

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

267 395

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 07 H 7/033

(21) PV 5612-88.U
(22) Prihlášené 15 08 88

(40) Zverejnené 13 06 89
(45) Vydané 14 12 90

(75)
Autor vynálezu

HEINRICHOVÁ KVETA ing. CSc., DZÚROVÁ MÁRIA RNDr.,
BRATISLAVA

(54)

Spôsob prípravy kyseliny digalakturónovej

(57) Riešenie sa týka spôsobu prípravy kyseliny digalakturónovej, pri ktorom sa na pektan sodný pôsobí imobilizovanou D-galakturonan-digalakturonohydrolázou pri pH 6,8 až 7,2 a teplote 30 až 40 °C po dobu 15 až 20 hodín. Jediným produktom reakcie je kyselina digalakturónová.

Vynález sa týka spôsobu prípravy kyseliny digalakturónovej účinkom imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy na pektan sodný.

Kyselina digalakturónová sa doteraz priemyselne nevyrába a preto nie je dostupná na svetovom trhu. Bola pripravená v niekoľkých laboratóriách a to cestou parciálnej kyslej hydrolýzy: Rexová-Benková L. Chem. Zvesti 21, 58 (1970), alebo enzymovou hydrolýzou D-galakturonanu účinkom endo-D-galakturonanáz: Demain A. L., Phaff H. J.: Arch. Biochem. Biophys. 51, 114 (1967), Hatanaka Ch., Ozawa J.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 40, 421 (1968), Nagel C. W., Wilson T. M.: J. Chromatogr. 41, 110 (1968), Voragen A. G., Pilnik W.: Ztsch. Lebensm. Untersuch. Forsch. 142 370 (1970), Heinrichová K.: Biológia (Bratislava) 38, 335 (1983), Heinrichová K.: AO 209874 (1982). Ku príprave oligogalakturónových kyselín sa použili i imobilizované endo-D-galakturonanazy: Van Houdenhoven E. A., De Vitt I. G., Visser J.: Carbohydr. Res. 34, 233 (1972), Bock W., Krause M., Goebel H., Anger H., Schwaller J., Fleming H. A., Gabert A.: Nahrung 22, 183 (1978), Rexová-Benková L., Omelková J., Kubánek V.: AO 218198 (1983). Postup prípravy kyseliny digalakturónovej účinkom imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy doteraz nebol popísaný. Všetky doteraz popísané (hore uvedené postupy) sa týkajú prípravy viac alebo menej heterogénnej zmesi oligogalakturónových kyselín s rozdielnym zastúpením kyseliny digalakturónovej. Spoločným rysom uvedených postupov je, že vedú k malým výťažkom kyseliny digalakturónovej, popri výťažku ostatných oligogalakturónových kyselín. Izolácia kyseliny digalakturónovej zo zmesi oligogalakturónových kyselín má mnohé nevýhody, prácnosť, časovú náročnosť a viacstupňové delenie na molekulových sitách a biogéloch.

Tieto nedostatky odstraňuje spôsob prípravy kyseliny digalakturónovej účinkom imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy, ktorého podstata spočíva v tom, že sa na pektan sodný pôsobí imobilizovaným selektívne degradujúcim pektolytickým enzýmom - D-galakturonandigalakturonohydrolázou pri teplote 30 až 40 °C a pH 6,8 až 7,2, pričom jediným produktom enzýmom katalyzovanej reakcie je kyselina digalakturónová, ktorá sa oddelí na kolóne Sephadexu G-10 a efluent sa odparí, alebo vysuší mrazovou sublimáciou. Ďalšou výhodou tohoto postupu je kontinuálne a viacnásobné využitie preparátu imobilizovaného enzýmu v reakcii, čo oproti aplikácii rozpustného enzýmu vedie k značným úsporám na nákladoch.

Kyselina digalakturónová je látka dôležitá z hľadiska teoretického štúdia pektínových látok a pektolytických enzýmov a pre charakterizáciu v priemysle používaných pektínáz. Je doteraz jediným substrátom na základe ktorého je možné identifikovať a stanoviť aktivitu exo-D-galakturonáz v komplexe pektolytických enzýmov.

Spôsob prípravy imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy je predmetom čs. autorského osvedčenia číslo 263 186 (Heinrichová 1986).

Príklad 1

100 ml 0,7 % roztoku pektanu sodného v 0,1 mólu . l⁻¹ fosfátovom tlmivom roztoku pH 7,0 sa perkoluje temperovanou (30 °C) kolónou imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy. Prietok kolónou 10 ml/h je udržiavaný peristaltickou pumpou. Úplná limitovaná konverzia substrátu prebehne za 20 hodín. Efluent z kolóny sa zahustí vákuovým odparovaním pri 40 °C, alebo vysuší mrazovou sublimáciou. Hydrolýzát sa nanesie na stĺpec Sephadexu G-10, kde sa oddelí kyselina digalakturónová od polymérneho zvyšku za súčasného odsolenia produktu. Frakcie s kyselinou digalakturónovou sa spoja a vysušia mrazovou sublimáciou.

Výťažok kyseliny digalakturónovej je 54 %.

Príklad 2

Suspenzia kovalentnou väzbou imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy v tlmivom roztoku o pH 6,8 až 7,2 sa naplní do kolóny, ktorou preteká 0,75 % roztok pektanu sodného (prietok 20 ml/h) do vtedy kým sa nedosiahne 54 % konverzia substrátu. Enzýmom katalyzovaná reakcia pri 40 °C. Efluent z kolóny sa odparí mrazovou sublimáciou a spracuje ďalej podľa príkladu 1.

Výťažok kyseliny digalakturónovej je 54 %.

Príklad 3

50 ml 1 %-ného roztoku pektanu sodného v 0,05 mólu . l⁻¹ tlmivom roztoku pH 6,8 sa inkubuje so suspenziou D-galakturonandigalakturonohydrolázy kovalentne viazanej na nosič polyakrylamidového typu. Enzýmom katalyzovaná reakcia prebieha za miešania v temperovanej nádobe s dvojitým plášťom pri 35 °C. Reakcia sa ukončí odsatím imobilizovaného enzýmu sklenenou fritou. Ďalšie spracovanie hydrolýzáta podľa príkladu 1.

Schopnosť imobilizovaného enzýmu katalyzovať zmienenu degradáciu pektanu sodného je závislá od obsahu D-galakturonandigalakturonohydrolázy na nosiči a relatívnej aktivity preparátu ako i od reakčných podmienok uvedených v príkladoch 1 až 3. Preparáty použité v príkladoch 1 až 3 pri štiepení glykozidických väzieb pektanu sodného vykazovali 23 až 30 % z aktivity voľného enzýmu. Okrem uvedeného výťažok kyseliny digalakturónovej je závislý i od obsahu neutrálnych sacharidov v reťazci polygalakturonanu. V našich pokusoch použitý pektan sodný obsahoval 1,8 % ramnózy a preto 54 %-ný výťažok kyseliny digalakturónovej predstavuje úplnú limitovanú degradáciu polyméru.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy kyseliny digalakturónovej
vyznačený tým, že sa na pektan sodný pôsobí
imobilizovanou D-galakturonandigalakturono-

hydrolázou pri pH 6,8 až 7,2 a teplote 30 až
40 °C počas 10 až 20 hodín, za vzniku kyseliny
digalakturónovej.