



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

249325

(11) (B5)

(61) Autorské osvědčení je závislé na autorském
osvědčení č. 231458
(22) Přihlášeno 03 04 84
(21) PV 2578-84

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 11/02

(40) Zveřejněno 14 08 86

(45) Vydáno 15 01 88

(75)
Autor vynálezu

VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc., PRAHA, KLECZEK PAVEL RNDr., ONDŘEJOV,
KRUMPHANZL VLADIMÍR prof. ing. DrSc., JARÝ JIŘÍ prof. ing. DrSc.,
POTÁČOVÁ MILOSLAVA, FASSATIOVÁ LIBUŠE RNDr.,
KOVÁŘÍK ANTONÍN ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob zpevňování a stabilizace částic biokatalyzátoru pro enzymovou inverzi sacharózy

Řešení se týká způsobu zpevňování a stabilizace částic biokatalyzátoru pro enzymovou inverzi sacharózy, připravených podle autorského osvědčení č. 231458, při kterém se vodný roztok sacharózy a jejích technických forem a meziproduktů její výroby uvádí ve styk s částicemi biokatalyzátoru. Podstata řešení spočívá v tom, že do míchané směsi částic biokatalyzátoru na bázi kvasinkových buněk obsahujících enzym invertázu, se po úpravě pH v rozmezí hodnot 6,0 až 8,0 přidá buď vodný roztok glutaraldehydu, a/nebo vodný roztok technické nebo čisté bílkoviny živočišného, rostlinného nebo mikrobiálního původu, s výhodou technická vaječná bílkovina, a/nebo dezintegrovaná nebo autolyzovaná suspenze produkčních buněk obsahujících vedle jiných rozpustných bílkovin i enzym invertázu, potom se nepřetržitě míchaná reakční směs ještě popřípadě dosítí dalším přídatkem glutaraldehydu, stabilizované částice se od reakční kapaliny oddělí filtrací, suspendují za intenzivního míchání v ledovém acetonu, filtrací znovu oddělí a suší po homogenizaci volně na vzduchu při teplotě místnosti 1 až 24 hodin, potom se částice suspendují ve studené vodě, několikrát vodou dekantují a ponechají bobtnat ve vodě nebo v pufru při teplotách v rozmezí 5 až 20 °C.

Vynález se týká způsobu zpevňování a stabilizace částic biokatalyzátoru připraveného podle základního autorského osvědčení č. 231 458 a stabilizace enzymu -D-fruktofuranosidázy (invertázy, EC 3.2.1.26) v těchto částicích, které slouží k enzymové inverzi čisté sacharózy, jejích technických forem a meziproductů její výroby na směs příslušných monosacharidů, gluózy a fruktózy, resp. glukózafruktózový sirup.

Vzniklé produkty enzymové inverze vytvořené jednorázovým, mnohonásobným opakovaným nebo kontinuálním stykem těchto zpevněných a stabilizovaných částic s vodnými roztoky čisté sacharózy (tzv. rafinády), jejích technických forem např. tzv. afinády (což je surový, od matečných louhů nepromytý cukr), kléru (silně viskózní zahuštěný roztok surového cukru o jeho koncentraci 60 až 70 hmotnostních procent) a meziproductů její výroby, zejména melasy a těžko cukrové šťávy, lze buď použít přímo, např. v potravinářském průmyslu jako glukózafruktózový sirup, který má vyšší stupeň sladivosti než sacharóza, nebo lze izolací a dalším čištěním rozdělit oba monosacharidy a připravit tak čistou, nebo technickou glukózu a fruktózu.

Získané čisté nebo technické monosacharidy lze pak použít v různých odvětvích národního hospodářství např. ve farmaceutickém průmyslu nebo je využít jako substráty pro další enzymové přeměny, např. lze glukózu jako substrát použít pro enzymovou přeměnu na D-glukonovou kyselinu.

Pro tyto účely se v průmyslové praxi, především v potravinářském a cukrovarnickém průmyslu, v průmyslu výroby cukrovin, limonád a různých dalších nápojů, používá jednorázová aplikace rozpustného enzymu - invertázy, izolované z různých buněk mikroorganismů. Zdrojem enzymu jsou především kvasinky. V Československu se tento enzym dosud nevyrábí a pro tyto účely, tj. pro účely přípravy tzv. invertního cukru se enzymový preparát dováží ze zahraničí. Sacharózu lze také štěpit neenzymaticky buď fyzikálně chemicky tzv. finskou technologií na iontoměnnicích za vysokých teplot za současné izolace obou monosacharidů, nebo chemicky, kyselou hydrolýzou.

Uvedené způsoby mají však své ekonomické a jiné limity. V případě jednorázové aplikace rozpustné invertázy je limitem cena a dovoz enzymového preparátu, v případě fyzikálně chemické technologie je limitem výchozí koncentrace a kvalita sacharózy (35 % hmota/objem roztok), nároky na energii (štěpení na sloupcích iontoměnnic při 80 °C), kvalita a cena iontoměnnic a 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 poslední době se projevují tendence o jednorázovou aplikaci živých nativních buněk pivovarských nebo pekařských kvasinek, obsahujících invertázu, k enzymové inverzi koncentrovaných roztoků sacharózy a jejích technických forem, především surového cukru a kléru. Enzymová hydrolýza se provádí jednorázově vmícháním celých živých nebo parciálně autolyzovaných, resp. desintegrovaných buněk kvasinek, do koncentrovaných roztoků cukru za současného míchání a zahřátí na teploty kolem 80 °C.

Limitem této technologie je dovoz kvasničné biomasy z pivovarů, resp. droždí na místo aplikace, dostupnost biomasy v potřebném množství po celou dobu výroby, její proměnlivá kvalita, zákaly v získaných produktech a konečně sekundární kontaminace kvasničné biomasy pramenící hlavně z převozu, skladování a manipulace.

Vzhledem k proměnlivé kvalitě biomasy, hlavně obsahu enzymu v buňkách, kolísá i stupeň inverze v získaných produktech mezi 60 až 85 %. V nespolední řadě zůstávají ve finálních produktech obsaženy i určité buněčné podíly (bílkoviny, nukleové kyseliny, lipidy), čímž je zvýšeno hygienické riziko.

Jistým pokrokem v oblasti moderních směrů biotechnologie je aplikace imobilizované invertázy, nebo imobilizovaných buněk s invertázovou aktivitou, která na rozdíl od jednorázových aplikací umožňuje využití částic imobilizovaných biokatalyzátorů mnohonásobně opakovaně ve vsádkových míchaných reaktorech nebo kontinuálně v reaktorech se vzdušným nebo pevným ložem nebo v míchaných kontinuálních reaktorech, čímž se značně snižují nároky na pracnost, spotřebu energie a kvalita konverzní směsi je vysoká, neboť částice katalyzátorů jsou nerozpustné, snadno separovatelné a nepřecházejí do finálních potravinářských produktů.

V patentové literatuře byly již popsány určité způsoby imobilizace enzymů, mimo jiné i invertázy. Jedná se především o čs. autorské osvědčení č. 214 096, kde je popsáno využití mikroporézních částic organických polymerů sorpcí a následné kovalentní vazby enzymů pomocí sorbovaných síťovacích činidel, zejména glutaraldehydu nebo sorpcí roztoků různých enzymů včetně invertázy na částice polymerních sorbentů a následujícího kovalentního zesíťování sorbovaných enzymů glutaraldehydem.

V čs. autorském osvědčení č. 209 743 je popsán způsob výroby imobilizovaných enzymů včetně invertázy na mikroporézní organické polymerní sorbenty na bázi poly-6-kaprolaktamu a polykondenzátů melaninu s formaldehydem a močoviny s formaldehydem, přičemž princip imobilizace enzymů spočívá v předchozí chemické reakci částic těchto syntetických aminopolymerů s volným glutaraldehydem, ze současné chemické aktivace těchto částic, vymytí nadbytku síťovadla a následující kovalentní vazby enzymů prostřednictvím chemicky aktivních aldehydických skupin, za tvorby Schiffovýchází mezi enzymovou bílkovinou a částicemi uvedených a popsaným způsobem aktivovaných sorbentů.

Uvedené postupy však vyžadují izolované technické nebo čisté enzymy, tedy i invertázu, což zvyšuje náklady na výrobu a aplikaci těchto katalyzátorů. Podstatně ekonomičtější postupy imobilizace jsou ty, které nevyžadují izolovaných enzymů, tedy postupy využívající imobilizovaných buněk s požadovanou enzymovou aktivitou. Fyzikální imobilizaci kvasinek s invertázovou aktivitou popsali např. Toda a Shoda (Biotechnol. Bioeng., 17, 481, 1975) a D' Souza a Nadkarni (Hindustan Antibiotics Bull., 20, 68 1978). V prvním případě se jedná o zabudování buněk do agarových pelet, v druhém případě o zabudování buněk do sítě vznikajícího polymeru kopolymerací akrylamidu s N,N'-metylendiakrylamidem, za tvorby dobře sedimentujících částic katalyzátorů.

Při opakovaném použití fyzikálně zabudovaných buněk však dochází k vyplavování buněk z částic, a tím k poklesu specifické aktivity a enzymové účinnosti, neboť použité přírodní či syntetické polymery tvoří velmi měkké pelety.

Jistým pokrokem v technologii enzymových transformací je např. postup popsán v čs. autorském osvědčení č. (PV 9573-82), který spočívá v chemické aktivaci původně chemicky inertních částic syntetických mikroporézních polymerů čs. provenience, reaktivními ve vodě rozpustnými polymery a následné kovalentní vazby mikrobiálních buněk, rostlinných buněk a enzymů na aktivované částice. V citovaném autorském osvědčení je popsán i způsob imobilizace celých neporušených buněk kvasinek s invertázovou aktivitou a izolované invertázy na částice předem chemicky aktivovaných organických a anorganických ve vodě nerozpustných nosičů.

Tento postup při použití izolovaného enzymu poskytuje velmi dobré výsledky, při imobilizaci celých buněk však výsledné preparáty mají relativně nízkou specifickou aktivitu. V čs. autorském osvědčení č. 209 265 je popsán způsob výroby vzájemně chemicky vázaných mikrobiálních buněk s různou enzymovou aktivitou, mimo jiné i kvasinek s invertázovou aktivitou. Tento způsob imobilizace je výhodnější ve srovnání s předcházejícím, neboť nevyžaduje žádné ve vodě nerozpustné nosiče. Postup spočívá v kovalentním zesíťování individuálních buněk glutaraldehydem, jejich následné permeabilizaci, načež se individuálně zesíťované a permeabilizované buňky s různými enzymovými aktivitami navzájem kovalentně imobilizují za tvorby stabilních buněčných agregátů za specifických podmínek, zejména v odstředivém

poli, filtračním tlakem a mražením reakční směsi. Tímto postupem lze získat stabilní pevné agregáty imobilizovaných buněk, avšak technologie výroby vyžaduje speciálních reakčních podmínek, z čehož vyplývají zvýšené nároky na strojní a technologické vybavení provozu.

Ve snaze po odstranění tohoto technologického limitu výroby a využití buněčných katalyzátorů v různých průmyslových odvětvích, byla vypracována podstatně zjednodušená a do značné míry univerzální technologie výroby různých imobilizovaných prokaryontních a eukaryontních buněk, jejichž částice obsahují různé enzymy a jsou použitelné pro různé biotransformace, mimo jiné obsahující i enzym invertázu. Tyto postupy jsou předmětem čs. autorského osvědčení č. 231 458.

Citovaným postupem, který spočívá na vzájemné chemické imobilizaci různých buněk ne-soucích různé enzymy pomocí reaktivních ve vodě rozpustných polymerů (dále jen RRP), lze vytvořit částice biokatalyzátorů nejen použitím techniky maražení reakční směsi, ale i pouhým mícháním suspendovaných buněk v reakční směsi za normálních teplot, s výhodou při pokojové teplotě. Vzniklé částice katalyzátorů mají sice vysokou enzymovou aktivitu a dobré sedimentační vlastnosti, jsou však měkké a musí se různým způsobem mechanicky zpevňovat buď použitím lepidel rozpouštěných v organických rozpouštědlech např. acetonu, nebo postformací voluminězních částic do formy granulí nebo válečků a jejich následným sušením.

První způsob zpevňování má za následek vytvoření difúzní bariéry pro substrát a produkty do a z částic snížením jejich porozity (parciálním zalepením pórů částic), druhý způsob vede k tvorbě velkých částic, řádově 1 až 10 mm, čímž se odstraní počáteční výhoda vysoké specifické aktivity původně vzniklých menších částic (závislost velikosti částice na specifickém povrchu).

Pokud nebyly k výrobě katalyzátorů podle čs. autorského osvědčení č. 231 458 použity jako výchozí materiál zesíťené a permeabilizované buňky, tedy bylo-li použito celých neporušených nativních buněk, získané částice vykazovaly jak během skladování, tak během opakovaného nebo kontinuálního použití nižší stabilitu sledované enzymové aktivity, tedy i aktivity invertázy.

Tato skutečnost je způsobena tím, že RRP v důsledku jeho vysoké molekulové hmotnosti nepenetruje do nativních buněk, což je výhoda pro některé enzymy obsažené v buňkách, které jsou extrémně citlivé k volnému nízkomolekulárnímu síťovadlu, zejména glutaraldehydu. K enzymům, které nejsou extrémně citlivé k jinak poměrně agresivním účinkům bifunkčních síťovacích činidel jako je např. glutaraldehyd, patří i enzym invertáza.

Této skutečnosti bylo již využito v minulosti, při různých způsobech imobilizace enzymu a buněk s touto aktivitou v citovaných autorských osvědčeních a tyto postupy jsou souhrnně uvedeny v recentním článku o imobilizovaných buňkách (Folia Microbiol., 28, 309 až 340, 1983).

Nyní, bylo zjištěno, že v závislosti na způsobu výroby imobilizovaných buněk popsaném v čs. autorském osvědčení č. 231 458, lze chemickým v kombinaci s mechanickým způsobem zpevňovat a stabilizovat částice biokatalyzátoru s invertázovou aktivitou, přičemž získaný materiál je použitelný k enzymové inverzi sacharózy, jejích technických forem a meziproductů její výroby v průmyslovém měřítku.

Technologie zpevňování a stabilizace částic podle předmětného vynálezu je jednoduchá, nevyžaduje žádných ve vodě nerozpustných nosičů a především nevyžaduje speciální technologické a strojní zařízení. K výrobě katalyzátoru, zpevňování a stabilizaci částic je třeba pouze míchací kotel a filtrační vakuové zařízení.

Výše uváděné nevýhody byly odstraněny vypracováním způsobu zpevňování a stabilizace částic biokatalyzátoru, připravených podle autorského osvědčení č. 231 458, pro enzymovou inverzi sacharózy, při které se vodný roztok sacharózy, jejích technických forem a meziproduktů její výroby, uvádí ve styk s částicemi biokatalyzátoru, jehož podstata spočívá v tom, že se do nepřetržitě míchané směsi částic biokatalyzátoru na bázi kvasinkových buněk obsahujících enzym invertázu, výhodně *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Saccharomyces uvarum*, přidá po úpravě pH na rozmezí 6,0 až 8,0 vodný roztok glutaraldehydu a/nebo vodný roztok nebo suspenze technické nebo čisté bílkoviny živočišného, rostlinného a/nebo mikrobiálního původu, jako je vaječná bílkovina, desintegrované nebo autolyzované mikrobiální buňky, výhodně buňky použitého produkčního mikroorganismu, načež se směs popřípadě dosítí dalším přídatkem glutaraldehydu, stabilizované částice se od reakční kapaliny oddělí filtrací, suspendují za intenzivního míchání v ledovém acetonu, načež se filtrací znovu oddělí a suší po homogenizaci volně na vzduchu při teplotě místnosti po dobu 1 až 24 hodin, poté se suspendují ve studené vodě, několikrát se vodou dekantují a nakonec se nechají botnat ve vodě nebo v pufru při teplotách v rozmezí 5 až 20 °C.

Tímto způsobem získané zpevněné a stabilizované částice biokatalyzátoru se uvedou ve styk s vodnými roztoky sacharózy, jejích technických forem, s výhodou surové sacharózy nebo kléru, a meziproduktů její výroby, nebo matečných louhů, zejména melasy a těžké cukrové šťávy, a při pH reakční směsi 4,0 až 5,0 se provádí diskontinuální opakovaná nebo kontinuální hydrolýza při teplotách 10 až 80 °C, načež se po proběhlé reakci z přefiltrované kapaliny nebo sirupu, oddělené od částic katalyzátoru popřípadě izolují glukóza a fruktóza nebo se oba ve směsi nebo jeden z produktů podrobí účinku jiných enzymů nebo se získaná směs obou monosacharidů použije pro potravinářské či jiné účely.

Částice biokatalyzátoru, získané podle předmětného vynálezu, jsou pevné, velmi rychle sedimentující útvary nepravidelné velikosti a tvaru s vysokou stabilitou invertázy, což je doloženo v následujících příkladech provedení. Jejich pevnost, dobré sedimentační vlastnosti, snadná a rychlá separovatelnost z reakční směsi a vysoká specifická aktivita a účinnost enzymové konverze umožňuje jejich mnohonásobné opakované nebo kontinuální využití v běžných typech reaktorů, při vysokých iniciálních koncentracích substrátu.

Jako výchozí enzymové aktivní buněčný materiál byly použity komerční pivovarské nebo pekařské kvasinky. Způsob zpevňování a stabilizace částic biokatalyzátoru podle předmětného vynálezu však nevylučuje využití jiných kmenů mikroorganismů obsahujících intracelulární invertázu, popřípadě kmenů kvasinek a jiných mikroorganismů získaných např. selekcí a nahromadováním či genovou manipulací nebo jiným způsobem šlechtění.

K dělení částic získaného biokatalyzátoru bylo použito kovových sít na síťovou analýzu s velikostí ok 0,8; 0,5 a 0,315 mm, přičemž částice byly děleny plavením na těchto sítích vodou. K vyhodnocení aktivity částic bylo použito jednak enzymatické metody (glukó-zooxidázový test) pro stanovení reakční rychlosti přírůstků koncentrace glukózy podle Jørgensena a Andersona (Anal. Biochem., 53, 141-145, 1973) spektrofotometricky. Referenčními metodami byla spektrofotometrická metoda stanovení přírůstku koncentrací redukujících cukrů podle Janíčka (Rukověť potravinářské analýzy, str. 381, 1962, SNTL), při vysokých iniciálních koncentracích sacharózy byla jednak koncentrace substrátu na počátku hodnocena refraktometricky a vážkově (sušinou), jednak průběh a stupeň enzymové inverze hodnocen polarimetricky.

1 jednotka enzymové účinnosti invertázy v částicích biokatalyzátoru je takové množství enzymu, které uvolní jeden μmol glukózy v jednom mililitru za jednu minutu za podmínek enzymové reakční kinetiky nultého řádu, při teplotě 30 °C, iniciální koncentraci sacharózy 0,25 M rozpuštěné v 0,05 M acetátovém pufru o pH 4,6 v míchaném reaktoru. Specifická aktivita částic biokatalyzátoru má rozměr μmol glukózy $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ suché hmoty.

Sedimentační rychlost částic neděleného katalyzátoru a rozdělených frakcí byla určována dobou za jakou sedimentuje 1 ml dané frakce katalyzátoru; rozměr $\text{ml} \cdot \text{s}^{-1}$. Specifický odpor (R) byl vypočítán z doby, za kterou dané množství substrátu, pod daným tlakem, proteče určitým sloupcem částic katalyzátoru,

$$R = p \cdot S / v \cdot d \quad \text{Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$$

p - tlak substrátu
S - průřez sloupce
v - průtoková rychlost
d - výška sloupce

Specifický odpor měřen pro vodu při teplotě místnosti. Velikost částic byla určována jednak optickým mikroskopem a vestavěným měrným okulárem, jednak dělením na sítěch. Porozita částic byla hodnocena nepřímo měřením reakční rychlosti v závislosti na koncentraci substrátu a také byla zjišťována rastrovacím elektronovým mikroskopem.

Částice katalyzátoru byly suspendovány (asi 0,5 kg/l liter) v 0,05 M acetátovém pufru pH 4,6, obsahujícím 0,1 % (hmota/objem) kyseliny sorbové a přechovávány v polyetylenových lahvích se šroubovým uzávěrem při teplotě 5-10 °C. Za těchto podmínek uchovávání je katalyzátor stabilní 6 měsíců až 1 rok, přičemž kyselina sorbová brání růstu event. sekundární kontaminace v průběhu dlouhodobého skladování. Částice katalyzátoru lze rovněž ošetřit 0,5 až 1,0 % formaldehydem, za účelem jeho sanitace, bez významné ztráty specifické aktivity.

V dalším je vynález blíže objasněn v příkladech provedení, aniž by se jimi omezoval.

P ř í k l a d y provedení

P ř í k l a d 1

200 g vlhké hmoty kvasinek *Saccharomyces uvarum* s invertázovou aktivitou bylo suspendováno v 500 ml reaktivního ve vodě rozpustného polymeru, dále jen RRP, získaného 24 h předchozí polymerací 4 % flokulantu obsahujícího polyetylenimin (Sedipur CL-930 BASF, NSR) a 2 % glutaraldehydu postupem podle čs. autorského osvědčení č. 231 458; pH suspenze bylo upraveno 40 % roztokem NaOH na 7,0 a silně viskózní suspenze obsahující voluminózní částice agregovaných buněk byla jednu hodinu nepřetržitě míchána. Poté bylo přidáno 28 ml 25% vodného roztoku glutaraldehydu a intenzivně mícháno opět jednu hodinu.

Po této době bylo za nepřetržitého míchání upraveno pH suspenze na 8,0 a částice odsáty přes textilní materiál (mlynářská silonová plachetka). Dobře odsátý a od přebytečné reakční směsi vymačkaný materiál byl suspendován v 500 ml čistého acetonu předem vychlazeného na -20 °C. Částice byly pomocí rychloběžného míchadla cca 3 min v ledovém acetonu míchány a poté přes textilní fólii, hrudky homogenizovány a materiál ponechán schnout 24 h volně na vzduchu při teplotě místnosti.

Poté byly větší tvrdé hrudky mechanicky v hmoždíři rozmělněny, suchý materiál homogenizován a suspendován v 1 litru destilované vody. Po cca l hodinovém bobtnání byl materiál 3krát dekantován vždy 1 litrem vody, poté 2krát 1 litrem 0,05 M acetátovým pufrům pH 4,6 a v tomto pufru ponechán bobtnat 24 hodin při teplotě 10 °C. Nabobtnalé částice katalyzátoru byla dobře přes textilní materiál odsáty a zváženy. Bylo získáno 220 g vlhké hmoty zpevněných a stabilizovaných částic biokatalyzátoru o průměrné distribuci velikost 0,76 mm a specifické aktivitě 0,721 $\text{umol glukózy} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ suché hmoty.

8 g vlhké hmoty katalyzátoru bylo suspendováno ve 45 ml 1 M roztoku sacharózy (rafináda), rozpuštěné v acetátovém pufru pH 4,6. Suspenze byla umístěna do Dewargovy temperované

nádoby na 30 °C a ve zvolených časových intervalech, v průběhu nepřetržitého míchání suspenze ocelovým vrtulovým míchadlem o počtu otáček 100 . min⁻¹, sledován přírůstek koncentrace jednoho nebo obou monosacharidů analytickými postupy popsány v popisu předmětného vynálezu.

Bylo zjištěno, že enzymová inverze je kvantitativní (100 % teorie, tj. 360,4 mg glukózy a fruktózy . ml⁻¹) za 90 min. Tento postup s touže násadou biokatalyzátoru byl opakován celkem 20krát vždy tak, že po skončení reakce v každém z cyklů (po 90 min) byla po kvantitativní sedimentaci částic vakuově odsáta reakční směs pasteurovou pipetou z horní části reaktoru a částice opět suspendovány v čerstvé násadě substrátu za jinak stejných podmínek a koncentrace sacharózy. Průměrný stupeň enzymové inverze činil 99,9 % teorie/20 cyklů opakování použití této národy biokatalyzátoru.

200 g vlhké hmoty zpevněných a stabilizovaných částic biokatalyzátoru o průměrné distribuci velikosti 0,76 mm bylo dále fyzikálně a biochemicky charakterizováno postupy uvedenými v popisu předmětného vynálezu, zejména pokud jde o distribuci velikosti částic, specifickou aktivitou jednotlivých velikostních tříd, sedimentační rychlost a specifický odpor částic ve soupci.

Výsledky jsou uvedeny jak následuje.

Frakce částic	Velikost částic (mm)	Množství vlhké hmoty (g)	Zastoupení jednotl. velikostních tříd (%)
A	0,8	103,3	51,5
B	0,8 - 0,5	57,5	28,8
C	0,5 - 0,315	15,3	7,7
D	menší než 0,315	23,9	12,0

Frakce částic	Sedimentační rychlost (s)	Specifický odpor (Pa.s.m ⁻²)	Specifická aktivita (μmol glukózy.mg ⁻¹)
A	4,0	19,69.10 ⁵	0,161
B	8,0	40,78.10 ⁵	0,473
C	9,6	-	0,565
D	21,7	289.02.10 ⁵	1,524

10 g nedělených částic katalyzátoru bylo suspendováno ve 100 ml acetátového pufru, v kterém byla rozpuštěna kyselina sorbová o koncentraci 0,1 %; pH pufru bylo 4,6. Za podmínek skladování uvedených v popisu předmětného vynálezu byla v jednotýdenních časových intervalech sledována specifická aktivita částic. Po 192 dnech nepřetržitého sledování nebyl zaznamenán pokles specifické aktivity částic.

P ř í k l a d 2

5 kg vlhké hmoty nativních buněk *Saccharomyces cerevisiae* bylo suspendováno v 10 litrech destilované vody pomocí rychloběžného míchadla a suspenze obsahující 0,5 g vlhké hmoty buněk/ml byla vychlazená na 5 °C. Poté byly buňky dezintegrovány čtyřnásobným průchodem štěrbínovým mechanickým dezintegrátorem při maximálním přetlaku 6.10⁷ Pa. Mezi jednotlivými cykly dezintegrace byla suspenze vždy ochlazená na 10 až 15 °C. Stupeň dezintegrace

buněk byl sledován jednak mikroskopicky, jednak celkovým množstvím uvolněných bílkovin v supernatantu odstředěné suspenze.

Postupem podle cs. autorského osvědčení č. 231 458 bylo do dvou 35 litrových nerezových fermentačních tanků předloženo a 15 litrů vody a do každého z fermentorů bylo vmícháno 750 g flokulantu obsahujícím polyetylenimin (Sedipur CL-930) a po jeho rozpuštění přidáno a 825 ml 46 % vodného roztoku glutaraldehydu. Výsledná koncentrace obou rekreačních složek v každém z fermentorů činila 5 % (hmota/objem) Sedipuru a 2,5 % (objem/objem) glutaraldehydu.

Polymerace probíhala 24 hodin za nepřetržitého míchání při teplotě 20 °C. 10 kg vlhké hmoty celých buněk *S. cerevisiae* bylo homogenizováno v 10 litrech vody v polyetylenové nádobě pomocí rychloběžného míchadla. Buněčná suspenze byla rozdělena na 2 stejné objemové díly a každý z dílů nalit za zvýšené intenzity míchání do roztoku RRP. Po homogenizaci suspenze bylo upraveno pH z hodnoty 5,2 na 7,5 za intenzivního míchání 40 % roztokem NaOH a mícháno 1 hodinu při počtu otáček 800.min⁻¹.

V 15 litrech dezintegrované suspenze buněk, jejíž příprava byla popsána v prvním odstavci, bylo rozpuštěno 374 g technické vaječné bílkoviny. Celková koncentrace bílkovin v supernatantu po odstředění činila 50 mg.ml⁻¹. Suspenze byla rozdělena na dva stejné objemové díly a každý z nich nalit do míchané suspenze buněk v RRP za současného intenzivního míchání. Po zhoustnutí silně viskózní suspenze byla snížena intenzita míchání a při cca 300 otáčkách.min⁻¹ mícháno 30 minut.

Poté byla intenzita míchání opět zvýšena a do každého v nerezových tancích bylo přidáno 655 ml 46 % vodného roztoku glutaraldehydu. Výsledná koncentrace volného sířovadla činila 1 % (objem/objem). Po intenzivním rozmíchání suspenze bylo míchání přerušeno a reakční směs byla ponechána 30 min v klidu, poté mírně promíchána a za míchání postupně čerpána na rotační vakuový filtr na kterém byla napnuta silonová mlynářská plachetka.

Filtrace částic probíhala za vakua a vlhké a dobře odsáté částice byly krájeny po vrstvách z povrchu plachetky z bubnu rotačního filtru nastaveným nerezovým břitkem. Celkem bylo po filtraci získáno 25,5 kg vlhké hmoty materiálu.

Uvedené množství vlhké hmoty bylo rozděleno na 25 dílů (à 1 kg) a každý díl byl postupně suspendován v 1,5 litru ledového acetonu v 5 litrové nádobě z plastické hmoty pomocí rychloběžného míchadla opatřeného ocelovou vrtulí, cca 3 min intenzivně míchán a poté přes textilní materiál (mlynářská plachetka) vakuově na nuči rychle a ostře odsát a bez promytí ponechán sušit na tácech z plastické hmoty 24 hodin při teplotě místnosti. Popsaným způsobem bylo postupně zpracováno všech 25 hmotnostních dílů materiálu.

Po usušení byl materiál mechanicky homogenizován a zvážen. Bylo získáno 6,045 kg suché hmoty částic. Na síti byla v suchém stavu oddělena frakce, jejíž částice byly větší než 2 mm (hrudky). Zbylé množství suché hmoty (5,5 kg) bylo suspendováno ve 20 litrech pitné vody v polyetylenové nádobě a několikrát 20 litry vody dekantováno, vždy po kvantitativní sedimentaci materiálu. Materiál ponechán bobtnat přes noc v komorové lednici při teplotě 10 °C.

Po nabobtnání materiál pomocí rychloběžného míchadla intenzivně ve vodě míchán a vždy po kvantitativní sedimentaci částic mnohonásobně promyt pitnou vodou, při slití horní zakalené vrstvy a velmi jemných podílů částic. Dekantace probíhala tak dlouho, dokud po intenzivním míchání nebyl v promývací vodě zákal. Po kvantitativní dekantaci byl materiál vakuově přes mlynářskou plachetku na nuči dobře odsát a zvážen. Získané množství činilo 7,5 kg vlhké hmoty. Toto množství suspendováno v 15 litrech 0,04 M acetátového pufru o pH 4,6, který obsahoval 0,1 % kyseliny sorbové a ponechán do druhého dne při teplotě 10 °C.

Specifická aktivita zpevněných a stabilizovaných částic biokatalyzátoru činila $0,450 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ suché hmoty, průměrná velikost částic činila $0,363 \mu\text{m}$. Se získaným katalyzátorem bylo provedeno 20 opakovaných konverzí enzymové inverze $1,5 \text{ M}$ roztoku sacharózy (rafináda o koncentraci 51% hmota/objem) postupem popsaným v příkladu 1 s tím rozdílem, že jeden cyklus enzymové inverze s touže násadou katalyzátoru trval 4 hodiny. Za uvedených podmínek činil průměrný stupeň konverze $96,8 \%$ teorie/20 cyklů opakovaného použití zpevněných a stabilizovaných částic. Specifická aktivita katalyzátoru se po jeho 20násobném použití nezměnila.

P ř í k l a d 3

Se zpevněnými a stabilizovanými částicemi biokatalyzátoru, jehož způsob přípravy a základní vlastnosti byly popsány v příkladu 2, byla provedena kontinuální enzymová inverze sacharózy (rafináda) třemi způsoby. (A) konverze substrátu v koloně s pevným ložem biokatalyzátoru, (B) konverze substrátu v koloně s míchaným ložem biokatalyzátoru, (C) konverze substrátu v míchaném jednostupňovém kontinuálním reaktoru.

(A) Skleněná kolona o vnitřním průměru 16 mm a délce 20 cm byla naplněna do výšky $19,5 \text{ cm}$ 20 g částic vlhkého katalyzátoru. $0,5 \text{ M}$ roztok sacharózy v acetátovém pufru $\text{pH } 4,6$ byl čerpán na pevné lože katalyzátoru, vertikálně umístěnou kolonou směrem shora dolů, rychlostí $5 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ při teplotě místnosti. Po přibližně dvou výměnách objemu kolony (přibližně za 17 hodin nepřetržitého toku) činil průměrný stupeň enzymové inverze na výtoku z kolony 90% teorie ($162 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ redukujících cukrů). Reaktor byl v nepřetržitém chodu 140 hodin při dosažení nezměněného stupně enzymové inverze.

(B) Stejná skleněná kolona byla naplněna 18 g vlhké hmoty katalyzátoru a upevněna v horizontální poloze na reciproký třepací stroj o počtu kyvů $120 \cdot \text{min}^{-1}$. Do jednoho konce kolony byl čerpán 1 M roztok sacharózy v acetátovém pufru $\text{pH } 4,6$ rychlostí $10 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ a z druhého konce byla reakční směs jímána za nepřetržitého míchání při teplotě 28°C . Kolona byla v kontinuálním chodu 24 hodin při dosažení průměrného stupně teoretické enzymové inverze 98% .

(C) 45 g vlhké hmoty částic katalyzátoru bylo suspendováno ve 450 ml 1 M roztoku sacharózy v pufru a suspenze pomalu míchána při teplotě místnosti. Po dosažení ustáleného stavu, po dosažení kvantitativní konverze, byl do míchané nádoby rychlostí $166 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ čerpán 1 M roztok sacharózy a stejnou rychlostí, pomocí druhého čerpadla, odsávána reakční směs. Aby nedocházelo k úniku (odsávání) částic z reaktoru, byl odsávací konec trubice opatřen polyamidovým sítkem a obalen mlynářskou plachetkou. Za uvedených podmínek byl jednostupňový míchaný kontinuální reaktor v chodu 24 hodin při průměrném dosažení stupně teoretické inverze $88,5 \%$.

P ř í k l a d 4

Zpevněné a stabilizované částice biokatalyzátoru, jejichž způsob přípravy byl popsán v příkladu 2, byly použity k enzymové inverzi technických forem sacharózy, zejména surového cukru (afinády) a kléru. Konverze těchto forem sacharózy byly prováděny ve vsádkovém míchaném reaktoru při teplotě 40°C , $\text{pH } 4,6$ (okyselením vodních roztoků technické sacharózy kyselinou octovou), koncentraci katalyzátoru 15 objemových $\%$ (150 g vlhké hmoty částic + 850 ml roztoku resp. sirupu). Jedinou proměnnou veličinou byla počáteční koncentrace sacharózy v jejich různých technických formách. Sušinou a refraktometricky stanovená počáteční koncentrace cukru v neředěném kléru činila $66 \text{ g}/100 \text{ ml}$, tj. přibližně $1,9 \text{ M}$ roztok sacharózy. Klér byl ředěn okyselenou vodou. Surový cukr rozpuštěn v okyselené vodě. Výsledky jsou shrnuty jak následuje.

Forma sacharózy	klér					afináda	
konc. sacharózy (hmot. %)	66	56,5	51,4	46,3	41,3	60	65
max. dosažený stupeň inverze (% teorie)	78	87,6	91,0	96,0	98,0	88,3	81,2
reakční doba (h)	4	4	3	3	3	4	4

P ř í k l a d 5

Katalyzátorem, jehož způsob zpevnění a stabilizace byl popsán v příkladu 2, bylo provedeno 10 opakovaných cyklů enzymové inverze něředěného kléru, v kterém koncentrace sacharózy byla 67 hmot. %. Konverze byly provedeny v míchaném vsádkovém reaktoru při teplotě 60 °C a pH 4,6 v Dewarově nádobce způsobem popsáným v příkladu 1. Jediným rozdílem byl způsob manipulace s katalyzátorem. Částice byly po každém ukončeném reakčním cyklu přečezeny přes mlynářskou plachetku a bez promytí dány zpět do reaktoru a přelity opět čerstvou násadou něředěného kléru. pH kléru pro každou opakovanou sádku bylo upraveno kyselinou octovou na hodnotu 4,6. Doba jednoho cyklu činila standardně 4 hodiny. Za uvedených podmínek činil průměrný stupeň konverze 83,6 % teorie/10 opakovaných cyklů použití téže násadu katalyzátoru. Specifická aktivita částic se po jejich 10násobném použití za uvedených podmínek nezměnila.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob zpevňování a stabilizace částic biokatalyzátoru pro enzymovou inverzi sacharózy, připravených podle autorského osvědčení č. 231 458, při které se vodný roztok sacharózy, jejích technických forem a meziproduktů její výroby uvádí ve styk s částicemi biokatalyzátoru, vyznačený tím, že se do nepřetržitě míchané směsi částic biokatalyzátoru na bázi kvasinkových buněk obsahujících enzym invertázu, výhodně *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Saccharomyces uvarum*, přidá po úpravě pH na rozmezí 6,0 až 8,0 vodný roztok glutaraldehydu a/nebo vodný roztok nebo suspenze technické nebo čisté bílkoviny živočišného, rostlinného a/nebo mikrobiálního původu, jako je vaječná bílkovina, desintegrované nebo autolyzované buňky, výhodně buňky použitého produkčního mikroorganismu, načež se směs popřípadě dosítí dalším přídatkem glutaraldehydu, stabilizované částice se od reakční kapaliny oddělí filtrací, suspendují se za intenzivního míchání v ledovém acetonu, filtrací se znovu oddělí a suší se po homogenizaci volně na vzduchu při teplotě místnosti po dobu 1 až 24 hodin, potom se částice suspendují ve studené vodě, několikrát se vodou dekantují a nechají se bobtnat ve vodě nebo v pufu při teplotě v rozmezí 5 až 20 °C.