



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

**250262**  
(11) (B3)

(61) Autorské osvědčení je závislé  
na autorských osvědčeních č.  
231 458 a 249 325

(22) Přihlášeno 12 03 85  
(21) [PV 1733-85]

(40) Zveřejněno 18 09 86

(45) Vydáno 15 05 88

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 P 19/24

(75)  
Autor vynálezu

VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc., FASSATIOVÁ LIBUŠE RNDr., PRAHA,  
SMOLÍK JIŘÍ RNDr., PARDUBICE,  
KRUMPHANZL VLADIMÍR člen korespondent ČSAV,  
ŠTENGL RADIM ing. CSc., KOVAŘÍK ANTONÍN ing. CSc.,  
HASAL PAVEL ing. CSc., PRAHA

## (54) Způsob enzymové výroby glukózafruktózového sirupu ze sacharózy

1

Vynález se týká způsobu enzymové výroby glukózafruktózového sirupu z čisté sacharózy, jejích technických forem, meziproduktů její výroby a vedlejších produktů její výroby pomocí imobilizovaných buněk, imobilizovaných buněčných stěn a imobilizovaných dezintegrovaných buněčných suspenzí, obsahujících enzym  $\beta$ -D-fruktofuranozidázu (invertázu) připravených podle čs. AO 231 458 a čs. AO 249 325.

Glukózafruktózový sirup má ve srovnání se sacharózou vyšší sladivost a je využitelný v různých průmyslových odvětvích, zejména v potravinářství, farmacii apod.

Sacharózu lze také hydrolyzovat neenzymaticky buď fyzikálně chemicky štěpením na iontoměničích za vysokých teplot za současné izolace obou monosacharidů, nebo chemicky, kyselou hydrolýzou. Uvedené způsoby mají však své ekonomické a jiné limity. V případě štěpení na iontoměničích je limitem koncentrace a kvalita sacharózy, kvalita a dostupnost iontoměničů, resp. jejich regenerace. V případě chemického štěpení sacharózy je limitem vysoká spotřeba minerálních kyselin, koroze aparatury a především špatné organoleptické a vizuální vlastnosti získaného glukózafruktózového sirupu (hořkost a barevnost).

V průmyslové praxi se rovněž využívá buď

2

jednorázová aplikace rozpustného enzymu invertázy, který je předem izolován z různých biologických zdrojů, nebo mnohonásobná opakovaná či kontinuální aplikace tohoto enzymu v různých imobilizovaných formách. Jednorázové využití rozpustné invertázy, popřípadě nativních živých buněk obsahujících tento enzym, je neekonomické, nehledě na špatnou kvalitu finálního produktu, zvláště v případě použití technických enzymových preparátů či živých buněk. Naproti tomu imobilizovaná invertáza umožňuje kontinuální, resp. diskontinuální mnohonásobné využití.

Pro výrobu různých forem imobilizované invertázy je však třeba mít k dispozici tento enzym v technickém nebo čistém stavu. Výroba imobilizované invertázy vyžaduje proto izolaci tohoto enzymu z produkčních buněk nebo jeho dovoz. V úplných vlastních nákladech na výrobu imobilizované invertázy se proto ekonomicky nevýhodně projevují náklady na izolaci enzymu. Jak je známo z patentové a odborné literatury (AO 209 743, AO 214 096, AO 234 059, Enzyme Engineering, Vol. 6., I. Chibata, S. Fukui, L. B. Wingard, eds., Plenum Press, New York and London, 1982), lze různé formy imobilizované invertázy využít pro relativně nízké počáteční koncentrace sacharózy, rádo-

vě 3,0 až 40,0 % hmotnostních, přičemž termostabilita a operační poločasy různým způsobem imobilizovaného enzymu jsou nedostatečné.

Nyní bylo zjištěno, že imobilizované celé buňky, popřípadě další uvedené formy imobilizovaných buněčných materiálů, lze mnohonásobně diskontinuálně nebo dlouhodobě kontinuálně využít pro enzymovou hydrolýzu nejen čisté sacharózy, ale i krystalických (surový cukr, afináda) nebo tekutých meziproduktů její výroby (surová šťáva, lehká šťáva, těžká šťáva, klér, siroby, popřípadě vedlejších produktů výroby cukru (melasa), přičemž počáteční koncentrace těchto substrátů se mohou pohybovat v rozmezí 0,5 až 75,0 % hmotnostních. Při použití vysokých koncentrací uvedených substrátů jsou tyto roztoky silně viskózní, rychlost konverze je nízká a proto je třeba enzymovou hydrolýzu s uvedenými imobilizovanými materiály provádět při vyšších teplotách, což klade značné požadavky na jejich termostabilitu.

V čs. autorském osvědčení č. 231 458 jsou uvedeny způsoby imobilizace celých nativních buněk, zesíťovaných buněk, buněčných stěn a dezintegrovanych buněčných suspenzí s různými enzymatickými aktivitami za použití různých prokaryontních a eukaryontních buněk jako výchozího biologického materiálu, mimo jiné i s aktivitou invertázy. V čs. autorském osvědčení číslo 249 325 je popsán způsob zpevňování a stabilizace částic biokatalyzátoru na bázi buněk kvasinek. Tento způsob a způsoby uvedené v čs. autorských osvědčeních č. 209 265 a 231 458 dovolují aplikaci těchto biokatalyzátorů s invertázovou aktivitou při relativně vysokých teplotách a vysokých počátečních koncentracích substrátu.

Způsob enzymové výroby glukózafruktózového sirupu ze sacharózy podle předmětného vynálezu je vyznačen tím, že k enzymové hydrolýze se použijí celé imobilizované buňky, imobilizované buněčné stěny nebo imobilizované dezintegrované buněčné suspenze a  $\beta$ -D-fruktofuranozidázovou aktivitou připravené podle AO 231 458 a AO 249 325.

Jako substráty se používají vodné roztoky čisté sacharózy, technické sacharózy ve formě přírodního cukru, surového cukru, afinovného cukru, vodné roztoky sacharózy ve formě tekutých druhů cukru, roztoky sacharózy vznikající jako meziprodukt výroby sacharózy jako jsou surová šťáva, lehká šťáva, těžká šťáva, kléry, siroby a dále vedlejší produkty výroby, zejména melasa z výroby, popřípadě zředěná melasa.

Enzymová hydrolýza se provádí při teplotách v rozmezí 10 až 90 °C s výhodou 60 až 75 °C, při pH reakční směsi v rozmezí 4,0 až 7,0 s výhodou 4,5 až 5,5, při počátečních koncentracích sacharózy 0,5 až 75,0 hmotnostních procent s výhodou 40 až 65 hmotnostních procent.

Enzymová hydrolýza se provádí diskontinuálně při koncentraci imobilizovaných materiálů 1 až 200 g vlhké hmoty .litr<sup>-1</sup> reakční směsi s výhodou 100 g vlhké hmoty .litr<sup>-1</sup> reakční směsi buď tak, že se částice imobilizovaných materiálů ponechají trvale v zařízení a z reakční směsi se oddělí roztok obsahující produkty reakce, nebo se separace biokatalyzátorů po ukončení konverze provede mimo reakční zařízení, přičemž v obou případech se imobilizované materiály alespoň dvakrát znovu opakovaně použijí.

Enzymová hydrolýza se provádí kontinuálně, buď v zařízeních s pevným ložem imobilizovaných materiálů protékáním roztoků substrátů pevným ložem částic, nebo s výhodou v zařízeních se vznosným ložem imobilizovaných materiálů buď čerpáním roztoků substrátů tak, aby částice biokatalyzátorů byly v trvalém vznosu prouděním kapaliny, nebo tak, že částice se uvedou do vznosu jiným způsobem, například mícháním.

Vzniklé produkty enzymové reakce se dále upravují filtrací, odstředováním, odbarvováním, zahušťováním, případně a s výhodou obohacují přísadami jako jsou vitamíny, chuťové přísady, barviva a jiné.

Reakční rychlost a účinnost enzymové hydrolýzy byla sledována refraktometrickým měřením sušiny roztoku a polarometrickým měřením obsahu sacharózy v roztoku podle Frimla a Tiché (Laboratorní kontrola cukrovarnické výroby, vydalo STI potravinářského průmyslu, Praha 1977). Ze získaných analytických výsledků byl proveden teoretický výpočet tzv. kvocientu invertu ( $Q_i$ ), což je hodnota, která udává poměr koncentrace invertního cukru ( $i$ ) k celkové surovině ( $S$ ); rozměr — hmotnostní procenta:

$$Q_i = \frac{i}{S} \cdot 100$$

Způsob stanovení  $\beta$ -D-fruktofuranozidázové aktivity, definice aktivity a specifické aktivity jsou uvedeny v čs. AO 249 325.

Ve srovnání s využitím imobilizované invertázy pro hydrolýzu sacharózy mají imobilizované buněčné materiály, získané postupy podle AO 231 458 a AO 249 325 podstatně vyšší termostabilitu a jsou schopny enzymové hydrolýzy vysokých koncentrací substrátů nejen ve formě čisté sacharózy, ale i jejich různých technických forem a meziproduktů její výroby, což bude doloženo v následujících příkladech vynálezu.

#### Příklad 1

1000 g vlhké hmoty celých zesíťovaných buněk plovovarských kvasinek, zesíťení nativních buněk 1 % glutaraldehydem a jejich vyprání bylo provedeno podle čs. AO

231 458, bylo suspendováno v 9 000 g kléru o refraktometrické sušině 65,8 % hmotnostních. Specifická aktivita zesíťovaných buněk činila  $600 \mu\text{mol glukózy} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  suché hmoty. Po homogenizaci zesíťovaných buněk v roztoku substrátu pomocí rychloběžného míchadla byla suspenze přemístěna do temperované nádoby opatřené míchadlem, upraveno pH koncentrovanou kyselinou octovou na hodnotu 4,5 a suspenze zahřáta na  $60^\circ\text{C}$ . Nepřetržitě míchání reakční směsi ( $300 \text{ otáček} \cdot \text{min}^{-1}$ ) probíhalo po dobu 3 hodin. Po této době činil stupeň konverze 94,6 %. Suspenze byla odstředěna na odstředivce Sharples, konverzní směs za horka zfiltrována přes azbestocelulózovou desku a odstředná hmota zesíťovaných buněk byla popsáním způsobem znovu použita k enzymové hydrolýze čerstvé násady kléru, za jinak stejných podmínek jako bylo uvedeno. Tento postup byl opakován celkem patnáctkrát s tím rozdílem, že po každém pátém opakování cyklu enzymové hydrolýzy bylo doplněno 100 g vlhké hmoty zesíťovaných buněk zásobním nepoužitým biokatalyzátorem tak, aby byly kompenzovány manipulační ztráty během odstředování. Průměrný stupeň enzymové konverze během patnácti opakování cyklů enzymové hydrolýzy činil 92,3 %.

#### Příklad 2

Bylo připraveno 5 kg navzájem imobilizovaných celých buněk pekařského droždí postupem podle čs. AO 231 458 a získané částice zpevněny podle čs. AO 249 325. Specifická aktivita imobilizovaných buněk činila  $500 \mu\text{mol glukózy} \cdot \text{min}^{-1}$  suché hmoty částic.

50 g vlhké, dobře odsáté a promyté hmoty částic biokatalyzátoru bylo suspendováno ve 450 g kléru o počáteční refraktometrické sušině 66,0 %. Klér byl předem upraven koncentrovanou kyselinou octovou na pH 4,6. Suspenze byla přenesena do nádoby z plastické hmoty, která bylo konstruktivně řešena tak, aby mohl biokatalyzátor být mnohonásobně opakovaně používán v této nádobě. Nad dnem nádoby byla umístěna filtrační přepážka s upevněným textilním materiálem (mlynářská silónová plachetka), jehož porozita nedovolovala únik částic biokatalyzátoru z reakční nádoby. Dno pod filtrační přepážkou bylo opatřeno trubicí z plastické hmoty, umožňující odsávání zkonvertované směsi při trvalém setrvání částic katalyzátoru v nádobě. Reakční nádoba byla temperována ve vodní lázni na  $75^\circ\text{C}$  stupňů C. Reakční směs byla nepřetržitě míchána kotvovým míchadlem o počtu otáček  $120 \text{ až } 150 \cdot \text{min}^{-1}$ . Reakční doba činila 3 hodiny. Po skončení první konverze ( $Q_i = 92,3 \%$ ) byly produkty hydrolýzy z popsaného zařízení vakuově odsáty a řídká čerstvá násada (450 g) roztoku substrátu (klér o  $S = 66,0 \%$  a  $\text{pH} = 4,6$ ). Tento po-

stup byl popsáním způsobem celkem dvěstěkrát opakován. Výsledky jsou uvedeny jak následuje.

| Počet cyklů | Průměrný $Q_i$ (%) |
|-------------|--------------------|
| 1—10        | 91,0               |
| 11—20       | 89,5               |
| 21—30       | 88,9               |
| 31—40       | 86,8               |
| 41—50       | 85,2               |
| 51—60       | 84,1               |
| 61—70       | 83,7               |
| 71—80       | 82,9               |
| 81—90       | 81,5               |
| 91—100      | 80,2               |
| 101—110     | 78,3               |
| 111—120     | 76,2               |
| 121—130     | 72,3               |
| 131—140     | 70,1               |
| 141—150     | 67,8               |
| 151—160     | 65,1               |
| 161—170     | 61,3               |
| 171—180     | 57,3               |
| 181—190     | 53,8               |
| 191—200     | 50,0               |

Z uvedených výsledků vyplývá, že za zvolených reakčních podmínek (refraktometrická sušina substrátu 66,0 %, reakční teplota  $75^\circ\text{C}$ , pH 4,6, koncentrace biokatalyzátoru 10 hmotnostních procent) je biokatalyzátor použitelný minimálně stokrát, při průměrně dosaženém stupni konverze 80 % teorie/100 opakování cyklů použití. Operační poločas biokatalyzátoru (sledována specifická aktivita částic biokatalyzátoru mezi jednotlivými cykly opakováního použití) je za uvedených reakčních podmínek 200 opakování cyklů, což koreluje se stupněm účinnosti konverze.

#### Příklad 3

50 g vlhké, dobře odsáté a promyté hmoty částic biokatalyzátoru, jehož způsob přípravy a specifická aktivita jsou uvedeny u příkladu 2, bylo suspendováno ve 450 g cukerného roztoku o refraktometrické sušině 50 procent, připraveného z čisté sacharózy (rafinovaný cukr). Hodnota pH tohoto roztoku byla před smícháním s biokatalyzátorem upravena koncentrovanou kyselinou octovou na 4,5. Dále bylo při enzymové hydrolýze postupováno způsobem uvedeným v příkladu 2 včetně popsaného zařízení, pouze s tím rozdílem, že reakční teplota byla  $68^\circ\text{C}$ . Reakční doba pro jeden cyklus byla 3 hodiny. V prvním cyklu hydrolýzy bylo dosaženo  $Q_i = 99,2 \%$ .

Za uvedených reakčních podmínek a uvedeným způsobem byla tatáž násada biokatalyzátoru použita celkem třicetkrát s průměrně dosaženým stupněm  $Q_i/30$  cyklů opakováního použití 94,5 %.

## Příklad 4

Melasa o refraktometrické sušině  $S = 74,0$  procenta a pH 8,1 byla zředěna pitnou vodou na  $S = 65,0$  % a pH upraveno koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na 5,5. 9 kg tohoto roztoku melasy bylo smícháno s 1 kg vlhké hmoty biokatalyzátoru, jehož specifická aktivita a způsob přípravy byly zmíněny v příkladu 2. Suspenze byla nepřetržitě míchána po dobu 3 hodin při teplotě 75 °C. Stupeň hydrolýzy v prvním cyklu činil 77,1 %. Částice biokatalyzátoru byly po prvním cyklu enzymové hydrolýzy odděleny vakuovou filtrací přes textilní materiál za horka a separovaný biokatalyzátor suspendován opět v čerstvé násadě roztoku melasy a popsáním způsobem provedeno 5 opakovaných cyklů enzymové hydrolýzy při uvedené koncentraci substrátu a za jinak stejných reakčních podmínek i způsobu manipulace.

Průměrný stupeň enzymové hydrolýzy [5 cyklů opakovaného použití téže nášady biokatalyzátoru činil 75 % teorie].

## Příklad 5

Těžká šťáva, meziprodukt z výroby sacharózy, o refraktometrické sušině 55,0 % a pH 8,5 byla okyselena koncentrovanou kyselinou octovou na pH 4,6. Množství 0,5 kg vlhké hmoty biokatalyzátoru, jehož specifická aktivita a způsob přípravy byly zmíněny v příkladu 2, bylo přeseseno do 4,5 kg takto upravené těžké šťávy, suspenze zahřáta na 75 °C a v průběhu nepřetržitého míchání byla v 60 min. časových intervalech sledována účinnost konverze. Výsledky jsou uvedeny jak následuje.

| Doba hydrolýzy (min) | Stupeň hydrolýzy $Q_i$ (%) |
|----------------------|----------------------------|
| 60                   | 66,4                       |
| 120                  | 92,12                      |
| 180                  | 94,7                       |
| 240                  | 96,2                       |
| 280                  | 96,2                       |

Po 4 h konverze byl biokatalyzátor za horka oddělen filtrací přes kalolisovanou plachetku a opět suspendován v čerstvé násadě (4,5 kg) těžké šťávy a popsáním způsobem provedeno celkem 10 opakovaných cyklů konverze s toutéž násadou biokatalyzátoru a za jinak stejných reakčních podmínek.

Průměrný stupeň konverze/10 opakovaných cyklů použití téže nášady biokatalyzátoru činil 93,7 % teorie. Hydrolýzovaná těžká šťáva byla shromažďována v zásobní nádobě. Bylo získáno celkem 43,8 kg hydrolýzované těžké šťávy, která byla následujícím způsobem ošetřena. Do zahřátého roztoku (80 °C) bylo vmícháno 0,5 kg aktivního uhlí a 2 kg křemelinu a suspenze

za horka vakuově zfiltrována přes kalolisovanou plachetku a po úpravě pH koncentrovaným roztokem hydroxidu sodného na hodnotu 8,1 vedena na vakuovou odparku a zahušťena na refraktometrickou sušinu 75 %.

## Příklad 6

Byl připraven vodný roztok afinovaného cukru o refraktometrické sušině 65,0 % a pH roztoku upraveno koncentrovanou kyselinou octovou na hodnotu 4,5. Do 450 g tohoto roztoku bylo suspendováno 50 g vlhké hmoty biokatalyzátoru, jehož specifická aktivita a způsob přípravy byly zmíněny v příkladu 2. Dále bylo postupováno při vsádkové opakované hydrolýze vždy čerstvé nášady tohoto technického substrátu tak, jak je uvedeno rovněž v příkladu 2.

V prvním cyklu enzymové hydrolýzy bylo dosaženo po 3 h  $Q_i = 90$  % teorie. Celkem bylo provedeno 10 opakovaných cyklů konverze s toutéž násadou biokatalyzátoru a průměrný stupeň enzymové hydrolýzy/10 opakovaných cyklů činil 88,4 %.

## Příklad 7

Byl připraven vodný roztok surového cukru o refraktometrické sušině 65 % a pH roztoku upraveno koncentrovanou kyselinou octovou na hodnotu 4,7. Do 450 g tohoto roztoku bylo suspendováno 50 g vlhké hmoty biokatalyzátoru, jehož specifická aktivita a způsob přípravy byly zmíněny v příkladu 2. Dále bylo postupováno při vsádkové opakované hydrolýze vždy čerstvé nášady tohoto technického substrátu tak, jak je uvedeno rovněž v příkladu 2.

V prvním cyklu enzymové hydrolýzy bylo dosaženo  $Q_i = 88,6$  % za 4 h konverze. Bylo provedeno celkem 15 opakovaných cyklů konverze s toutéž násadou biokatalyzátoru a průměrný stupeň enzymové hydrolýzy/15 opakovaných cyklů činil 85,0 %.

## Příklad 8

Z odpadního produktu po výrobě bezbuněčného kvasničného extraktu z pekařského droždí, kterým jsou v podstatě usušené stěny kvasinek, jehož specifická hodnota se pohybuje v rozmezí hodnot 400–700  $\mu\text{mol}$  glukózy  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  suché hmoty, byl připraven imobilizovaný biokatalyzátor postupem podle čs. AO 231 458 a vzniklé částice zpevněny a stabilizovány postupem podle čs. AO 249 325. Byly získány částice biokatalyzátoru o specifické hodnotě 480  $\mu\text{mol}$  glukózy  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  suché hmoty s distribucí jejich velikosti 0,08 až 3,5 mm.

100 g vlhké hmoty tohoto imobilizovaného materiálu bylo suspendováno v 900 g vodného roztoku rafinovaného cukru a refraktometrické sušině 34,2 %, jehož pH bylo předem upraveno koncentrovanou kyseli-

nou octovou na hodnotu 4,6. Suspenze částic byla uvedena do vznosu pomocí kotvového míchadla ( $150 \text{ otáček} \cdot \text{min}^{-1}$ ) a vytemperována na teplotu  $60^\circ\text{C}$ . Reakční doba pro jeden cyklus činila 3 h. V prvním cyklu enzymové hydrolýzy bylo dosaženo hodnoty  $Q_i = 99,0 \%$ .

Bylo provedeno celkem 20 opakovaných cyklů enzymové hydrolýzy s toutéž nasadou biokatalyzátoru za uvedených reakčních podmínek a způsobem manipulace uvedeným v příkladu 2. Průměrný stupeň enzymové hydrolýzy/20 opakovaných cyklů použití činil 97,3 %.

#### Příklad 9

Vychlazená vodná suspenze celých buněk kvasinek (pekařské droždí) byla v množství 10 l mechanicky dezintegrována čtyřnásobným průchodem pomocí šterbinového tlakového dezintegrátoru při přetlaku  $6 \cdot 10^7 \text{ Pa}$ . Suspenze dezintegrovanych buněk byla imobilizována postupem podle čs. AO 231 458 a částice zpevněny a stabilizovány postupem podle čs. AO 245 325. Bylo získáno celkem 7 kg velké hmoty pevných částic biokatalyzátoru o specifické aktivitě  $600 \mu\text{mol glukózy} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  suché hmoty s průměrnou distribucí jejich velikosti 0,1 až 5,0 mm.

500 g vlhké hmoty tohoto biokatalyzátoru bylo suspendováno ve 4500 g lehké šťávy (meziprodukt z výroby sacharózy) o refraktometrické sušině 17,5 %. Před vnesením biokatalyzátoru do tohoto roztoku substrátu byla hodnota pH upravena z 9,0 na 4,6 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Suspenze částic byla vytemperována na  $60^\circ\text{C}$  a částice uvedeny do vznosu pomocí míchadla o počtu otáček  $200 \cdot \text{min}^{-1}$ . Po jedné hodině reakce byl stupeň konverze kvantitativní (100 % teorie).

Za uvedených reakčních podmínek byla tatáž nasada tohoto biokatalyzátoru použita celkem třicetkrát při průměrně dosaženém stupni teoretické konverze/30 opakovaných cyklů použití 99,0 % teorie.

Kvantitativně hydrolyzovaný roztok lehké šťávy byl shromažďován v zásobní nádrži. Celkem bylo získáno 130 l glukózafruktóзовého sirupu. Nažloutlý roztok byl odbarven vmícháním 3 kg aktivního uhlí a filtrací za horka přes azbestocelulózovou desku. Bezbarvý roztok byl po úpravě pH koncentrovaným roztokem hydroxidu sodného na hodnotu 7,8 veden na vakuovou odparku a zahuštěn na 68 % sušiny. Zahuštěný sladivý

bezbarvý sirup byl ochucen přídatkem citronové přírodní tresti v množství 0,3 g/kg sirupu a přídatkem kyseliny askorbové v množství 0,1 g/kg sirupu.

#### Příklad 10

Navzájem imobilizované celé buňky kvasinek (pekařské droždí), způsob imobilizace, zpevňování a specifická aktivita tohoto materiálu je zmíněna v příkladu 2, byly rozděleny plavením na sítech s definovanou velikostí ok na jednotlivé velikostní třídy. Frakce biokatalyzátoru, kde distribuce velikosti částic po rozdělení činila 1,0 až 5,0 mm, byla naplněna do skleněné kolony o průměru 5 cm a výšce 150 cm v množství 2 kg vlhké hmoty. Skleněná kolona byla opatřena temperovaným vodním pláštěm a na obou koncích opatřena pevnými, perforovanými filtračními přepážkami, které byly překryty textilním materiálem (mlynářská silonová plachetka), aby nedocházelo k úniku částic z kolony. Spodem částic reaktoru byl čerpán 35% vodný roztok rafinované sacharózy o pH 4,6 ze zásobníku rychlostí  $2 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ , čímž byly částice uvedeny do vznosu prouděním kapaliny. Kolona byla temperována na  $65^\circ\text{C}$ .

Stupeň konverze na výtoku z kolony byl kvantitativní. Kolona byla v nepřetržitém provozu 5 dní, přičemž bylo získáno celkem 240 l glukózafruktóзовého sirupu o průměrném stupni hydrolýzy 97,6 %.

#### Příklad 11

Navzájem imobilizované celé buňky kvasinek, jejichž specifická aktivita, způsob imobilizace a zpevňování je zmíněn v příkladu 2, byly použity k mnohonásobně opakované hydrolýze roztoku kléru za podmínek a způsobem uvedeným rovněž v příkladu 2. Vzhledem k tomu, že dochází k postupné termální a další inaktivaci enzymu v částicích imobilizovaných buněk (operační poločas 200 opakovaných tříhodinových cyklů při pH 4,6, teplotě  $75^\circ\text{C}$  a koncentraci substrátu 68 % sušiny), byla mezi 51. a 100. cyklem prodlužována reakční doba na 4 hodiny a mezi 101. a 150. cyklem na 5 až 6 hodin. Tímto programovaným prodlužováním reakční doby, při zachování vysokého stupně konverze (více než 80 %), byla tatáž nasada biokatalyzátoru v průběhu 150 opakovaných cyklů dokonale využita. Průměrný stupeň konverze/150 cyklů opakovaného použití při popsaném způsobem prodlužované reakční době činil 82,3 %.

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob enzymové výroby glukózafruktóзовého sirupu ze sacharózy vyznačující se tím, že k enzymové hydrolýze se použijí celé imobilizované buňky, imobilizované buněčné stěny nebo imobilizované dezintegrované buněčné suspenze s  $\beta$ -D-fruktofuranozidázovou aktivitou, připravené podle autorských osvědčení č. 231 458 a 249 325, přičemž jako substráty se použijí vodné roztoky čisté sacharózy, technické sacharózy ve formě přírodního cukru, surového cukru, afinovaného cukru, vodné roztoky sacharózy ve formě tekutých druhů cukru, roztoky sacharózy vznikající jako meziprodukty výroby sacharózy, jako jsou surová šťáva, lehká šťáva, těžká šťáva, kléry, siroby a dále vedlejší produkty výroby, zejména melasa z výroby, popřípadě zředěná melasa a enzymová hydrolýza se provádí při teplotách v rozmezí 10 až 90 °C, s výhodou 60 až 75 °C, při pH reakční směsi v rozmezí 4,0 až 7,0 s výhodou 4,5 až 5,5 při počátečních koncentracích sacharózy 0,5 až 75,0 hmotnostních procent s výhodou 40 až 65 hmotnostních procent.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že enzymová hydrolýza se provádí diskontinuálně při koncentraci imobilizovaných materiálů 1 až 200 gramů vlhké hmoty.

.  $\text{litr}^{-1}$  reakční směsi, s výhodou 100 gramů vlhké hmoty .  $\text{litr}^{-1}$  reakční směsi, buď tak, že se částice imobilizovaných materiálů ponechají trvale v zařízení a z reakční směsi se oddělí roztok obsahující produkty reakce, nebo se separace biokatalyzátorů po ukončení konverze provede mimo reakční zařízení, přičemž v obou případech se imobilizované materiály alespoň dvakrát znovu opakovaně použijí.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že enzymová hydrolýza se provádí kontinuálně, buď v zařízeních s pevným ložem imobilizovaných materiálů protékáním roztoků substrátů tímto pevným ložem částic, nebo s výhodou v zařízeních se vznosným ložem imobilizovaných materiálů buď čerpáním roztoků substrátů tak, aby částice biokatalyzátorů byly v trvalém vznosu prouděním kapaliny, nebo tak, že částice se uvedou do vznosu jiným způsobem, například mícháním.

4. Způsob podle bodů 1, 2 a 3, vyznačující se tím, že vzniklé produkty enzymové reakce se dále upravují filtrací, odstřeďováním, odbarvováním, zahušňováním, případně a s výhodou obohacují přísadami jako jsou vitamíny, chuťové přísady, barviva a jiné.