



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

240316
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 08 B 37/00

(22) Prihlášené 20.07.84
(21) [PV 5604-84]

(40) Zverejnené 13.08.85

(45) Vydané 15.06.87

(75)

Autor vynálezu

KARÁCSONYI ŠTEFAN ing. CSc.; KUBAČKOVÁ MARTA ing. CSc.,
BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy kyslého arabinogalaktánu

1

2

Spôsob prípravy kyslého arabinogalaktánu. Podstata riešenia spočíva v tom, že sa neutrálny arabinogalaktán zo smrekovca selektívne oxiduje enzýmom galaktózo oxidázou EC 1.1.3.9 pri hmotnostnom pomere arabinogalaktán : enzýmový proteín 50 až 100 : 1 za prítomnosti enzýmu katalázy v 0,015 až 0,025 mol.l⁻¹ fosfátovom tlmivom roztoku o pH 6,9 až 7,1 pri 20 až 30 °C po dobu 36 až 60 hodín. Po uvedenej dobe sa ďalej oxiduje 0,18 až 0,22 mol.l⁻¹ vodným roztokom jódňanu pri hmotnostnom pomere arabinogalaktán : jódňan 1 : 3,0 až 3,7 po dobu 1,5 až 2 hodín. Potom sa enzým odstráni extrakciou vodným roztokom fenolu, vodná fáza sa oddelí centrifugáciou a dialyzuje oproti vode po dobu 48 hodín. Dialyzovaný roztok sa skoncentruje a vyzráža do etanolu. Vyzrážaný polysacharid sa izoluje a po premytí etanolom vysuší. Vynález môže nájsť široké využitie vo farmaceutickom a kozmetickom priemysle ako antikoagulant prípadne ako pomocný prostriedok v papierenskom a textilnom priemysle.

Vynález sa týka spôsobu prípravy kyslého arabinogalaktánu.

Arabinogalaktán je vysokovetvený neutrálny polysacharid vyskytujúci sa ako prírodná guma v neobvykle vysokom množstve 10 až 35 % vo všetkých druhoch smrekovca (rod *Larix*). Je zložený z L-arabínózy a D-galaktózy v hmotnostnom pomere 1 : 6 až 10, v závislosti od druhu smrekovca, a pozostáva z lineárneho refazca $\beta(1\rightarrow3)$ viazaných jednotiek D-galaktózy, na ktorý sú väzbou $1\rightarrow6$ pripojené jedno až dvojčlánkové bočné vetvenia zložené z $1\rightarrow6$ viazaných D-galaktónových, prípadne $1\rightarrow3$ viazaných L-arabínózových jednotiek [A. E. Clarke, L. R. Anderson, B. A. Stone: *Phytochem.* 18, 521 (1979)]. Arabinogalaktán je ľahko extrahovateľný z dreva smrekovca studenou, prípadne horúcou vodou ako vysokomolekulárny polymér o priemernej molekulovej hmotnosti 17 000 až 100 000 v závislosti od druhu smrekovca, jeho veku a spôsobu izolácie polysacharidu [M. F. Adams, B. V. Ettling: *Industrial Gums*, R. L. Whistler (Ed.), Acad. Press., New York-London (1973)]. Štruktúra arabinogalaktánu je základným faktorom podmieňujúcim reologické vlastnosti polyméru, ktorý napriek vysokej molekulovej hmotnosti je rozpustný vo vode vytvára nízkoviskózne roztoky. Modifikácia arabinogalaktánu pri zachovaní molekulovej hmotnosti znamená zlepšenie jeho pôvodných vlastností. Postupy oxidácie arabinogalaktánu chlóróm [US pat. č. 1 861 229], prípadne kyselinou dusičnou [US pat. č. 1 816 137] vedú k vzniku rôznych nízkomolekulárnych produktov. Oxidácia neutrálnych polysacharidov inými oxidačnými činidlami, napríklad kyslíčným dusičným [W. B. Archwal, Shanker Gouri: *J. Appl. Polym. Sci.* 16, 1971 (1972)] poskytuje deriváty, ktoré v dôsledku nešpecifickej oxidácie všetkých hydroxylových skupín, obsahujú okrem karboxylových aj keto skupiny. Znamená to, že dochádza buď k rozkladu pôvodného polyméru, alebo k vzniku zmesných derivátov.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že sa neutrálny arabinogalaktán zo smrekovca selektívne oxiduje enzýmom galaktózo oxidázou EC 1.1.3.9 pri hmotnostnom pomere arabinogalaktán : enzýmový proteín 50 až 100 : 1 za prítomnosti enzýmu katalázy v 0,015 až 0,025 mol. l⁻¹ fosfátovom tlmivom roztoku o pH 6,9 až 7,1 pri 20 až 30 °C po dobu 36 až 60 hodín. Po uvedenej dobe sa ďalej oxiduje 0,18 až 0,22 mol. l⁻¹ vodným roztokom jódu pri hmotnostnom pomere arabinogalaktán-jód 1 : 3,0 až 3,7 po dobu 1,5 až 2 hodín. Potom sa enzým odstráni extrakciou vodným roztokom fenolu, vodná fáza sa oddelí centrifugáciou a dialyzuje oproti vode po dobu 48 hodín. Dialyzovaný roztok sa skoncentruje a vyzráža do etanolu. Vyzrážaný polysacharid sa izoluje a po premytí etanolom vysuší.

Výhodou navrhovaného postupu oxidácie je skutočnosť, že umožňuje pripraviť vyso-

komolekulárny arabinogalaktán s obsahom 24 % hmotnostných (na hmotnosť pôvodného polysacharidu) D-galakturónovej kyseliny, oxidovať výlučne jednotky D-galaktózy, a to v presne určených polohách štruktúry polysacharidu, t. j. primárne alkoholické skupiny na šiestom uhlíku koncových D-galaktózových jednotiek v hlavnom refazci a bočných vetveniach polysacharidu, použiť takto získaný derivát arabinogalaktánu ako medzistupeň pre jeho ďalšie modifikácie, a že je energeticky nenáročný a nevyžaduje zariadenia odolné voči chemickým činidlám. V dôsledku štrukturálnej a chemickej podobnosti sa môže uvedený postup oxidácie aplikovať na arabinogalaktány všetkých druhov smrekovca. Ďalšia výhoda je, že použitý enzýmovo-chemický postup je veľmi šetrný, nedegradatívny a umožňuje získať kyslý derivát arabinogalaktánu pri zachovaní jeho pôvodnej molekulovej hmotnosti a využitím špecificity pôsobenia enzýmu galaktózo oxidázy modifikovaný polysacharid obsahuje len karboxylové skupiny, t. j. jednotky kyseliny D-galakturónovej. Docieľi sa tým, že sa nestrácajú vlastnosti pôvodného arabinogalaktánu ako v prípade iných oxidačných postupov. Oxidácia arabinogalaktánu, t. j. zavedenie ionizovateľných karboxylových skupín do neutrálneho vysokomolekulárneho polysacharidu umožňuje výrazne zlepšiť jeho pôvodné vlastnosti akými sú rozpustnosť vo vode, nízka viskozita roztokov pri vysokej koncentrácii látky a najmä stabilita jeho roztokov.

Príklad 1

10 g vodorozpustného arabinogalaktánu (izolovaného zo smrekovca) o optickej otáčavosti $[\alpha]_D^{20} -10,3^\circ$ ($c=1$, voda), o priemernej molekulovej hmotnosti 39 000 zloženého z D-galaktózy a L-arabínózy v pomere 10 : 1 a obsahujúceho 33,6 % hmotnostných oxidovateľných D-galaktopyranózových jednotiek, sa rozpustí v 500 ml 0,02 mol. l⁻¹ fosfátového tlmivého roztoku pripraveného z 0,02 mol. l⁻¹ dihydrogénfosforečnanu dvojsodného a monohydrátu dihydrofosforečnanu sodného [G. Gomori: *Meth. Enzymol.* 1, 143 (1955)] o pH 7,0 pri pomere substrát : enzýmový proteín 100 : 1 a oxiduje pôsobením 41,68 μ kat enzýmu galaktózo oxidázy (D-galactose : oxigen oxidoreductase, EC 1.1.3.9) o špecifickej aktivite 0,42 kat/kg proteínu za prítomnosti 300 μ kat katalázy (Reanal, Budapest) pri teplote 20 až 25 °C v prostredí toluénu po dobu 60 hodín. Po ukončení enzýmovej reakcie sa pridá 28,5 g jódu a 36,0 g uhličitanu vápenatého v 600 ml vody a roztok sa mieša 2 hodiny. Po uvedenej dobe sa enzým odstráni extrakciou vodným roztokom fenolu (90 % hmotnostných) za miešania po dobu 1 hodiny, vodná fáza sa oddelí centrifugáciou a dialyzuje oproti vode po dobu 48 hodín. Oxidova-

vaný arabinogalaktán 9,2 g (92 % hmotnostných na hmotnosť pôvodného polysacharidu) o optickej otáčavosti $[\alpha]_D^{20} -1,5^\circ$ ($c=1$, voda) s obsahom urónových kyselín 24 % hmotnostných sa získa skoncentrovaním vodného roztoku, vyzrážaním do trojnásobného objemu etanolu a vysušením získanej zraženiny.

Príklad 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa polysacharid oxiduje enzýmom galaktózo oxidázou pri hmotnostnom pomere arabinogalaktán : enzýmový proteín 50 : 1 za prítomnosti 600 μ kat katalázy. Výťažok produktu je 91 % hmotnostných (na hmotnosť pôvodného polysacharidu) o optickej otáčavosti $[\alpha]_D^{20} -1,3^\circ$ ($c=1$, voda) s obsahom urónových kyselín 24 % hmotnostných. Obsah urónových kyselín pri použití dvojnásobného množstva enzýmu zostal nezmenený.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa teplota enzýmovej reakcie zvýši na 30 °C. Produkt o výťažku 91,5 % hmotnostných (na hmotnosť pôvodného polysacharidu) o optickej otáčavosti $[\alpha]_D^{20} -1,3^\circ$ ($c=1$, voda) s rovnakým obsahom

urónových kyselín ako v príklade 1 sa získa za dobu 36 hodín.

Príklad 4

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa pH 0,015 až 0,025 mol.l⁻¹ fosfátového tlmiaceho roztoku zmení na 6,9, prípadne na 7,1. Doba enzýmovej reakcie ani stupeň oxidácie sa nemení, nakoľko uvedené hodnoty sú v oblasti optimálnych hodnôt enzýmu galaktózo oxidázy.

Príklad 5

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa doba chemickej reakcie (pôsobenie jódňanu) predĺži na 20 hodín. Získa sa polysacharid s obsahom urónových kyselín 29,6 % hmotnostných a so zníženou priemernou molekulovou hmotnosťou 25 200. Zvýšenie obsahu urónových kyselín o 5,6 % hmotnostných je dôsledok degradácie polysacharidu alkalickým prostredím nakoľko dochádza k oxidácii degradáciou vzniknutých nových aldehydických skupín.

Vynález môže nájsť široké použitie vo farmaceutickom a kozmetickom priemysle ako antikoagulant, prípadne ako pomocný prostriedok v papierenskom a textilnom priemysle.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob prípravy kyslého arabinogalaktánu, vyznačujúci sa tým, že sa neutrálny arabinogalaktán zo smrekovca selektívne oxiduje enzýmom galaktózo oxidázou EC 1.1.3.9 pri hmotnostnom pomere polysacharid : enzýmový proteín 50 až 100 : 1 za prítomnosti katalázy v 0,015 až 0,025 ml.l⁻¹ fosfátovom tlmiacom roztoku o pH 6,9 až 7,1 pri teplote 20 až 30 °C po dobu 36 až 60 hodín a potom sa ďalej oxiduje 0,18 až 0,22 mol.l⁻¹ vodným roztokom jódňanu alkalického kovu pri hmotnostnom pomere arabinogalaktán : jódňan 1 : 3,0 až 3,7 po dobu 1,5

až 2,5 hodín, potom sa enzým odstráni extrakciou, oddelí sa vodná fáza a následne sa izoluje polysacharid.

2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa enzým odstraňuje extrakciou vodným roztokom fenolu.

3. Spôsob podľa bodov 1 a 2, vyznačujúci sa tým, že sa polysacharid izoluje z vodnej fázy centrifugáciou a dialyzuje sa oproti vode po dobu 40 až 48 hodín, dialyzovaný roztok sa skoncentruje a vyzráža do etanolu, vyzrážaný polysacharid sa izoluje centrifugáciou a po premytí etanolom vysuší.