzavretej nádobe v závislosti od aktivity glukózaoxidázy. Spotreba kyslíka sa merala kyslíkovou Clarkovou elektródou pri 25°C . Celkový objem vzorky bol $1,75 \text{ ml}$, aktivita glukózaoxidázy vo vzorke bola $2,03$ (1), $2,85$ (2), $4,07$ (3), $10,17$ (4) a $40,66$ (5) $\text{nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Fig. 2. Kinetics of oxygen consumption following addition of glucose oxidase to a wine sample in a closed container in dependence on glucosoxidase activity. Oxygen consumption was measured by Clarke electrode at 25°C . Total sample volume 1.75 ml , glucose oxidase activities in the samples were 2.03 (1), 2.85 (2), 4.07 (3), 10.17 (4) and 40.66 (5) $\text{nkat} \cdot \text{ml}^{-1}$.



Obr. 3. Kinetiky spotreby kyslíka po prídavku glukózooxidázy do vzorky jahodového džúsu v uzavretej nádobe v závislosti od aktivity glukózooxidázy. Spotreba kyslíka sa merala kyslíkovou Clarkovou elektródou pri 25 °C. Celkový objem vzorky bol 1.6 ml. Aktivita glukózooxidázy vo vzorke bola 0.73 (1), 1.46 (2), 2.92 (3) a 7.29 (4) nkat . ml⁻¹.

Fig. 3. Kinetics of oxygen consumption following addition of glucose oxidase to a strawberry juice sample in a closed container in dependence on the glucose oxidase activity. Oxygen consumption measured by oxygen Clarke electrode at 25 °C. Total sample volume 1.6 ml. Glucose oxidase activities in the samples were 0.73 (1), 1.46 (2), 2.92 (3) and 7.29 (4) nkat ml⁻¹.



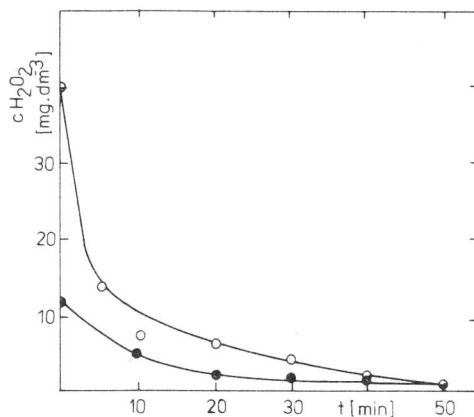
Obr. 4. Vplyv aktivity katalázy na úbytok koncentrácie peroxidu vodíka z jeho vodného roztoku pri teplote 25 °C. Výsledná aktivita enzýmu bola 7.39 (○), 14.76 (●), 22.14 (◐) nkat . ml⁻¹.

Fig. 4. The influence of catalase activity on the concentration decrease of hydrogen peroxid from its water solution at 25 °C. Resulting activity of the enzyme was 7.38 (○), 14.76 (●), 22.14 (◐) nkat . ml⁻¹.

lizovať pridaním katalázy, ktorá nezreagovaný peroxid vodíka rýchlo rozkladá na kyslík a vodu. Preto sa testoval preparát katalázy získaný etanolovou precipitáciou extraktu mycélia *Aspergillus niger*.

Pred vlastnou aplikáciou katalázy do muštu sa odskúšal vplyv teploty a aktivity katalázy na rýchlosť úbytku peroxidu vodíka z jeho modelového roztoku (H_2O_2 vo fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7,0). Vplyv teploty sme sledovali v rozsahu 25–45 °C, pričom sme zistili, že veľmi málo vplýva na rýchlosť úbytku peroxidu. Proces bol najrýchlejší pri 25–30 °C, čo je z priemyselného hľadiska výhodné. Vplyv aktivity katalázy na rýchlosť úbytku peroxidu znázorňuje obrázok 4.

Potom sme sledovali vhodnosť preparátu na odstraňovanie prebytku H_2O_2 po chemickom odsírení zahusteného hroznového muštu. Podstata celého procesu je v tom, že k zasíreniu muštu sa pridá 3 % H_2O_2 v množstve ekvivalentnom stanovenému voľnému SO_2 . Po zreagovaní sa ustáli nová rovnováha a časť viazaného SO_2 prejde do voľnej formy. Potom sa pridá nadbytok H_2O_2 do výslednej koncentrácie v rozmedzí 10–200 mg · l⁻¹. Po zreagovaní sa prebytok H_2O_2 odstraňoval katalázou. Sledovala sa rýchlosť rozkladu H_2O_2 pri jeho rôznych nadbytočných množstvách. Výsledky ukázali, že výhodnejšie je používať nižšie prebytky H_2O_2 (do 40 mg · l⁻¹), pretože pri rovnakej aktivite katalázy prebehne proces podstatne rýchlejšie (obr. 5). Peroxid vodíka koncentrácie 40 mg · l⁻¹ bol takmer úplne odstránený za 50 min katalázou aktivity 24,36 nkat · ml⁻¹, čo predstavuje 0,3 ml preparátu (aktivita 81,2 μkat · ml⁻¹)



Obr. 5. Sledovanie rýchlosti úbytku peroxidu vodíka v mušte pri jeho počiatočnej koncentrácii 40 mg · l⁻¹ (12 mg · l⁻¹) po pridaní katalázy s výslednou aktivitou v roztoku 24,36 (○) a 40,6 (●) nkat · ml⁻¹ pri teplote 25 °C.

Fig. 5. Following the rate of hydrogen peroxide decrease in the juice at its initial concentration of 40 mg l⁻¹ (12 mg l⁻¹) after the addition of catalase with resulting activity in the suspension 24.36 (○) and 40.6 (●) nkat ml⁻¹ at 25 °C.

na 1 l zahusteného muštu. Koncentrácia voľného SO₂ po celej procedúre bola prakticky nulová. Celý proces odsírenia sa úspešne vyskúšal aj v poloprevádzkovom meradle v 100 l muštu. Takýto spôsob odsírenia muštov sa ukázal vhodný, čo sa týka účinnosti i zo senzorického a hygienického hľadiska.

Literatúra

1. PEPPLER, H. J. – REED, G., Enzymes in Food and Feed Processing. In: Biotechnology 7A, Enzyme Technology (Eds. H. J. Rehm, G. Reed) Verlag Chemie, Weinheim 1987, s. 547.
2. NEIDELMAN, S.: Enzymology and Food Processing. In: Biotechnology in Food Processing (Eds. S. K. Harlander, T. P. Labuza), Noyes Publications Park Ridge, New Jersey, 1986, s. 37.
3. FROST, G. M. – MOSS, D. A., Production of Enzymes by Fermentation. In: Biotechnology 7A, Enzyme Technology (Eds. H. J. Rehm, G. Reed), Verlag Chemie, Weinheim, 1987, s. 65.
4. Pat. USA, 3162 537.
5. SONG, K. T., Non Gop Kisul Iongo Pogo, 11, 1984, s. 223.
6. KIRSTEIN, D., Lebensmittelindustrie, 28, 1981, s. 205.
7. ORECH, C. S., Mitt Klosterneuburg, 110, 1973, s. 14.
8. Pat. Pol. 129 338.
9. OSADČAJA, I. F.: Fermenty Nar. Choz. Med., 1971, s. 115.
10. Pat. ČSSR 132 372.
11. MEYER, R. J. – KRAUZE, J., J. Dairy Sci., 42, 1960, s. 844.
12. Pat. USA, 2976 184.
13. Pat. Can. 658 158.
14. RAND, A. G., J. Food Sci., 37, 1972, s. 698.
15. KAUL, J.: J. Microbiol. Biotechnol., 1, 1986, s. 12.
16. HARTMEIER, W., Biotechnol. Lett., 8, 1986, s. 565.
17. Enciklopedija vinogradstva (Gl. red. A. I. Timuš), Kišinev 1986, s. 365.
18. STREĎANSKÝ, M. – CÍFERSKÁ, G. – BARÁTH, Z. – ROSENBERG, M. – ŠTURDÍK, E. – KOČAN – J., MASTIHUBA.: Izolácia a biochemická charakterizácia glukózaoxidázy z *Aspergillus niger* pre potravinárske a analytické využitie. Bull. PV (v tlači).

Do redakcie došlo 7. 12. 1988

Пищевое использование глюкозооксидазы и каталазы из *Aspergillus niger*

Резюме

Препараты глюкозооксидазы и каталазы полученные этаноловым осаждением экстракта мицелия *Aspergillus niger* после глюконовой ферментации были проверены для некоторых пищевых целей. Авторы наблюдали за влиянием активности глюкозооксидазы на скорость обессахаривания яичного белка. Высокую концентрацию

кислорода поддерживало добавление перекиси водорода. В дальнейшем авторы исследовали скорость устранения кислорода из вина и сока в зависимости от активности глюкозооксидазы. Препарат каталазы был проверен с точки зрения способности устранения перекиси водорода после обессеривания стуженного виноградного суслу. Исследовалось влияние температуры, активности каталазы и исходной концентрации перекиси водорода на течение процесса. Препараты глюкозооксидазы и каталазы являются подходящими для всех определенных применений.

Utilization of glucose oxidase and catalase from *Aspergillus niger* in food industry

Summary

Glucosoxidase and catalase preparation obtained by ethanolic precipitation of the extract from *Aspergillus niger* mycelia after gluconic fermentation were tested for some food industry uses. The influence of the glucose oxidase activity on the rate of egg white desaccharization has been investigated. High oxygen concentration has been maintained by adding hydrogen peroxide. Further, the rate of oxygen removing from wine and juice in dependence on glucose oxidase activity has been studied. The catalase preparation has been tested for the ability to remove hydrogen peroxide following the chemical desulphuring of concentrated wine must. The influence of temperature, catalase activity and initial H_2O_2 concentration on the process has been investigated. The glucose oxidase and catalase preparations were suitable for all the applications tested.