

# Szilárd fázisú biokatalizátorok kialakítása és jellemzése glükóz oxidáció élelmiszeripari célú alkalmazásának előkészítése céljából

SISAK Csaba\*, CSANÁDI Zsófia és SZAJÁNI Béla

Pannon Egyetem, Műszaki Informatikai Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, 8200 Veszprém, Egyetem u. 10.

## 1. Bevezetés

A biokatalizátorok, azaz az enzimek, ill. a multienzim rendszerekként működtetett mikroorganizmusok, növényi és állati szövetek jelentősége napjainkban is fokozódik az ipari technológiákban, pl. az élelmiszeripar szinte valamennyi ágában, a gyógyszeriparban és a finomvegyszer-gyártásban. Előnyük a szerves katalizátorokkal szemben elsősorban kiemelkedő specifikus, és az, hogy mérsékelt hőfokon, semlegeshez közeli pH mellett képesek kifejteni hatásukat.

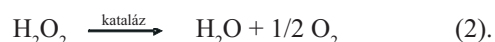
Több élelmiszeripari technológiában szükség van az induláskor jelenlévő vagy a folyamat során keletkező glükóz eltávolítására anélkül, hogy a termék egyéb összetevői károsodnának:

- A tojáspor előállítása során a tojásfehérje glükóztartalmát (kb. 4 g dm<sup>-3</sup>) a szárítás során bekövetkező karamellizáció (barnulás) elkerülése és a tartósabb termék előállítása érdekében kell eltávolítani.<sup>1</sup>
- Az ún. prebiotikumként<sup>2</sup> alkalmazott fruktooligoszacharidok (FOSZ) szacharózból történő biokatalitikus szintézisének a melléktermékként képződő glükóz erős kompetitív inhibitoraként működik, tehát a hozam és a termelékenység növelése érdekében célszerű a glükóznak a szintézissel szimultán eliminálása.<sup>3</sup>

A glükóz oxidáz (GOD) ( $\beta$ -D-glucose:oxygen 1-oxidoreductase; EC 1.1.3.4.) egyike azon enzimeknek, amelyekre nagyfokú fajlagosság jellemző,<sup>4</sup> és ezt a tulajdonságát hatékonyan ki lehet használni a glükóz szelektív eltávolítására. Az enzim a következő bruttó egyenlet szerint működik:



A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> melléktermék képződése miatt inaktiválódhat a glükóz oxidáz<sup>5</sup>, ezért szükséges, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t elbontsák, mégpedig célszerűen egy másik enzimmel, a katalázzal (hydrogen peroxide:hydrogen peroxide oxidoreductase; EC 1.11.1.6.):



A kereskedelmi GOD készítmények rendszerint elegendő mennyiségben tartalmaznak katalázt is, ill. emellett gyakran más enzimeket. A felhasználási céltól függ, hogy el kell-e távolítani ez utóbbiakat, vagy –, ha nem zavarják a célreakciót - benn maradhatnak a készítményben.

A glükózmentesítés ipari megvalósításánál fontos szempont, hogy a viszonylag drága enzim elválasztható legyen a terméktől. Élelmiszerek gyártásánál ez azért is lényeges, hogy idegen fehérje ne kerüljön a termékbe. Ezt a követelményt legegyszerűbben az enzim szilárd szemcsés hordozóra való rögzítésével, immobilizálásával<sup>6</sup> lehet teljesíteni. A rögzített vagy szilárd-fázisú kapcsolható biokatalizátorok legfontosabb további előnyei a következők:<sup>7,8</sup> Alkalmazásuk lehetővé teszi folyamatos üzemmód megvalósítását; nagy katalizátorsűrűség érhető el a reaktorban; és a rögzítés rendszerint megnöveli a biokatalizátor stabilitását.

A GOD immobilizálására számos módszert dolgoztak ki. Eredményesen rögzíthető többek között a kalcium-alginát gélgyöngybe zárással,<sup>9</sup> kovalens kötések kialakításával, nikkell oxidhoz,<sup>10</sup> alumínium vegyületekhez,<sup>11,12</sup> glioxil-agarózhoz,<sup>13</sup> poliakril-amidhoz,<sup>14</sup> kapcsolható továbbá polimer membránhoz is.<sup>15</sup>

A GOD koszubsztrátja az oxigén. Mivel vizes oldatokban rendszerint rosszul oldódik, az oxidációs folyamat sebességét gyakran a gázból a folyadékfázisba való oxigéntranszport sebessége határozza meg. Az átvitel javítható a fázisok intenzív érintkeztetésével, vagy levegő helyett tiszta oxigéngáz alkalmazásával. Olyan rendszerekben, amelyekben a közvetlen buborékoltatás zavart okozna (pl. a tojásfehérje felhabzik) buborékmentes levegőztetők, oxigenátorok használhatók.<sup>16,17</sup>

Jelen közleményünkben azokat az eredményeinket mutatjuk be, amelyek két, gyakorlatban fontos enzimkatalizált glükózoxidációs folyamatnak, az előbbieken említett tojásfehérje glükózmentesítésnek, ill. a fruktooligoszacharid szintézis során keletkező glükóz melléktermék *in situ* eliminálásának a megvalósítására alkalmas szilárd-fázisú biokatalizátorok előállítására, tesztelésére, ill. a reakció-körülmények optimalizálására vonatkoznak.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. Tojásfehérje glükózmentesítésére alkalmas biokatalizátor (Biokatalizátor "A") előállítása

A rögzítendő biokatalizátor kiválasztásánál olyan kereskedelmi glükóz oxidáz készítmények között válogattunk, amelyeknek elegendően nagy volt a kataláz aktivitása.

A Novo Nordisk (Dánia) által *élelmiszeripari célra* forgalmazott NOVOZYM 771-re<sup>18</sup> esett a választásunk,

\*Dr. Sisak Csaba. Tel.:06-88-624-036; fax: 06-88-624-036; e-mail: sisak@mukki.richem.hu

amelynek GOD aktivitása  $1,34 \text{ U mg}^{-1}$ . Egységnyi az az enzimtömeg, amely percenként  $1 \text{ } \mu\text{mol}$   $\beta$ -D-glükóz oxidációját katalizálja pH 5,1-n és  $35^\circ\text{C}$ -on.<sup>9</sup> A preparátum kataláz aktivitása  $1,44 \text{ U mg}^{-1}$  volt.  $1 \text{ U}$  annak az enzimtömegnek felel meg, amely percenként  $1 \text{ } \mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -t bont el pH 4,5-n és  $25^\circ\text{C}$ -on.<sup>19</sup> A megvalósítandó folyamat esetében nem volt jelentősége annak, hogy a preparátum glükózidáz szennyezést is tartalmaz.

Az enzimrögzítéshez biokompatibilis hordozóanyagként Amberlite UP 900 típusú anioncserélő gyantát alkalmaztunk (Rohm and Haas, USA). A gyanta szemcsemérete  $560\text{--}700 \text{ } \mu\text{m}$ , pórusmérete  $40\text{--}75 \text{ nm}$ , fajlagos felülete pedig  $25\text{--}30 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .

Rögzítő ágens az élelmiszeriparban elfogadott glutáraldehid volt, amelyet 25%-os vizes oldat formájában a REANAL-tól szereztünk be. A többi vegyszer is reagens minőségű volt.

A szűrt tojásfehérjét a SÁTO Tojásfeldolgozó és Kereskedelmi Kft. (Budapest) bocsátotta rendelkezésünkre.

A kombinált rögzítés<sup>20,21</sup> első lépése során az ioncserélő gyantán adszorbeáltuk az enzimeket oly módon, hogy a szemcséket NOVOZYM 771 oldatban rázattuk 2 óra hosszat, pH 5,1-n és  $25^\circ\text{C}$ -on. Ezután a szuszpenziót leszűrtük és többször mostuk ionmentes vízzel. A második lépésben a gyanta-fehérje komplexet  $0,05 \text{ mól}$  acetát pufferben (pH 5,1) oldott különböző koncentrációjú glutáraldehidben, különböző ideig rázattuk az adszorbeált fehérjemolekulák közötti keresztkötések kialakítása érdekében, majd a szemcséket szűrtük és aldehidmentesre mostuk (lásd részletesen Sisak és munkatársai).<sup>22</sup> A kísérletek alapján meghatározott paraméter optimumok mellett a kötött GOD aktivitás maximális értéket ért el. Azt is ellenőriztük, hogy az ezen körülmények között megkötődött kataláz aktivitás elegendő-e a  $\text{H}_2\text{O}_2$  megfelelően gyors elbontásához.

A fehérjetartalmat Lowry és munkatársai módszerével<sup>23</sup> határoztuk meg. A glükózkoncentrációt fotometriával, o-toluidin reagens (SIGMA, USA) felhasználásával mértük,<sup>24</sup>  $620 \text{ nm}$ -en, SPEKTROMOM 195D típusú (MOM) műszerrel. Az oldott és a rögzített preparátumok GOD aktivitásának meghatározása során a glükózkoncentráció csökkenését vizsgáltuk a fent említett o-toluidines módszerrel.<sup>22,25</sup> A kataláz aktivitás értékeket a  $\text{H}_2\text{O}_2$  titán-dioxiddal alkotott komplexe  $415 \text{ nm}$ -en mérhető abszorbanciájának változása alapján állapítottuk meg.<sup>19,22</sup>

## 2.2. Fruktooligoszacharid szintézis során képződő glükóz in situ eliminálására alkalmas biokatalizátor (Biokatalizátor "B") előállítás

A tojásfehérje glükózmentesítésére alkalmasnak talált NOVOZYM 771 nem bizonyult használhatónak a FOSZ szintézis során képződő glükóz eliminálására, mivel az oligoszacharid céltermékek glükózidkötéseit bontó enzimeket is tartalmaz. Ezért *finomvegyszerként forgalmazott* glükóz oxidáz (FLUKA; *Aspergillus niger*) és kataláz (SIGMA; marha májból izolált) keverékével dolgoztunk. A GOD aktivitás  $215 \text{ U mg}^{-1}$ , a kataláz aktivitás  $830 \text{ U mg}^{-1}$  volt.

Areakcióelegy összetevői a FOSZ szintézis reakcióegyével azonosak voltak: szacharóz (REANAL), kesztőz, nisztóz, fruktozil-nisztóz (Wako, Japán) és glükóz (REANAL). A szacharóz és az oligoszacharidok koncentrációit egy kétórás szintézisreakció elegyét modellezve állítottuk be<sup>26</sup>. A glükóz koncentrációját  $5\text{--}25 \text{ g dm}^{-3}$  között változtattuk, hogy kerüljük a túl intenzív  $\text{H}_2\text{O}_2$  képződést.

A kombinált rögzítés során a kiindulási glükóz oxidáz / kataláz tömegarányt 2:1-re állítottuk be annak érdekében, hogy a kötött GOD és kataláz aktivitás arányokra hasonló értékeket kapjunk, mint a NOVOZYM 771 rögzítésekor. A GOD-ot ( $50 \text{ mg}$ ) és a kataláz ( $25 \text{ mg}$ )  $10 \text{ cm}^3$  pH=5,1 ( $0,05 \text{ M}$ ) acetát pufferben oldottuk, majd az oldatot  $1 \text{ g}$  regenerált anioncserélő gyantához adtuk. Szobahőfokon való  $24 \text{ óra}$  rázatást ( $150 \text{ rpm}$ ) követően a szemcséket szűrtük és acetát pufferrel mostuk. Ezután  $1 \text{ h}$  rázatás ( $150 \text{ rpm}$ ) következett szobahőfokon,  $10 \text{ cm}^3$ -nyi 5,1-es pH-jú acetát pufferben oldott glutáraldehiddel, amelynek koncentrációját és a kontaktidőt változtattuk. Végül a szemcséket aldehidmentesre mostuk és levegőn kiszárítottuk.

Az enzimrögzítéshez felhasznált egyéb anyagok, továbbá a GOD-, ill. a kataláz aktivitás meghatározási módjai azonosak voltak a 2.1. fejezetben leírtakkal. A glükózkoncentráció meghatározásakor ez esetben nem alkalmazhattuk az o-toluidines módszert, mivel a modellreakció-elegyben levő egyéb cukrok zavarták volna a meghatározást. Ezért egy, a glükózra szelektív enzimes módszerrel, a keletkező NADPH koncentrációját spektrofotometriásan mérve határoztuk meg a reakcióelegyben a glükózkoncentrációt.<sup>26</sup>

## 3. A kísérleti eredmények és értékelésük

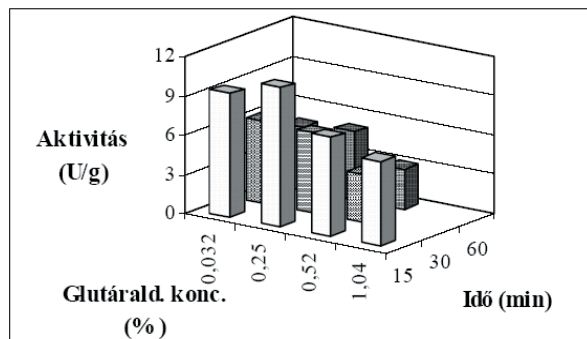
### 3.1. A GOD és a kataláz koimmobilizálása NOVOZYM 771-ből kiindulva

A NOVOZYM 771 típusú enzimoldat fehérjéinek adszorpciójára szolgáló kísérletek során a gyantán megkötött optimális fehérjetartalomra  $27,8 \text{ mg g}^{-1}$  érték adódott, amelyet akkor kaptunk, ha  $157 \text{ mg}$  fehérjét tartalmazó NOVOZYM 771 oldatban rázattunk  $1 \text{ g}$  hordozót.<sup>23</sup>

Az adszorbeált enzimmolekulák közötti keresztkötések kialakítása céljából végzett vizsgálataink folyamán a glutáraldehid reagens koncentrációját és a kötési időt változtattuk. A legjobb fajlagos GOD aktivitást - a  $10,2 \text{ U g}^{-1}$  száraz gyanta értéket - a  $0,25\%$  glutáraldehid oldatban végzett  $15 \text{ perces}$  kezelés esetén értük el (ld. 1. ábra). Ez aktivitásérték más, a szakirodalomban leírt rögzített GOD készítményekkel összehasonlítva közepesnél gyengébbnek számít, de az olcsó alapanyagok és az egyszerű rögzítési technika, továbbá a jó működési stabilitás (ld. a 3.2. fejezetben) figyelembevételével a *Biokatalizátor "A"* jelű preparátum az adott technológiai feladatra jól használhatónak ígérkezett.

Amint azt feltételeztük, az immobilizálási eljárás során nem csupán a GOD, hanem kataláz is jelentős részben megkötődött a hordozón. A vizsgált körülmények között a rögzített kataláz aktivitás értéke ( $2,51 \text{ U g}^{-1}$  száraz gyanta)

többszöröse volt a tojásfehérje glükóztartalmának oxidációja során felszabaduló  $H_2O_2$  kellő sebességű elbontásához szükséges aktivitásnak. A rögzítési eljárás nem volt érzékeny a léptéknövelésre: 1000-szeresére növelve a reakcióelegy tömegét a fajlagos aktivitás eltérése a laborléptékhez képest nem haladta meg a  $\pm 5\%$ -ot.<sup>23</sup>

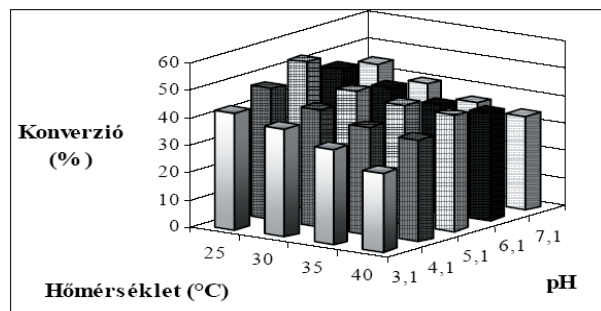


1. Ábra. A rögzítési optimumok meghatározása a NOVOZYM 771 alapú Biokatalizátor „A” előállításához

### 3.2. A Biokatalizátor „A” preparátum működési optimumainak és stabilitásának meghatározása

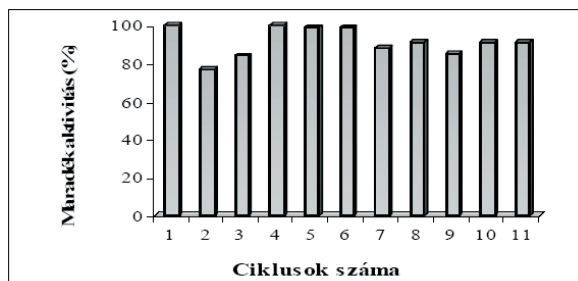
Az optimális működési körülmények meghatározása során 450 mg-nyi immobilizált enzimet adtunk  $10\text{ cm}^3$ , különböző pH-jú acetát pufferben oldott glükózhoz ( $4\text{ g cm}^{-3}$ ). A szuszpenziókat 1 órán át ráztuk különböző hőmérsékleteken. Ahogy a 2. ábra mutatja, az optimumokra a következő értékek adódtak: pH 5,1; hőmérséklet  $25^\circ\text{C}$ <sup>23</sup>. Ezek a paraméterek gyakorlatilag megegyeztek a gyártó által a NOVOZYM 771-re közölt adatokkal.<sup>18</sup>

A preparátum működési stabilitását szakaszos glükózmentesítési kísérletek sorozatával állapítottuk meg. Az előbbi bekezdésben leírt reakcióelegyet úgy módosítottuk, hogy a cukoroldatot tojásfehérjével cseréltük fel. Három órán keresztül végeztük a glükóz eliminálását. Ez alatt az idő alatt a cukor döntő hányada oxidálódott. Ezután a rögzített enzimet leszűrtük, majd friss tojásfehérjében újra szuszpendáltuk. Ezt a műveletsort 11-szer ismételtük. A produktivitás értékek változását a 3. ábrán mutatjuk be. Az eredmények extrapolálásával mintegy 6 hónapos felezési időt kaptunk, tehát a szilárd fázisú biokatalizátorunk kellően stabilnak bizonyult. Ezt támasztotta alá az a megfigyelésünk is, hogy két évig hűtőszekrényben puffer alatt tartva a preparátumot, az semmit sem veszített aktivitásából.



2. Ábra. A NOVOZYM 771 alapú Biokatalizátor „A” működési optimumának meghatározása.

A készítmény gyakorlati alkalmazhatóságát úgy igazoltuk, hogy egy folyamatos üzemű, nagylaboratóriumi léptékű, mechanikusan kevert, spirál csőmembránnal levegőztetett, háromlépcsős fluidizációs reaktorban üzemi körülmények között végeztünk kísérleteket. A reaktorban 4 órás tartózkodási idő esetén, 1,2 bar csőoldali oxigénnyomás mellett lényegében glükózmentes tojáslét állítottunk elő.<sup>23</sup>



3. Ábra. A NOVOZYM 771 rögzítésével nyert Biokatalizátor „A” működési stabilitása.

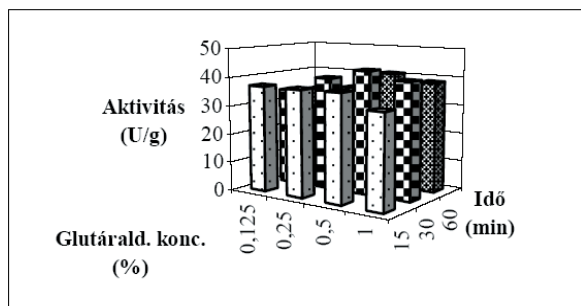
### 3.3. Finomvegyszer minőségű GOD és kataláz koimmobilizálása Biokatalizátor „B” előállításához

A 2.2. fejezetben leírtak szerint végrehajtott enzimadszorpciót követően vizsgáltuk a glutaraldehid keresztkötések optimális kialakításának körülményeit. Az eredményeket a 4. ábrával illusztráljuk. A diagramból a kötési időre 30 perces, a glutaraldehid koncentrációra 0,5%-os optimum értékek olvashatók le. A Biokatalizátor „B” két keresztkötési paraméterre feltehetően azért kaptunk a 1. ábrán láthatóknál nagyobb értékeket, mert itt a reakcióelegybe bemért összfehérje-koncentráció lényegesen nagyobb volt, mint a NOVOZYM 771 rögzítésekor. Az optimális rögzítési körülmények között a Biokatalizátor „B” jelű preparátumra  $40,4\text{ U g}^{-1}\text{ GOD}$ - és  $39,5\text{ U g}^{-1}$  katalázaktivitás értékeket kaptunk. Ezek az értékek természetesen lényegesen magasabbak, mint a Biokatalizátor „A” megfelelő jellemzői, hiszen az enzimidatok kiindulási aktivitásai is több mint két nagyságrenddel nagyobbak voltak.

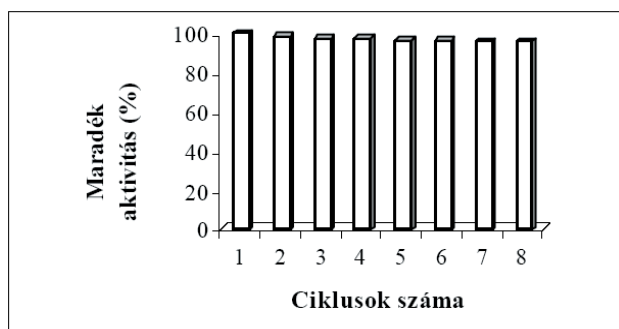
### 3.4. A Biokatalizátor „B” preparátum működési optimumainak és stabilitásának meghatározása

Mindkét kísérletsorozatot a 3.2. fejezetben leírtakkal csaknem azonos módon hajtottuk végre. A Biokatalizátor „B” működési optimumai jó közelítéssel megegyeztek a Biokatalizátor „A” megfelelő értékeivel. A glükózoxidáció számára a legkedvezőbb pH 5,1, a hőmérséklet pedig  $30^\circ\text{C}$  volt. A stabilitásvizsgálatok során 8-8 órás reakcióidővel 8 ciklust futtattuk le  $20\text{ g dm}^{-3}$  kiindulási koncentrációjú glükózoldattal,  $2\text{ mol}$  koncentrációjú szaharóz jelenlétében. A GOD produktivitás az 5. ábrán látható ütemű lassú csökkenést mutatott, de ez nem befolyásolta a használhatóságot.

A Biokatalizátor „B” típusú koimmobilizált GOD + kataláz preparátummal jelenleg folytatunk, az ugyancsak rögzített fruktozil-transzferázal katalizált FOSZ szintézissel<sup>27</sup> szimultán, glükóz eliminációs kísérleteket. A kezdeti eredmények biztatóak.



4. Ábra. A rögzítési optimumok meghatározása a FLUKA GOD és SIGMA kataláz alapú Biokatalizátor „B” előállításához



5. Ábra. FLUKA GOD és SIGMA kataláz koimmobilizálásával kapott Biokatalizátor „B” működési stabilitása

#### 4. Összefoglalás

Élelmiszeriparban felhasználható, glükóz oxidáz és kataláz koimmobilizálásával nyerhető biokatalizátorok előállítási lehetőségeit és katalitikus sajátosságait vizsgáltuk. A kiindulási natív enzimkészítmények tisztasági fokát aszerint kellett megválasztanunk, hogy a rögzített preparátumot milyen reakcióban kívánjuk alkalmazni. A bemutatott eredményekkel igazoltuk, hogy glükóz oxidáz- és kataláz-tartalmú enzimelegyeket anioncserélő gyantán adszorbeáltatva, majd a megkötődött enzimmolekulák között glutáraldehiddel keresztkötéseket létrehozva olyan koimmobilizált biokatalizátorokat lehet létrehozni, amelyek kellően nagy GOD és kataláz aktivitással és működési stabilitással rendelkeznek. A stabilitást nem befolyásolta lényegesen, hogy az alapanyagként használt oldott enzimek technikai vagy finomvegyszer minőségűek.

A preparátumok egyikét sikeresen alkalmaztuk egy, az élelmiszeriparban, a termék értékének és eltarthatóságának növeléséhez szükséges glükózmentesítési folyamatban, nevezetesen tojásfehérje glükóztartalmának eliminálására. A másik készítménynek szacharózból kiinduló enzimkatalitikus fruktoooligoszacharid szintézis során várható hozamjavító hatását jelenleg vizsgáljuk.

#### Hivatkozások

- Baldwin, R. R.; Campbell, H. A.; Thiessen, R.; Lorant, G. J. *Food Technol.* **1953**, 7, 275.
- Bornet, F. R. J.; Brouns, F.; Tashiro, Y.; Duvillier, V. *Dig. Liv. Dis.* **2002**, 34, 111.
- Yun, J. W. *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, 19, 107.
- Wilson, R.; Turner, A. P. F. *Biosens. Bioelectron.* **1992**, 7, 165.

- Fernández-Lafuente, R.; Rodríguez, V.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, G.; Arminsen, P.; Sabuquillo, P.; Guisán, J. M. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **1999**, 7, 173.
- Chibata, I.; Tosa, T. *Applied Biochemistry and Bioengineering* (eds.: Wingard, L. B.; Katchalski-Katzir, E.; Goldstein, L.), Vol. 1., Academic Press: New York, **1976**.
- Cabral, J. M. S.; Best, D.; Boross, L.; Tramper J. (eds.) *Applied Biocatalysis*, Harwood Academic Publishers: GB.-Switzerland, **1994**.
- Hultin, H. O. *Food Technol.* **1983**, 37, 66.
- Blandino, A.; Macias, M.; Cantero, D. *Process Biochem.* **2001**, 36, 601.
- Wetall, H. H.; Hersh, L. S. *Biochem. Biophys. Acta* **1970**, 206, 54.
- Bautista, F. M.; Campelo, J. M.; Garcia, A.; Jurado, A.; Luna, D.; Marinas, J. M.; Romero, A. A. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **2001**, 11, 567.
- Alberti, B. M.; Klivanov, A. M. *Enzyme Microb. Technol.* **1982**, 4, 47.
- Betancor, L.; López-Gallego, F.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; Dellamora-Ortiz, G.; Guisán, G.; Fernández-Lafuente, R. *J. Biotechnol.* **2005**, 121, 284.
- Szajani, B.; Molnar, A.; Klamar, G.; Kalman, M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, 14, 37.
- Godjevargova, T.; Dayal, R.; Turmanova, S. *Macromol. Biosci.* **2004**, 4, 950.
- Martin, S.; Soucaille, P.; Condoret, J. S. *Bioprocess Eng.* **1995**, 13, 293.
- Link, T.; Backstrom, M.; Graham, R.; Essers, R.; Zorner, K.; Gatgens, J.; Burchell, J.; Taylor-Papadimitriou, J.; Hansson, G. C.; Noll, T. *J. Biotechnol.* **2004**, 110, 51.
- NOVOZYM 771. Product sheet B 427d-GB. Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark, **1997**
- Pifferi, P. G.; Bonora, V.; Spagna, G.; Tramontini, M. *Process Biochem.* **1993**, 28, 29.
- Dinella, C.; Lanzarini, G.; Stagni, A.; Palleschi, C. *J. Chem. Techn. Biotechnol.* **1994**, 59, 237.
- D'Annibale, A.; Stazi, S. R.; Vinciguerra, V.; Di Mattia, E.; Sermanni, G. G. *Process Biochem.* **1999**, 34, 697.
- Sisak, C.; Csanádi, Z.; Rónay, E.; Szajáni, B. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39, 1002.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Faer, L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265.
- Cooper, G. R.; McDaniel, V. *Clin. Chem.* **1970**, 6, 159.
- Hang, Y. D.; Woodams, E. E. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1996**, 29, 578.
- Kunst, A.; Draeger, B.; Ziegenhorn, J. *D-Glucose* (in Bergmeyer, H. U. (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., Vol. VI.), VCH Publishers (UK) Ltd.: Cambridge, UK, **1988**.
- Csanádi, Z.; Sisak, C. *Acta Aliment. Hung.* **2006**, 35, 205.

#### Formation and characterization of solid-phase biocatalysts in order to prepare food industrial application of glucose oxidase

Preparation of co-immobilized glucose oxidase (GOD) and catalase and application of two types of the solid-phase biocatalysts to glucose oxidation for food industrial purposes have been investigated.

A co-immobilization method on Amberlite UP 900 anion exchange resin using a combination of adsorption of enzymes and cross-linking of adsorbed enzyme molecules by glutaraldehyde treatment has been elaborated.

For elimination of glucose content of egg white liquor – to prevent the browning at egg white powder production -, an industrial biocatalyst (NOVOZYM 771) containing sufficient activity of

both GOD and catalase has been proved to be applicable for immobilization. At the optimal cross-linking parameters (15 min fixing time; 0.25% glutaraldehyde concentration), the GOD and catalase activities of the fixed biocatalyst were 10.2 and 2.51 units  $\text{g}^{-1}$  dry solid, respectively. These values have been proved to be suitable for the practical purposes of desugaring of egg white. Optimal operational parameters (Fig. 2), such as temperature (25°C) and pH (5.1) for immobilized glucose oxidase have been found practically equal to the data published by the dealer for NOVOZYM 771. The preparation showed high storage and operational stability (Fig. 3), its half-life time was about 6 months.

The immobilized enzyme (*Biocatalyst "A"*) was used for the elimination of glucose from egg white in a pilot-scale three-stage fluidized-bed bioreactor with mechanical mixing, equipped with large porous surface for bubble-free transport of oxygen as co-substrate. The glucose content was fully oxidized using oxygen pressure of 1.2 bar and 4 h residence time at 25 °C.

In case of another potential application of glucose oxidase, the carry-out of elimination of glucose by-product (competitive

inhibitor) formed during the enzymatic fructooligosaccharide (FOS) synthesis, NOVOZYM 771 or similar industrial GOD preparations can not be used because of their glucosidase content.

Therefore, purified GOD and catalase of fine chemical quality were mixed in the appropriate ratio (2:1) then the particles of Amberlite UP 900 resin were suspended in the solution. Following the adsorption cross-linking step was carried out. Optima of the procedure – taking into consideration of the achievable maximum of immobilized GOD activity – were 30 min fixing time and 0.5 % glutaraldehyde concentration. It was supposed that the achieved enzyme activities (GOD: 40,4 units  $\text{g}^{-1}$ ; catalase: 39,5 units  $\text{g}^{-1}$ ) were sufficient for in situ elimination of glucose content of FOS synthesis. The optimal operational parameters as well as the stability of the second preparation (*Biocatalyst "B"*) were just the same as in case of *Biocatalyst "A"*.

Application tests of the latter biocatalyst are in progress. The first results in the system containing two solid-phase biocatalysts, fructosyl-transferase and co-immobilized GOD/catalase are promising.