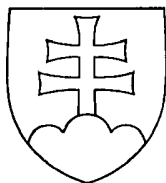


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 14.06.96
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 95201738.2
(32) Dátum priority: 27.06.95
(33) Krajina priority: EP
(40) Dátum zverejnenia: 08.07.98
(86) Číslo PCT: PCT/EP96/02587, 14.06.96

(21) Číslo dokumentu:

1763-97

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

**C 12N 11/02,
C 12N 11/10,
C 12P 7/64**

- (71) Prihlasovateľ: Unilever NV, AL Rotterdam, NL;
(72) Pôvodca vynálezu: Grote Martin Roger, Rotterdam, NL;
Geurtsen Johan Paul T., Maassluis, NL;
Van Putte Karel P.A.M., Maasland, NL;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob imobilizácie enzýmov**

- (57) Anotácia:
Spôsob imobilizácie enzýmov je charakterizovaný krokmi, ktoré zahŕňajú: a) výber amfifilného enzýmu na imobilizáciu, b) prípravu emulzie obsahujúcej kontinuálnu hydrofóbnu bázu a dispergovanú vodnú fázu, v ktorej sú rozpustné enzým a vhodná látka, ktorá slúži ako nosič enzýmu a c) odstránenie vody z vodnej fázy, až kým sa táto fáza zmení na častice v tuhej fáze obalené enzýmom. Vodná fáza sa pripravuje zo surovej fermentačnej tekutiny lipázy, z ktorej sa odstránila biomasa a ktorá ešte obsahuje fermentačné zvyšky, ktoré vhodne pôsobia ako nosič. Výrobné spôsoby, ktoré využívajú imobilizované enzýmy zahŕňajú napr.: interesterifikáciu, deacidifikáciu a odstránenie živice z triglyceridových olejov a majú veľmi malú spotrebu enzýmu. Okrem lipáz sú vhodnými amififilnými enzýmami fosfolipázy.

Spôsob imobilizácie enzýmov

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka spôsobu imobilizácie enzýmov a použitia imobilizovaných enzýmov pri katalyzovaní výroby triglyceridových tukov.

Doterajší stav techniky

Enzýmy sa v priemyselnom meradle používajú ako katalyzátory pri výrobe rôznych surovín. Tieto výroby sú často cenovo efektívne iba vtedy, ak je možné opakované viacnásobné použitie týchto enzýmov. Z dôvodov recirkulácie je potrebné separovať tieto enzýmy z výrobnjej tekutiny. Toto je možné v prípade, keď sú enzýmy pripojené na nosič, ktorý možno filtrovať alebo centrifugovať.

Dôležitá skupina priemyselných enzýmov je amfifilnej povahy. Do tejto skupiny enzýmov patria lipázy a fosfolipázy, ktoré sú charakterizované prítomnosťou hydrofilnej časti, ako aj hydrofóbnej časti v molekule. Takéto enzýmy budú po dispergovaní v emulzii migrovať a nahromadia sa na rozhraní vodnej a olejovej fázy. Hydrofóbna časť enzýmu sa usporiada do hydrofóbnej fázy a hydrofilná časť do vodnej fázy.

Vynález bude opísaný pomocou lipázy, ako príkladu amfifilného enzýmu. Ďalším priemyselne dôležitým amfifilným enzýmom je fosfolipáza, u ktorej sú známe rôzne typy a, ktorá sa používa pri hydrolýze fosfolipidov na lyzofosfolipidy. Priemyselným použitím je odglejovanie triglyceridových olejov, čo je opísané napríklad v EP 513 709.

Lipázy sa používajú z dôvodu ich schopnosti modifikovať štruktúru a zloženie triglyceridových olejov a tukov. Katalyzujú rôzne typy konverzie triglyceridov, akými sú hydrolýza, esterifikácia a transesterifikácia. Toto sú rovnovážne reakcie, ktoré v jednom smere majú za výsledok hydrolýzu

triglyceridov na voľné masťné kyseliny a glycerol, mono-glyceridy alebo diglyceridy a v druhom smere je ich výsledkom re-esterifikácia glycerolu, monoglyceridov a diglyceridov na triglyceridy. Pre re-esterifikáciu je potrebné odstrániť vodu v reakčnom médiu, aby sa rovnováha posunula v smere syntézy triglyceridov.

Použitie lipázy v médiách, ktoré sú v podstate bez vody súvisí s veľkým problémom, ktorým je solubilizácia lipázy na olej. Z tohoto dôvodu sa výhodne použije tá lipáza, ktorá je v bezvodom prostredí účinná a ktorá je imobilizovaná.

V súčasnosti predstavuje hlavný spôsob výroby lipázy mikrobiologická fermentácia vhodných mikroorganizmov, ktoré za správnych podmienok produkujú enzým. K roztoku purifikovanej lipázy sa pridá nosič a enzým sa nechá pripojiť na povrch nosiča. Takýto spôsob imobilizácie možno uviesť ako príklad pri procese interesterifikácie, napríklad v GB 2 159 527. Pripojenie enzýmu na nosič umožňuje jednoduchú separáciu ireverzibilne imobilizovaného enzýmu zo spracovacieho média pre ďalšie použitie.

Vo všeobecnosti sú používané nosiče porózneho charakteru, tuhé, ale vždy nerozpustné vo vode, pričom vždy poskytujú veľkú povrchovú plochu/jednotku objemu. Výroba imobilizovaných enzýmov je opísaná napríklad v EP 0 140 542, EP 0 382 767, WO 95/22606, EP 0 444 092 a WO 89/01032.

Keďže súčasné imobizačné technológie požadujú čistý enzým, je potrebné, aby surový fermentačný bujón bol podrobený rozsiahlemu finančne náročnému purifikačnému postupu, čo predstavuje nevýhodu sprevádzajúcu súčasnú výrobu imobilizovaných enzymatických systémov.

Okrem toho, z hľadiska množstva aktívnych častí imobilizovaného enzýmu, ktoré sa naviažu na nosičovú látku pred vystavením substrátu, je aktivita zodpovedajúco nízka. Účinky prenosu hmoty sú vo zvyčajných poróznych nosičoch tiež limitujúce pre aktivitu lipázy.

Cieľom predkladaného vynálezu je poskytnúť postup imobilizácie enzýmu, pri ktorom je možné použiť nepurifikovaný enzymatický prípravok. Okrem toho je tiež cieľom predklada-

ného vynálezu poskytnúť vysoko aktívny, imobilizovaný enzýmový prípravok, ktorý je schopný regenerácie a reaktivácie.

Podstata vynálezu

Vynález poskytuje postup imobilizácie enzýmu, charakterizovaný krokmi, ktoré zahrňujú:

- a) výber amfifilného enzýmu pre imobilizáciu,
- b) prípravu emulzie obsahujúcej kontinuálnu hydrofóbnu bázu a dispergovanú vodnú fázu, v ktorej sú rozpustné enzým a vhodná látka, ktorá slúži ako nosič pre enzým, keď sa uskutočňuje nasledovný krok,
- c) odstránenie vody z vodnej fázy, až kým sa táto fáza zmení na častice v tuhej fáze obalené enzýmom.

Vynález ďalej poskytuje amfifilný enzým, je imobilizovaný pripojením na tuhý nosič, ktorý je rozpustný vo vodnej fáze. Vynález tiež poskytuje postupy, pri ktorých sa enzým využíva.

Pripraví sa východzia emulzia s výhodne 5 až 10 % hmotn. vodnej fázy. Vodná fáza by mala obsahovať amfifilný enzým, ktorý má byť imobilizovaný a ďalej rozpustenú látku, ktorá môže pôsobiť ako nosič, po tom, čo sa zmenila na tuhú látku. Vodnou fázou je výhodne fermentačná tekutina, ktorá ešte obsahuje fermentačné zvyšky. Takouto fermentačnou tekutinou je výhodne tekutina, v ktorej sa vytvoril enzým. Alternatívne možno ako vodnú fázu použiť roztok viac alebo menej purifikovaného enzýmu. Hlavnou výhodou predkladaného vynálezu je, že sa nevyžaduje predchádzajúce získanie a purifikácia enzýmu z fermentačnej tekutiny.

Nosič je rozpustný vo vode a je vybraný výhodne zo skupiny pozostávajúcej z cukrov, škrobu, ako napríklad pšeničná múka, dextran, deriváty celulózy rozpustné vo vode a fermentačné zvyšky. Ak nosič nie je prítomný už vo vodnej fáze, pridáva sa k vodnej fáze pred alebo po tom, ako bol dispergovaný do vodnej kontinuálnej fázy. Toto pridanie je dôležité, ak vodná fáza neobsahuje dostatok nosiča. Toto pridanie môže byť dopĺňujúce k iným nosičovým látkam, napríklad

k fermentačným zvyškom, ktoré už sú prítomné.

Nosičová látka je výhodne prítomná v množstve 0,5 až 5 % hmotn., výhodnejšie 1 až 2 % hmotn.. Solubilnosť znamená, že nosičová látka, pri použití v uvedených množstvách, sa úplne rozpúšťa do vodnej fázy.

Pod fermentačnými zvyškami sa rozumejú všetky látky, ktoré sa ešte nachádzajú v supernatante: enzýmová fermentačná tekutina po tom, čo látka nerozpustná vo vode, vrátane biomasy, bola separovaná, napríklad centrifugáciou. Voliteľne je tento supernatant koncentrovaný, napríklad prepúšťaním cez modul protiprúdovej dutovláknitej mikrotitračnej membrány (známe ako umelá oblička). Fermentačné zvyšky zahŕňujú polysacharidy, látku bielkovinovej povahy, soli a cukry. Tieto látky sú rozpustné v roztoku fermentačnej tekutiny, ale separované ako tuhá, sypká látka, keď sa odstráni voda.

Fáza s obsahom roztoku enzýmu je dispergovaná zvyčajnými emulzifikačnými postupmi, ako jemné kvapôčky do hydrofóbnej fázy. Amfifilný enzým migruje a hromadí sa na povrchu oboch fáz.

Možno použiť akúkoľvek lipázu vhodnú na hydrolýzu alebo reesterifikáciu triglyceridov, ale výhodná je lipáza získaná z fermentácie *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa* alebo *Rhizopus niveus*. Množstvo pridanej enzýmovej aktivity sa prispôsobí konkrétnemu prípadu. Všeobecne je vhodná aktivita lipázy 165 LU/g oleja.

Hydrofóbnou fázou emulzie môže byť akákoľvek tekutina používaná pri technológii potravín, v ktorej môže byť vodná fáza dispergovaná. Môže to byť napríklad hexán alebo výhodne jedlý triglyceridový olej. V prípade použitia triglyceridového oleja, je výhodne vybraný taký olej, ktorý je v podstate bez fosfolipidov, inak by mohli fosfolipidy nežiadúco interferovať s tvorbou častíc obalených enzýmami. Výhodne triglycerid neobsahuje viac ako 100 ppm hydratabilných fosfolipidov.

Na odstránenie vody z emulzie sú dostupné štandardné techniky, vrátane pridania molekulových sít a prevedením dusíka cez emulziu, sa sušenie najlepšie uskutočňuje postupným

odparovaním vody, výhodne za použitia vákua $1 \cdot 10^2$ až $100 \cdot 10^2$ Pa (1 až 100 mbarov), výhodne $3 \cdot 10^2$ až $25 \cdot 10^2$ Pa (1 až 25 mbarov) alebo kombináciou týchto možností.

Odstránením vody z dispergovanej vodnej fázy sa kvapôčky zmršťujú a vysychajú. V prvom kroku bude rozpustená nosičová látka, napríklad fermentačné zvyšky, separovaná ako tuhá sypká látka a na koniec sa enzým nahromadený na rozhraní uloží a prilne k tuhej sypkej látke. Takto sa vysušením disperznej fázy dosiahne in-situ imobilizovaný enzýmový prípravok, ktorý sa ďalej od predtým použitých spôsobov imobilizácie odlišuje tým, že enzým nie je ireverzibilne naviazaný na nosič. Enzým možno použiť alebo bezprostredne po imobilizácii, za predpokladu, že je prítomný jeho substrát alebo bude pridany k hydrofóbnej fáze alebo možno enzým odseparovať a uchovať pre budúce použitie.

Keďže hydrofóbna časť enzýmu s aktívnym miestom ostáva počas odstraňovania vody orientovaná v smere opačnom voči povrchu nosiča, v konečnom imobilizovanom enzýme sa nachádza maximálny počet aktívnych miest enzýmu z hľadiska katalyzácie.

V závislosti od množstva enzýmu vo vodnej fáze budú tuhé častice úplne alebo čiastočne obalené enzýmom.

Výhodne hydrofóbna fáza obsahuje alebo pozostáva z látky, ktorá má byť vyrobená a - pre lipázy a fosfolipázy - je vybraná zo skupiny obsahujúcej triglyceridy, diglyceridy, monoglyceridy, glycerol, fosfolipidy a mastné kyseliny.

Akonáhle sa vytvorí emulzia v/o obsahujúca lipázu, ak sú prítomné glyceridové molekuly, začínajú byť hydrolyzované na mastné kyseliny a diglyceridy, monoglyceridy a glycerol. Hydrolýza, výhodne v miešacej nádobe, pokračuje až dovtedy, keď dosiahne zvolený stupeň. Hneď ako sa v ďalšom kroku reakcie z výrobnej zmesi odstráni voda, hydrolýza sa zmení na re-esterifikačný postup. Ľahko možno dosiahnuť nízky obsah FFA, dokonca 4 % hmotn..

Predkladaný vynález sa ďalej týka imobilizovaných amfifilných enzýmov, ktoré sú pripojené na tuhý nosič, ktorého nosičová látka je rozpustná vo vodnej fáze.

Enzýmy imobilizované podľa predkladaného vynálezu sú v porovnaní s predchádzajúcimi podobnými systémami veľmi aktívne. Možno povedať, že k tejto vysokej aktivite prispel spôsob imobilizácie. Ak je imobilizovaným enzýmom lipáza, mohla by sa použiť pri zvýšených teplotách bez toho, aby došlo k jej deaktivácii, za podmienky, že enzým účinkuje v bezvodom prostredí. V závislosti od typu lipázy sú povolené teploty 60 °C alebo dokonca 70 °C. Pomocou tohto enzýmového systému necitlivého na malé zmeny parametrov je možné vyrobiť tuhé surovinové tuky, ktorých body topenia sú vyššie ako 30 °C až 40 °C, rozmedzie, v ktorom sa pohybuje najvyššia teplota pri výrobe vodných lipázových prípravkov.

Imobilizované enzýmy podľa vynálezu možno použiť v dávkovanej ako aj kontinuálnej výrobe. Veľkosť tuhých častíc obalených enzýmom by mala byť dostatočná na to, aby bola možná separácia centrifugáciou a je najmenej 0,1 μm , výhodne najmenej 1 μm a výhodnejšie 5 až 15 μm .

Vynález ďalej zahrňuje procesy katalyzované imobilizovaným enzýmom podľa vynálezu. K takýmto procesom patrí hydrolýza triglyceridov lipázou alebo fosfolipidov fosfolipázou, lipázou katalyzovaná re-esterifikácia hydrolyzovaných triglyceridov (de-acidifikácia) alebo kombinácia týchto procesov, ako je interesterifikácia.

Interesterifikačné procesy by mohli zahrňovať mono-, di- alebo triglyceridy, v ktorých sú za katalytického pôsobenia lipázy skupiny mastných kyselín zamenené za hlavný reťazec glycerolu.

Enzymatická de-acidifikácia triglyceridového oleja zahrňuje katalytický účinok lipázy, kde sú esterifikované mastné kyseliny a mono- alebo diglyceridy prítomné v oleji.

Vzhľadom na ďalší predmet vynálezu, jeho uskutočnenie zahrňuje postup odstránenia fosfolipidov z triglyceridového oleja (odglejovanie), ktorý pozostáva z krokov:

- a) zmiešania triglyceridového oleja obsahujúceho fosfolipidy s prípravkom obsahujúcim vlastnú fosfolipázu,
- b) hydrolýzy fosfolipidov na lyzofosfolipidy,
- c) separácie hydrolyzovaných fosfolipidov z oleja,

charakteristickej tým, že prípravok fosfolipázy predstavuje imobilizovaný enzým podľa predkladaného vynálezu. Z niekoľkých známych a dostupných fosfolipáz sa vyberie jedna, ktorá je pre požadovaný typ hydrolýzy najvhodnejšia.

Na prípravu imobilizovanej fosfolipázy by mala byť použitá hydrofóbná báza bez fosfolipidu. Po separácii pripravenej imobilizovanej fosfolipázy ju možno pridať k oleju s obsahom fosfolipidu bez ohrozenia enzýmového prípravku.

In-situ imobilizovaný enzým možno z reakčnej dávky ľahko odseparovať filtráciou, ale výhodne centrifugáciou, po ktorej môže byť znovu mnohokrát použitý.

Na opätovné použitie imobilizovanej lipázy nie je potrebné žiadne pridanie vody do nasledujúcej dávky. Voda, ktorá je rozpustená v triglyceridovom oleji, ktorý má byť interesterifikovaný je postačujúca pre iniciálny krok hydrolýzy.

Akémukoľvek opakovanému použitiu enzýmu môže voliteľne predchádzať re-aktivačné opracovanie: namiesto separácie použitého imobilizovaného enzýmu z hydrofóbnej fázy sa pridá voda, výhodne v množstve 5 až 10 % hmotn. a je dispergovaná do hydrofóbnej fázy za účinku, že enzým spolu s jeho nosičovou látkou sa rozpúšťa v kvapkách vody. Enzým znovu migruje do rozhrania v/o a v ňom sa zhromažďuje. Po odstránení vody, ako je spomenuté vyššie, kvapôčky sa vysušovaním zmršťujú a nosičová látka sa znovu separuje ako tuhá látka. Keď voda úplne zmizne z vysychajúcich kvapôčiek, separovaná nosičová látka sa v konečnom kroku obalí enzýmom. Re-imobilizácia má za výsledok, prinajmenšom čiastočne, obnovenie enzýmovej aktivity. Táto reaktivácia re-imobilizáciou môže byť znova a znova opakovaná a poskytuje predĺžené použitie enzýmu a nosičovej látky. Obr. 3 znázorňuje opakované použitie imobilizovaného enzýmu lipázy v nasledovných dávkach. Postupné znižovanie enzýmovej aktivity možno čiastočne zlepšiť re-imobilizáciou za použitia toho istého enzýmu a tej istej nosičovej látky (tieňovaná oblasť). Voliteľne, enzým poškodený alebo upotrebený počas výroby sa dopĺňa pridaním nejakého čerstvého enzýmového preparátu. Možnosť opakovaného

použitia látok, spolu s lacným zdrojom enzýmu v nepurifikovanej forme, chýbanie nákladnej nosičovej látky a vysoká aktivita imobilizovaného enzýmu sú oveľa hospodárnejšie v porovnaní s finančne náročným katalyzátorom. Rovnako odpadávajú problémy s odpadom použitého enzýmu. Tieto výhodné rysy sú jedinečné a nie sú opísané u enzýmov imobilizovaných predtým použitými postupmi.

Vynález je objasnený nasledovnými príkladmi.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 vyjadruje priebeh reakcie interesterifikácie zmesi triglyceridov so stredne dlhým reťazcom a vysoko olejnatého slnečnicového oleja v prítomnosti imobilizovanej lipázy. Vyznačený je podiel voľných mastných kyselín a stupeň konverzie postupu za použitia lipázy (LypozymeTM) tradične imobilizovanej na DuoliteTM (čiary s plnými bodkami), ako aj podiel voľných mastných kyselín a stupeň konverzie postupu za použitia lipázy (LypozymeTM 10000L), ktorá je in situ imobilizovaná podľa predkladaného vynálezu (čiary so svetlými bodkami).

Obr. 2 predstavuje graf, znázorňujúci podiel voľných mastných kyselín pri de-acidifikácii troch zmesí kyseliny olejovej a glycerolu v prítomnosti imobilizovanej lipázy, porovnávajúc:

1. LypozymeTM 10000L lipázu (165 LU/g oleja) in-situ imobilizovanú podľa vynálezu (označené prázdno vybodkovanou čiarou),
2. LypozymeTM lipázu (1750 LU/g oleja) tradične imobilizovanú na DuoliteTM (označené čiarou z plných štvorčekov) a
3. LypozymeTM lipázu (3500 LU/g oleja) tradične imobilizovanú na DuoliteTM (označené čiarou z plných kosoštvorcov).

Obr. 3 predstavuje aktivitu lipázy (gram konvertovaného oleja/gram enzýmu/hod.) získanej z *Humicola lanuginosa* použitej v následnej sérii interesterifikačných dávok ako funkciu času (dni).

Pre 24-hodinové dávky v tmavo vytieňovaných oblastiach

je použitá lipáza najprv imobilizovaná podľa vynálezu. Reakciu predstavuje interesterifikácia vysoko olejnatého slnečnicového oleja/triglyceridu so stredne dlhým reťazcom uskutočňovanú pri 35 °C. Pre 8 hodinové, 15 hodinové a týždňové dávky v iných oblastiach (svetlošedých) je imobilizovaná lipáza použitá pre PO/PK interesterifikáciu pri 60 °C v "suchej" forme, keďže bola separovaná cetrifugáciou z predchádzajúcej interesterifikačnej dávky.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Všeobecný príklad

Roztok LipozymuTM 10000L je surovou fermentačnou tekutinou amikrobiálneho charakteru, ktorá obsahuje lipázu *Rhizomucor miehei* (od NOVO) a jeho lipázová aktivita je 10 kLU/ml.

Purifikovaná forma lipázy je uvádzaná na trh firmou NOVO pod názvom Lipozyme IMTM alebo Lipozyme imobilizovaný na DuoliteTM. Jeho aktivita je 70 kLU/g prášku.

DuoliteTM je živicom so slabou výmenou aniónov, ktorá je vhodná na imobilizáciu enzýmu.

Jedna lipázová jednotka (LU) je definovaná ako množstvo enzýmu, ktoré uvoľňuje 1 μ M kyseliny maslovej za min. z emulzifikovaného substrátu tributyrínu (pri pH 7,0 a 30 °C).

Z dôvodov monitorovania postupovania procesu sa v nasledovných príkladoch v časových intervaloch odoberali vzorky oleja. Vzorky odobrané z reakčného média ihlou boli zahriate na teplotu vyššiu ako 85 °C v 2 ml sklenených skúmavkách, aby došlo k deaktivácii enzýmov.

Obsah voľných mastných kyselín sa stanovil rozpustením asi 0,5 g homogenizovaného oleja do 50 ml neutrálneho rozpúšťadla, obsahujúceho rovnaký objem etanolu (96%) a dietyléteru (p.a.) a titráciou 0,1 molu/l roztoku hydroxidu sodného za použitia fenolftaleínu ako indikátora. Obsah voľných mastných kyselín (FFA) vyplýva zo vzorca:

$$\% \text{ FFA} = \frac{V.M.282}{W.1000} \cdot 100\%$$

kde V = titrovaný objem (ml)

W = hmotnosť vzorky oleja (g)

M = molarita roztoku NaOH

282 = priemerná molekulová hmotnosť mastných kyselín.

Stupeň konverzie vyplýva z nasledovných rovníc:

$$k = -\ln(1-x) \cdot M/W \cdot t$$

kde k : aktivita katalyzátora (g oleja/g katalyzátora za minútu)

M: hmotnosť oleja (g)

W: hmotnosť katalyzátora (g enzýmového prípravku)

x: stupeň konverzie definovaný ako

t: doba cyklu (hodiny)

$$X = \frac{\Sigma CN_0 - \Sigma CN_i}{\Sigma CN_e - \Sigma CN_1}$$

ΣCN predstavuje súčet hodnôt rozsahu uhlíkových čísiel vybraných pre špecifický postup, kde dolné indexy (o, i, e) patria výstupom rektora v ktorýchkoľvek časových bodoch (o), vstupom (i) a rovnovážnym rozdeleniam (e). Hodnoty uhlíkového čísla sa získajú pomocou analýzy vzorky rozdeľovacou plynovou chromatografiou. Pre HOSF/MCT sú zvolené hodnoty interesterifikácie CN 34 až 46 a pre Po/PK systémy sú zvolené hodnoty interesterifikácie CN 44 až 46, pre výpočet stupňa konverzie.

Príklad 1

Porovnanie in-situ imobilizovanej lipázy a tradične imobilizovanej lipázy na interesterifikačné použitie.

Dávkovací reaktor vybavený miešačom a vodným plášťom

bol naplnený zmesou 131,5 g triglyceridov so stredne dlhým reťazcom (MCT) a 229,0 g vysoko olejnatého slnečnicového oleja (HOSF) pre interesterifikáciu. 95% mastných kyselín MCT predstavovali C8-C10 mastné kyseliny a 5% iné kyseliny.

MCT/HOSF zmes bola zohriata na 35 °C. Za kontinuálneho miešania bol olej zmiešaný s 5 % hmotn. vody, čím vznikla emulzia typu v/o. K emulzii sa pridalo také množstvo roztoku LipozymeTM 10000L, aby emulzia mala aktivitu 165 LU/g oleja. Silné miešanie vytvorilo jemnú disperziu s veľkým rozhraním olej/voda.

Hydrolyza triglyceridových molekúl začala po pridaní vodnej fázy a pokračovala pri 35 °C, až kým sa dosiahla 30% hladina FFA.

Znížením tlaku na $6 \cdot 10^2$ Pa (6 mbarov) bola odparená voda, čo spôsobilo zhromažďovanie lipázy a jej imobilizáciu na vysušené fermentačné zvyšky.

Reesterifikácia začala, keď bola zo systému odstránená voda a teplota sa zvýšila na 50 °C. Obr. 1 (čiary s prázdny-
mi bodkami) znázorňuje, že po 50 hodinách reesterifikácie sa obsah FFA znížil z asi 30 % hmotn. na asi 4 % hmotn.. Stupeň konverzie triglyceridov dosiahol takmer 80 %.

Rovnakým spôsobom bola vytvorená a spracovávaná porovnávací dávk, ale za použitia Lipozyme IMTM lipázy tradične imobilizovanej na DuoliteTM. Pri pridaní lipázy v takom množstve, že vznikol olej, hydrolyza začala pri aktivite lipázy 165 LU/g oleja. Iba o 50 hodín neskôr obsah FFA dosiahol hladinu 24%. Použilo sa vákuum, zo systému sa odstránila voda a začala sa reesterifikácia.

Obr. 1 (čiary s plnými bodkami) znázorňuje účinnosť porovnávej dávky.

In-situ imobilizovaná lipáza podľa vynálezu znázorňuje veľkú rýchlosť hydrolyzy a po odstránení vody rýchlu redukciu FFA s vysokým stupňom konverzie. Na rozdiel od tohoto, postup za použitia tradične imobilizovanej lipázy vykazuje veľmi malú rýchlosť hydrolyzy a malú rýchlosť FFA re-esterifikácie, obe tieto skutočnosti sa prejavili zodpovedajúco nízkym stupňom konverzie.

Príklad 2

Porovnanie in-situ imobilizovanej lipázy a tradične imobilizovanej lipázy pre de-acidifikačné použitie

Obr. 2 je graf znázorňujúci obsah voľných mastných kyselín pri de-acidifikácii zmesi kyseliny olejovej a glycerolu v prítomnosti imobilizovanej lipázy, porovnávajúc lipázu imobilizovanú in-situ a lipázu imobilizovanú na DuoliteTM.

V dávkovom reaktore sa zmiešalo 165,3 g kyseliny olejovej a 18,0 g glycerolu a zmes sa zohriala na 35 °C za konštantného miešania. Olej bol vyrobený s aktivitou 165 LU/g oleja za použitia in-situ imobilizovanej lipázy vyrobenej s roztokom LipozymeTM 10000L. Dávka na začiatku obsahovala 7 g molekulových sít a cez olej bol kontinuálne preháňaný dusík, aby sa desorbovala voda. Po 83 hodinách reakcie sa do dávky pridalo ďalších 5 g molekulových sít. Vid' čiaru s prázdnyimi bodkami na obr. 2.

Rovnakým spôsobom sa vyrobili a spracovali dve porovnávacie dávky, ale bola použitá Lipozyme IMTM lipáza, ktorá bola tradične imobilizovaná na DuoliteTM. Jedna dávka obsahovala 1750 LU/g oleja, čo vyjadruje obr. 2 čiarou z plných štvorčekov a ďalšia dávka obsahovala 3500 LU/g oleja - znázornené čiarou z plných kosoštvorcov.

S in-situ imobilizovanou lipázou sa dosiahla iniciálna esterifikačná rýchlosť 7,5% FFA redukcie/hod, ako aj celkové zníženie FFA obsahu z 88,4% na 3,3% za 150 hodín. Iniciálne esterifikačné rýchlosti za použitia tradične imobilizovaných lipáz boli 7,4% a 12,5 % FFA redukcie/hodinu pre nízku aj vysokú koncentráciu. S vysokou koncentráciou lipázy sa dosiahlo celkové zníženie FFA obsahu na 2,3% za 70 hodín. Hoci boli tri uvedené de-acidifikačné postupy uskutočnené pri porovnateľných rýchlostiach, dávka obsahujúca in-situ imobilizovaný lipázový systém potrebovala iba zlomok lipázovej aktivity oboch dávok použitých v tom istom pokuse.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob imobilizácie enzýmu, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa kroky,

- a) výber amfifilného enzýmu na imobilizáciu,
- b) prípravu emulzie obsahujúcej kontinuálnu hydrofóbnu bázu a dispergovanú vodnú fázu, v ktorej sú rozpustné enzým a vhodná látka, ktorá slúži ako nosič pre enzým, keď sa uskutočňuje nasledovný krok,
- c) odstránenie vody z vodnej fázy, až kým sa táto fáza zmení na častice v tuhej fáze obalené enzýmom.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že enzým je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z lipáz a fosfolipáz.

3. Spôsob podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že lipáza sa získava z *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa* alebo *Rhizopus niveus*.

4. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že vodná fáza obsahuje fermentačný supernatant.

5. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že hydrofóbnou fázou je jedlý triglyceridový olej.

6. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že nosičová látka je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z cukrov, škrobu, dextranu, derivátov celulózy rozpustných vo vode a z fermentačných zvyškov.

7. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že hydrofóbná fáza obsahuje látku, ktorá sa má spracovať, ktorá je vybraná zo skupiny

obsahujúcej triglyceridy, diglyceridy, monoglyceridy, glycerol, fosfolipidy a mastné kyseliny.

8. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že enzým ako aj nosičová látka, ktoré majú byť rozpustené vo vodnej fáze sú odvodené od častíc imobilizovaného enzýmu vyrobených podľa jedného z predchádzajúcich nárokov a separovaných z reakčnej dávky.

9. Tuhá častica, obsahujúca imobilizovaný enzým, ktorý je pripojený na nosič, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že nosičová látka je rozpustná vo vodnej fáze.

10. Spôsob katalyzovaný amfifilným enzýmom, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že enzýmom je imobilizovaný enzým podľa nároku 9 alebo je získaný podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8.

11. Spôsob interesterifikácie mono-, di-, alebo triglyceridov, v ktorých za katalytického účinku lipázy sa skupiny mastných kyselín zmenia na glycerolový hlavný reťazec, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že lipázou je imobilizovaný enzým podľa nároku 9 alebo je získaný podľa jedného z nárokov 1 až 8.

12. Spôsob enzymatickej de-acidifikácie triglyceridového oleja, kde za katalytického účinku lipázy sú mastné kyseliny esterifikované mono- alebo diglyceridmi, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že lipázou je imobilizovaný enzým podľa nároku 9 alebo je získaný podľa jedného z nárokov 1 až 8.

13. Spôsob katalyzovaný fosfolipázou, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že fosfolipázou je imobilizovaný enzým podľa nároku 9 alebo je získaný podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8.

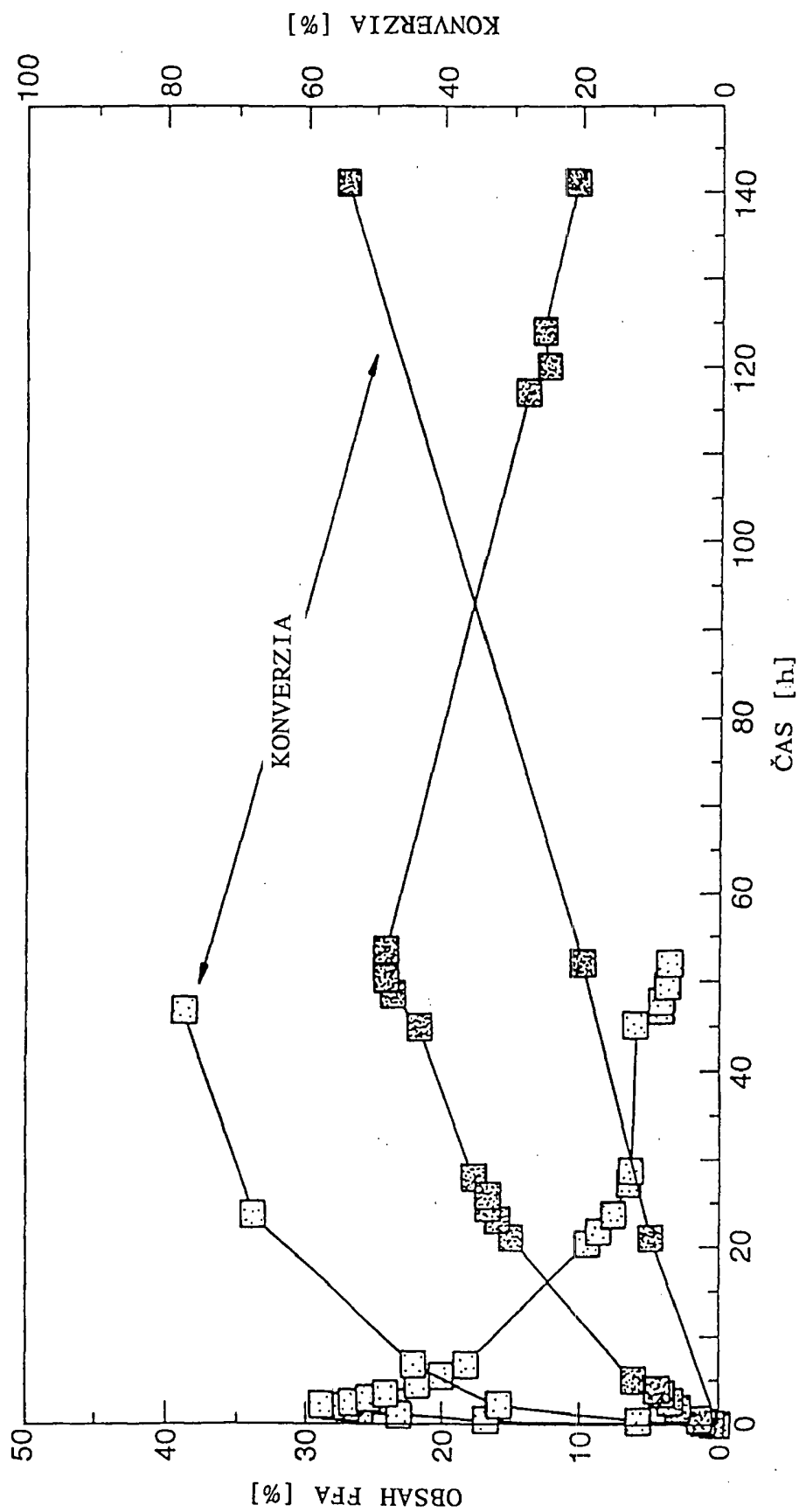
14. Spôsob odstránenia fosfolipidov z triglyceridového oleja, ktorý pozostáva z krokov:

- a) zmiešania triglyceridového oleja obsahujúceho fosfolipidy s prípravkom obsahujúcim fosfolipázu,
- b) hydrolýzy fosfolipidov na lyzofosfolipidy,
- c) separácie hydrolyzovaných fosfolipidov z oleja,

v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že fosfolipázou je imobilizovaný enzým podľa nároku 9 alebo je získaný podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8.

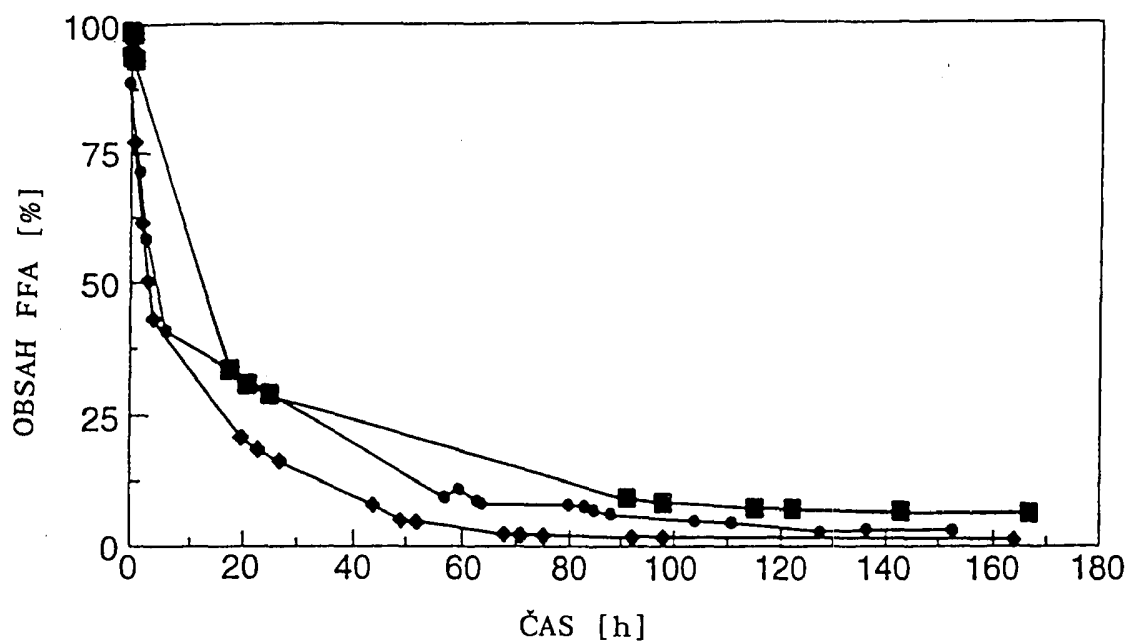
1/2

OBR. 1



2/2

OBR. 2



OBR. 3

