



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

263588
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 07 H 7/033

(22) Prihlášené 14 12 87
(21) (PV 9159-87.N)

(40) Zverejnené 16 09 88

(45) Vydané 15 07 89

(75)

Autor vynálezu

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

(54) Spôsob prípravy kyseliny D-galaktopyranurónovej

1

2

Riešenie sa týka spôsobu prípravy kyseliny D-galaktopyranurónovej, pri ktorom sa na pektan sodný pôsobí imobilizovanou exo-D-galakturonanázou, pri pH 4,4 až 5,2 a teplote 30 až 40 °C, po dobu 16 až 24 hodín. Využitie kyseliny D-galaktopyranurónovej je pri štúdiu pektínových látok a pektolytických enzýmov a pre charakterizáciu v priemysle používaných komerčných pektínáz.

Vynález sa týka spôsobu prípravy kyseliny D-galaktopyranurónovej účinkom imobilizovanej exo-D-galakturonázy.

Kyselina D-galaktopyranurónová sa doteraz vyrába syntézou len v kapitalistických štátoch, na socialistickom trhu je nedostupná. Bola pripravená vo viacerých laboratóriách a to cestou chemickej hydrolýzy: Hatanaka C., Ozawa J.: J. Gen. Chem. Soc. Japan **40**, 98 (1960), Rexová — Benková E.: Chem. Zvesti **21**, 59 (1970), alebo cestou enzýmovej hydrolýzy aplikovaním rozpustných pektolytických enzýmov: Van Houdenhoven F., Vitte P. D., Vister J.: Carbohydr. Res. **14**, 113 (1974), Heinrichová K.: AO 220 296 (1986), resp. aplikovaním imobilizovanej endo-D-galakturonázy: Rexová — Benková E., Omelková J., Kubánek V.: AO 218 198 (1983). Postup prípravy kyseliny D-galaktopyranurónovej účinkom imobilizovanej exo-D-galakturonázy nebol doteraz popísaný. Všetky doteraz popísané postupy sú viacstupňové a značne sa odlišujú heterogenitou získaného produktu. Spoločným rysom týchto postupov je, že vedú k malým výťažkom kyseliny D-galaktopyranurónovej popri výťažku ostatných oligogalakturónových kyselín. Získanie kyseliny D-galaktopyranurónovej zo zmesi oligogalakturónových kyselín, má mnohé nevýhody: prácnosť, časovú náročnosť a viacstupňové izolácie.

Tieto nedostatky odstraňuje spôsob prípravy kyseliny D-galaktopyranurónovej účinkom imobilizovanej exo-D-galakturonázy, ktorého podstata spočíva v tom, že sa na pektan sodný pôsobí imobilizovaným pektolytickým enzýmom — exo-D-galakturonázou, pri teplote 30 až 40 °C a pH 4,4 až 5,2, pričom jediným produktom enzýmom katalyzovanej reakcie je kyselina D-galaktopyranurónová, ktorá sa oddelí chromatografiou na kolóne Sephadexu G—10 a efluent sa odparí, alebo vysuší mrazovou sublimáciou.

Ďalšou výhodou tohoto postupu je kontinuálne a viacnásobné použitie preparátu imobilizovaného enzýmu v reakcii, čo oproti aplikácii rozpustného enzýmu vedie k značným úsporám na nákladoch.

Kyselina D-galaktopyranurónová je látka dôležitá z hľadiska teoretického štúdia pektínových látok a pektolytických enzýmov a pre charakterizáciu v priemysle používaných komerčných pektínáz.

Spôsob prípravy exo-D-galakturonázy imobilizovanej kovalentnou väzbou je predmetom AO 257 830, autorov Heinrichová K. a Zilechovcová D. a spôsob prípravy exo-D-galakturonázy imobilizovanej hydrofóbnou adsorpciou je uvedený v AO 257 831 autor Heinrichová K.

Príklad 1

100 ml 1 %-ného roztoku pektanu sodného v 0,1 mól.l⁻¹ octanového tlmivého roztoku pH 4,4 až 4,8 sa inkubuje so suspenziou hydrofóbnou adsorpciou imobilizovaného enzýmu, za miešania, v temperovanej nádobe s dvojitým plášťom. Hydrolýza prebieha pri 40 °C počas 16 až 24 hodín. Enzýmom katalyzovaná reakcia (po kontrole chromatografiou) sa ukončí odstránením imobilizovaného enzýmu odsátím fritou. Supernatant sa zahustí vákuovým odparením pri 40 °C. 10 ml zahusteného hydrolyzátu sa nanesie na stĺpec molekulového síta (Sephadex G—10) a efluent s kyselinou D-galaktopyranurónovou sa odparí alebo vysuší mrazovou sublimáciou.

Výťažok kyseliny D-galaktopyranurónovej je 72 %.

Príklad 2

Suspenzia exo-D-galakturonázy imobilizovanej na ľubovoľný nosič v tlmivom roztoku o pH 4,4 až 5,2 sa naplní do kolóny cez ktorú sa filtruje 0,5 %-ný roztok pektanu sodného dovtedy, kým sa nezíska 90 %-ná konverzia substrátu. Enzýmom katalyzovaná reakcia prebieha pri 30 °C. Efluent z kolóny sa zahustí vákuovým odparovaním pri 40 °C. 10 ml hydrolyzátu sa nanesie na stĺpec molekulového síta — Sephadex G—10, frakcia kyselinou D-galaktopyranurónovou sa vysuší mrazovou sublimáciou.

Výťažok kyseliny D-galaktopyranurónovej je až 82 %.

Príklad 3

50 ml 0,75 %-ného roztoku pektanu sodného v 0,1 mól.l⁻¹ octanovom tlmivom roztoku pH 5,0 až 5,2 sa inkubuje so suspenziou exo-D-galakturonázy kovalentne viazanej na nosič polyakrylamidového typu. Enzýmom katalyzovaná reakcia prebieha za miešania a temperovania 24 hodín pri 35 °C. Enzýmová reakcia sa ukončí odsátím imobilizovaného enzýmu. Efluent obsahujúci kyselinu D-galaktopyranurónovú sa spracuje ďalej postupom uvedeným v príklade 1 a 2.

Výťažok kyseliny D-galaktopyranurónovej je 65 %.

Schopnosť imobilizovaného enzýmu katalyzovať zmienenú degradáciu pektanu sodného je závislá na obsahu exo-D-galakturonázy na nosiči a relatívnej aktivite preparátu ako i od reakčných podmienok uvedených v príklade 1, 2 a 3. Preparáty použité v príklade 1 a 3, pri štiepení glykozidických väzieb pektanu sodného vykazovali 40 až 45 % z aktivity rozpustnej formy enzýmu.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy kyseliny D-galaktopyranurónovej vyznačený tým, že sa na pektan sodný pôsobí imobilizovanou exo-D-galaktu-

ronázou pri pH 4,4 až 5,2 a teplote 30 až 40 °C počas 16 až 24 hodín.