



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

214 432

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 26 01 81

(21) PV 562 - 81

(40) Zverejnené 15 09 81

(45) Vydané 01 07 84

(51) Int. Cl.³ C 12 P 19/12

(75)

Autor vynálezu

KUBALA JOZEF ing.,

BAUER ŠTEFAN dr. ing. DrSc.,

REPÁŠ MILAN člen korešpondent, BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy celobiózy

Vynález sa týka spôsobu prípravy celobiózy z vysladených repných rezkov enzymatickou hydrolýzou.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že repné rezky po uvoľnení L-arabinózy, pektínu, lignínu sa hydrolyzujú enzymaticky za katalýzy celulolytickým enzýmovým komplexom z huby *Trichoderma viride* po dobu 6 až 24 hodín pri 40 až 60 °C, pričom sa z reakčnej zmesi D-glukóza odstráni skvasením pivovarskými kvasinkami a celobióza sa po deionizácii na ionomeničoch kryštalizuje z etylalkoholu.

Vynález sa týka spôsobu prípravy celobiózy z vysladených repných rezkov enzymatickou hydrolýzou.

V rámci štúdia komplexného využitia repných rezkov sa vyriešil spôsob prípravy celobiózy, ktorá je na domácom ako i na zahraničnom trhu veľmi hľadaná, využijúc to, že po vhodnej úprave sú repné rezky ideálnym substrátom pre enzymatickú hydrolýzu za použitia surového enzýmu *Trichoderma viride*.

V literatúre je popísaných niekoľko postupov prípravy celobiózy chemickou cestou synteticky alebo acetolýzou celulózy, kde ako medziprodukt vzniká oktaacetát celobiózy, ktorý sa podrobí deacetylácii. K. Hees, H. Friese; *Annalen*, 456, 49 /1927/, F. Klein; *Z. Agnew. Chem.* 25, 1409, /1922/; A.P.N. Frauchimont; *Ber.* 12, 1941, /1897/, sa zaoberali reakčnými podmienkami prípravy oktaacetátu celobiózy, kde skúmali rôzne pomery anhydridu kyseliny octovej sírovej k celulóze, reakčnej teploty ako aj doby reakcie. Z. H. Skraup; *Ber.* 32, 2413, /1899/, G. Zemplén; *Ber.* 59, 1258, /1926/, C.C. Spencer; *Cellulosechemie*, 10, 61, /1929/, sledovali izoláciu vzniklého medziproduktu, jeho deacetyláciu použitím rôznych metanolátov kovov, ako aj kryštalizáciu celobiózy z reakčnej zmesi pomocou rôznych rozpúšťadiel. B. Helferich, H. Brederick; *Ber.* 64, 2411, /1931/, pripravili v malých množstvách oktaacetát celobiózy syntézou 2,3,4,6, tetra-o-acetyl- α -D-glukopyranozylbromidu s metyl 2,3,6 tri-o-acetyl- β -D-glukopyranozidom. V. E. Gilbert, F. Smith, M. Stacey; *J. Chem. Soc.* 622, /1946/ uskutočnili syntézu 2,3,4,6-tetra-o-acetyl- α -D-glukopyranozylbromidu a sodnú soľ 1,2,3,6-tetra-o-acetyl- β -D-glukopyranózy v 30 % výťažku oktaacetátu celobiózy.

Príprava celobiózy acetolýzou z celulózy ako aj syntézou 2,3,4,6 tetra-o-acetyl- α -D-glukopyranozylbromidu s metyl 2,3,6 tri-o-acetyl- β -D-glukopyranozidom, resp. sodnou soľou 1,2,3,6 tetra-o-acetyl- β -D-glukopyranózy je obtiažna preto, že sa pripravuje cez medziprodukt oktaacetát celobiózy čo si vyžaduje viac stupňovú syntézu.

Navrhovaný spôsob prípravy celobiózy pomocou enzýmu *Trichoderma viride* je v porovnaní s uvedenými metódami prípravy podstatne jednoduchší.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že repné rezky po uvoľnení L-arabínózy, pektínu, lignínu sa hydrolyzujú enzymaticky za katalýzy celulolytickým enzýmovým komplexom z huby *Trichoderma viride* po dobu 6 až 24 hodín pri 40 až 60 °C a z reakčnej zmesi kde vzniká vedľa celobiózy D-glukóza ako vedľajší produkt, ktorý sa odstráni skvasením pivovarskými, kvasinkami, celobióza sa po deionizácií na ionomeničoch kryštalizuje z etylalkoholu.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy celobiózy je: umožňuje použiť natradičnú odpadnú surovinu repné rezky, ktoré vznikajú pri výrobe cukru; poskytuje metódu prípravy, ktorá nahrádza viacstupňovú syntézu; poskytuje metódu, ktorá nahrádza chemický postup prípravy biochemickým postupom.

Príklad

Pripravila sa 2%-ná suspenzia substrátu v enzýmovom roztoku a pridalo sa 0,02 % azidu sodného a kultivačné médium sa upravilo na pH 4,5. Inkubácia prebiehala za miešania

6 hodín pri 50 °C. Centrifugáciou pri 5000 otáčok/min. po dobu 10 minút sa odstránil supernatant od substrátu a supernatant sa inaktivoval pri 0,12 MPa 20 minút. Z inaktivovaného roztoku sa odstránila D-glukóza pridaním pivovarských kvasiniek /3 % suspenzia/ inkubáciou 24 hodín pri laboratórnej teplote. Centrifugáciou pri 5000 otáčok/min. po dobu 10 minút sa roztok oddelil od kvasiniek a preliel cez ionomeniče katex Wofatit KPS 100-200 mesh v H⁺ forme a amex SBW 100-200 mesh v OH⁻ forme. Roztok sa odfarbil aktívnym uhlím a zahustil na sirup. Kryštalizácia sa uskutočnila z etanolu v pomere 1 : 3. Výťažok celobiózy o t.t. 230-238 °C, $[\alpha]_D^{20} = + 35^\circ / C = 5 \% H_2O/$ činil 41 %.

Vynález má rozsiahle použitie pri štúdiu v biochemických procesoch živej hmoty a v praktickom živote, napr. v kozmetike, medicíne a potravinárskom priemysle.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy celobiózy je vyznačený tým, že repné rezky po uvoľnení L-arabinózy, pektínu a lignínu sa hydrolyzujú enzymaticky za katalýzy surovým celulolytickým enzýmom z huby *Trichoderma viride* pri teplote 40 až 60 °C po dobu 6 až 24 hodín za uvoľnenia celobiózy a D-glukózy, pričom D-glukóza sa odstráni skvasením pivovarskými kvasinkami a po deionizácii na ionomeničoch sa kryštalizáciou z etanolu získa chromatograficky čistá celobióza.