



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

204643

(11)

(B₁)

(22) Přihlášeno 23 04 79

(21) [PV. 2803-79]

(40) Zveřejněno 31 07 80

(45) Vydáno

(51) Int. Cl.³

C 12 P 19/24

(75)

Autor vynálezu

HRADIL JIŘÍ ing. CSc., PRAHA, ŠVEC FRANTIŠEK ing. CSc., Kladno
a BUREŠ JOSEF dr. ing., PRAHA

(54) Způsob kontinuální inverze sacharózy

Vynález se týká způsobu kontinuální inverze sacharózy za katalýzy β -D-fruktofuranozidem fruktohydrolázy (dále invertázy) immobilizované na perlové celulóze s diethylaminovými skupinami.

Současný stav použití immobilizované invertázy charakterizuje následující přehled. Immobilizace tohoto enzymu byla uskutečněna zapolymerováním v akrylamidu [M. Kreen; A. Kestner, K. Kask: Tr. Tallin. Politekh. Inst. 1973, 331, 117-30], vazbou enzymu na kolagen následným zesítním glutaraldehydem [A. C. Olson, Ch. L. Cooney: Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes, Str. 157, Plenum Press, 1974]. Invertáza je také enkapsulována do porézních vláken z triacetátu celulózy. Aktivita takto immobilizovaného enzymu byla 1840 μ kat. [K. Venkatasubramanian, W. R. Vieth, F. R. Bernath: „Enzyme Engineering“, Plenum, New York, 1974, str. 439]. Všechny tyto metody immobilizace: chemickou kovalentní vazbou, zachycením v polymerní síti [enkapsulace aj.] mají společnou nevýhodu spočívající v jednoúčelovém použití bez jednoduché regenerace nosiče.

Tyto nevýhody lze odstranit vazbou enzymu iontovou vazbou na nosič ionexového typu. Tento způsob vazby enzymu byl popsán v případě aminoacylázy na DEAE-Sephadex A-25 [T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata: Biotechnol. Bioeng. 9, 603 /1967/]. Obdobně byla glukózoisomeráza immobilizována

na DEAE-celulóze [C. Huitron, J. Limon-Lason: Biotechnol. Bioeng. 20, 1377 /1978/].

Invertáza byla immobilizována iontovou vazbou na porézním styren-divinylbenzenovém kopolymeru s diethylaminomethylovými skupinami [Amberlite IRA 93, Rohm and Haas, Philadelphia, USA; J. Bourbaut, J. C. Cheftel: Fr. Demande 2, 233, 334 /10. 1. 1975/]. Aktivita takto immobilizované invertázy byla v tomto případě 1600 μ kat.

Předmětem předloženého vynálezu je způsob kontinuální inverze sacharózy pomocí invertázy (β -D-fruktofuranozidfruktohydrolázy) vyznačený tím, že se roztoky sacharózy o koncentraci 10 až 65 % hmotnostních a pH 3 až 6 při teplotě 20 až 70 °C uvedou ve styk s invertázou immobilizovanou iontovou vazbou s perlovou celulózou obsahující diethylaminové skupiny v koncentraci 0,2 až 3,5 mmol/g a schopné regenerace.

Způsob podle vynálezu je dále vyznačen tím, že se inverze provádí invertázou, immobilizovanou perlovou celulózou s diethylaminovými skupinami v Cl⁻ nebo OH⁻ při pH 3 až 6 při teplotě 0 až 50 °C, v koncentraci 10 až 160 mg aktivní invertázy/g sorbentu.

Dalším význakem vynálezu je, že se inverze provádí invertázou immobilizovanou perlovou celulózou s diethylaminovými skupinami po předchozím promytí už inaktivní

perlové celulózy 0,1 až 1 M roztokem NaCl a/nebo 0,1 až 1 M roztokem HCl a/nebo 0,1 až 1 M roztokem NaOH. Kontinualizace reakce provedením v průtočném tubulárním nebo míchaném reaktoru je přínosem z hlediska automatizace a jednoduchosti provedení.

Immobilizaci enzymu na nosič — perlovou celulózu s diethylaminovými skupinami — lze provést z vodných roztoků při pH 3 až 6 nosičem v Cl^- nebo OH^- formě při teplotě 0 až 50 °C. Tento nosič sorbuje až 160 mg/g aktivní invertázy. Nosič enzymu je dostatečně stálý. Po 42 dnech provozu nebyl pozorován podstatný pokles v konverzi [86 %] v průtočném uspořádání. Dle statistického vyhodnocení dat bylo zjištěno, že poločas životnosti immobilizace enzymu (doba, kdy aktivita poklesne na polovinu výchozí hodnoty) je 215 dní.

Perlová celulóza s diethylaminovými skupinami má také afinitu k nečistotám obsaženým v roztocích sacharózy (betainům apod.). Pouhým průtokem se sníží absorbance roztoku při 250 nm na 50 % původní hodnoty. Sorpcí těchto nečistot se však nesnižuje enzymatická aktivita imobilizovaného enzymu.

Vyšší účinek vynálezu ve srovnání se současným technickým stavem spočívá především ve vysoké aktivitě imobilizované invertázy až 6100 μkat ($= \mu\text{mol}/\text{min g}$), dlouhodobá stálost (poločas životnosti 215 dní) a zejména snadná immobilizace enzymu a regenerace nosiče.

Jako nosiče enzymu lze použít celulózový ionex např. na bázi perlové celulózy s diethylaminovými skupinami připravený podle čs. A. O. 193 202 (PV 962-77) a/nebo čs. A. O. 195 205 (PV 1428-78) a/nebo čs. A. O. 199 420 (PV 1429-78).

Předmět vynálezu charakterizují následující příklady, kterými se předmět vynálezu nijak neomezuje.

Příklad 1

1 díl odsáté perlové celulózy s 1-(N, N-diethylamino) ethylovými skupinami (2,0 mmol/g; 8,209 g H_2O) byl suspendován v roztoku 0,5 dílu β -D-fruktofuranozid-fruktohydrolázy v 10 dílech dest. vody. Sorbováno za občasného promíchání po dobu 47 hodin při 4 °C. Pak promyto 250 cm^3 dest. vody a 150 cm^3 roztoku sacharózy o pH 4 a koncentrací 10 hmot. %.

100 dílů roztoku sacharózy o pH 4 a koncentrací 10 hmot. % bylo temperováno na teplotu 30 °C v míchané baňce o objemu 100 ml, pak přidáno 0,380 g vlhkého odcentrifugovaného výše popsaného nosiče s imobilizovanou invertázou. Průběh inverze sacharózy byl sledován polarimetricky. Rychlost reakce za těchto podmínek byla 0,45 % min. Aktivita takto imobilizované invertázy byla za uvedených podmínek

3417 μkat ($= \mu\text{mol}/\text{min g}$, vztaženo na g suchého nosiče). Vzhledem k tomu, že použitá nativní invertáza má aktivitu 37,5 μkat ($= \mu\text{mol}/\text{min mg}$, vztaženo na mg enzymu), obsahuje nosič 91 mg navázané aktivní invertázy na 1 g nosiče.

Příklad 2

Nosič s imobilizovanou invertázou (1 díl) byl promyt 100 díly 1 M HCl, 50 díly dest. vody, 100 díly 1 M NaOH a 100 díly dest. vody; na tímto způsobem regenerovaný nosič byla znovu sorbována invertáza za podmínek uvedených v příkladu 1.

0,153 díly takto regenerovaného a promytého imobilizovaného enzymu bylo suspendováno ve 100 cm^3 roztoku sacharózy o pH 5 (Britton-Robinsonův pufr) o koncentraci 10 hmot. %. Při 20 °C byla aktivita takto imobilizované invertázy 3951 μkat , což odpovídá 141 mg navázané invertázy na 1 g nosiče.

Příklad 3

Immobilizovaná invertáza podle příkladu 1 v množství 0,9 dílu byla umístěna do kolony s fritou. Přes tento imobilizovaný enzym byl čerpán roztok sacharózy o koncentraci 39 hmot. % s pH 5 rychlostí 0,18 ml/min. Při době zdržení (τ) 5 minut byla dosažena konverze 51,5 %, to odpovídá aktivitě 135 μkat a poločasu reakce 3,9 minut.

Příklad 4

Immobilizovaná invertáza podle příkladu 1 měla při pH 5 v roztoku sacharózy o koncentraci 10 hmot. % při 50 °C aktivitu 6001 μkat .

Příklad 5

Perlová celulóza s 1-(N, N-diethyl)-2-hydroxypropylovými skupinami (v koncentraci 0,85 mmol/g) a imobilizovanou invertázou postupem podle příkladu 1 invertovala v průtočném uspořádání v kolonce podle příkladu 3 při 25 °C nepufrovaný roztok sacharózy o koncentraci 10 hmot. % s konverzí 86 % po dobu 43 dní.

Z těchto údajů vypočtený poločas životnosti tímto způsobem imobilizovaného enzymu je 215 dní.

Příklad 6

Perlová celulóza s 1-(N, N-diethyl)-2-hydroxypropylovými skupinami (v koncentraci 2,02 mmol/g) a imobilizovanou invertázou postupem podle příkladu 1 invertovala v průtočném uspořádání v kolonce dle příkladu 3 při 40 °C nepufrovaný roztok sacharózy o koncentraci 64,6 hmot. %. Při průtoku 2,22 g roztoku sacharózy/minutu činil poločas reakce 92 minut.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob kontinuální inverze sacharózy pomocí invertázy (β -D-fruktofuranozid-fruktohydrolázy) vyznačený tím, že se roztoky sacharózy o koncentraci 10 až 65 % hmotnostních a pH 3 až 6 při teplotě 20 až 70 °C uvedou ve styk s invertázou immobilizovanou iontovou vazbou s perlovou celulózou obsahující diethylaminové skupiny v koncentraci 0,2 až 3,5 mmol/g a schopné regenerace.
2. Způsob kontinuální inverze sacharózy podle bodu 1, vyznačený tím, že se inverze provádí invertázou, immobilizovanou perlovou celulózou s diethylaminovými skupinami v Cl^- nebo OH^- formě při pH 3 až 6 při teplotě 0 až 50 °C, v koncentraci 10 až 160 mg aktivní invertázy/g sorbentu.
3. Způsob kontinuální inverze sacharózy podle bodu 1 a 2 vyznačený tím, že se inverze provádí invertázou immobilizovanou perlovou celulózou s diethylaminovými skupinami po předchozím promytí už inaktivní perlové celulózy 0,1 až 1 M roztokem NaCl a/nebo 0,1 až 1 M roztokem HCl a/nebo 0,1 až 1 M roztokem NaOH.