

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(18)



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

220296
(11) (B1)

{51} Int. Cl.³
C 12 P 19/00

(22) Prihlášené 08 12 81
(21) (PV 9101-81)

(40) Zverejnené 27 08 82

(45) Vydané 15 02 86

{75}

Autor vynálezu

HEINRICHOVÁ KVETA ing. CSc., PEREČKOVÁ JANA RNDr., BRATISLAVA

{54} Spôsob výroby oligogalakturónových kyselín enzýmovou hydrolýzou

1

2

Vynález sa týka spôsobu výroby oligogalakturónových kyselín enzýmovou hydrolýzou, pri ktorom sa na pektan sodný pôsobí endo-D-galaturónázou z pektinázy pri pH 4,5 až 4,8, teplote 30 až 45 °C počas 60 až 90 minút.

Vynález sa týka spôsobu prípravy oligogalakturnových kyselín enzýmovou hydrolýzou.

Oligogalakturnové kyseliny sa doteraz priemyselne nevyrábajú. Boli pripravené v niektorých laboratóriách cestou chemickej hydrolýzy: Hatanaka C., Ozawa J.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 40, str. 98 (1960); Rexová-Benková L.: Chem. Zvesti 24, str. 59 (1970) alebo enzýmovou degradáciou účinkom purifikovaných enzýmov: Van Houndemhoven F.; Vitt P.; Vister J.: Carbohydr. Res. 34, str. 233 (1974); H. Stutz E.: Advan. Enzymol. 20, str. 41 (1968); Nagel G. W., Wilson T. E.: J. Chromatogr. 41, str. 410 (1969). Všetky popísané postupy chemickej hydrolýzy sú viacstupňové reakcie, ktoré predstavujú zložitú izolačnú techniku. Doteraz popísané enzýmové hydrolýzy sú založené na použití špecifických purifikovaných enzýmov, ktorých príprava je veľmi náročná na čas, zariadenie a špeciálne chemikálie. Tieto nedostatky odstraňuje spôsob výroby oligogalakturnových kyselín enzýmovou hydrolýzou, ktorého podstata spočíva v tom, že sa na pektan sodný pôsobí endo-D-galakturnanázou z pektinázy pri pH 4,5 až 4,8 teplote 30 až 45 °C počas 60 až 90 minút.

Výhodou tohto postupu je, že endo-D-galakturnanázy sa nemusia izolovať v čistom stave na enzýmovú hydrolýzu sa môžu bez predchádzajúcej úpravy použiť priamo obchodné preparáty (Igrazym M 10, Pectofectidín, bulharská pektináza a Leozym R.), bežne používané v konzervárskom priemysle. Poznanie optimálnych podmienok pre účinok týchto enzýmov (pH, teplota, koncentrácia enzýmu a substrátu) ako i ich spôsobu účinku umožňuje cielenú hydrolýzu. Použitie určitého preparátu (z horevymenovaných) umožňuje získať určité zloženie oligogalakturnových kyselín, ako to vyplýva z príkladov 1, 2 a 3. Ďalšou veľkou prednosťou uvedeného spôsobu je, že hydrolýza prebieha formou jednostupňovej reakcie a pre priebeh reakcie nie je potrebný ďalší substrát, alebo konenzým.

Oligogalakturnové kyseliny sú látky dôležité z hľadiska teoretického štúdia pektolytických enzýmov a pektínových látok a pre charakterizáciu v priemysle používaných pektolytických enzýmov.

Príklad 1

1 g pektanu sodného (priemerná molekulová hmotnosť 27 000, obsah uronidov 90 %) sa postupne za miešania rozpustí v 100 ml octanového tlmivého roztoku (pH 4,8), 30 mg enzýmového preparátu (Igrazym M 10) sa rozpustí v 100 ml octanového tlmivého roztoku (pH 4,8). Po prefiltrovaní roztoku enzýmu sa obidva roztoky spoja. Enzýmová hydrolýza prebieha pri 40 °C za miešania alebo trepania 60 minút. Priebeh enzýmovej hydrolýzy sa kontroluje chromatograficky (produkt degradácie) a spektrofotometricky

(stupeň degradácie polymérneho substrátu). Po 60 minútovej hydrolýze sa reakcia ukončí 20 minútovým varom. Roztok po ochladení sa prefiltruje a supernatant sa vysuší mrazovou sublimáciou. Produkty degradácie kyselina D-galaktopyranurónová, kyselina digalakturnová a kyselina trigalakturnová sa rozpustené v 0,05 M fosfátovom tlmivom roztoku naniesú na dve za sebou zapojené kolóny Sephadexu G-25 Fine (molekulové sito) za účelom ich rozdelenia. Efluenty jednotlivých oligogalakturnových kyselín sa zahustia mrazovou sublimáciou a odsolia na kolóne Sephadexu G-10. Výťažok oligogalakturnových kyselín je až 90 %.

Príklad 2

Postupovalo sa ako v príklade 1, s tým rozdielom, že sa 20 mg enzýmového preparátu (Pectofectidín) rozpustilo v octanovom tlmivom roztoku pH = 4,6 a enzýmová hydrolýza prebiehala pri teplote 45 °C počas 80 minút. Produktami enzýmovej hydrolýzy boli: kyselina D-galaktopyranurónová, kyselina digalakturnová, kyselina trigalakturnová, kyselina tetragalakturnová a kyselina pentagalakturnová. Výťažok bol až 70 %.

Príklad 3

Postupovalo sa ako v príklade 1, s tým rozdielom, že sa 25 mg enzýmového preparátu (bulharská pektináza) rozpustilo v octanovom tlmivom roztoku pH = 4,5 a enzýmová hydrolýza prebiehala 90 minút pri teplote 30 °C. Produktami enzýmovej hydrolýzy boli: kyselina D-galaktopyranurónová, kyselina digalakturnová, kyselina trigalakturnová, kyselina tetragalakturnová, kyselina pentagalakturnová, kyselina hexagalakturnová a kyselina heptagalakturnová. Výťažok oligogalakturnových kyselín bol 60 %.

Príklad 4

Kvantitatívne stanovenie jednotlivých oligogalakturnových kyselín sa uskutočnilo chromatografiou na tenkých vrstvách silikagelu na platniach Silufol v systéme 1-butanol—kyselina mravčia—voda (2:3:1) a detekciou anilínftalátom. Oligogalakturnové kyseliny sa identifikovali na základe

hodnôt $\frac{R_f}{1 - R_f}$, ktoré sú lineárne závislé

od stupňa polymerizácie oligogalakturnových kyselín. Ako referenčné vzorky sa použili kyselina D-galaktopyranurónová a štandarty jednotlivých oligogalakturnových kyselín pripravené chemickou hydrolýzou.

Význam vynálezu spočíva v použití oligogalakturnových kyselín na testovanie rôznych enzymatických preparátov používaných

v konzervátorskem a potravinárskom priemysle, ako i pri teoretickom štúdiu vlast-

ností a mechanizmu účinku pektolytických enzýmov.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob výroby oligogalakturónových kyselín enzýmovou hydrolýzou vyznačujúci sa tým, že na pektan sodný sa pôsobí endo-D-

-galakturónanázou z pektinázy pri pH 4,5 až 4,8, teplote 30 až 45 °C počas 60 až 90 minút.