



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

233 866

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 04 05 83
(21) {PV 3162-83}

(51) Int. Cl.³ C 12 P 19/02

(40) Zveřejněno 13 08 84
(45) Vydáno 01 04 87

(75)

Autor vynálezu MAREK MIROSLAV ing. CSc.,
POTÁČOVÁ MILOSLAVA,
JARÝ JIŘÍ prof. ing. DrSc.,
VODRÁŽKA ZDENĚK doc. ing. DrSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy invertního cukru

Vynález se týká způsobu přípravy invertního cukru pomocí enzymu invertasy obsažené v buněčných stěnách kvasinek zabudovaných do matrice gelu, s výhodou do hydrofilního gelu oxidu křemičitého.

K přípravě heterogenního biokatalyzátoru je možno použít buněčných stěn kvasinek obsahujících invertasu získaných jako odpadní produkt výroby kvasničného autolysátu. Buněčné stěny je možno aplikovat i v sušeném stavu, ve kterém má obsažená invertasa vysokou stabilitu.

Aktivitu invertasy v biokatalyzátoru je dále možno výrazně zvýšit jodistanovým oxidačním štěpením vicinálních diolů v buněčné stěně přítomných polysacharidů.

Způsobem podle vynálezu je možno invertovat i roztoky sacharozy s vysokou koncentrací, získaný sirup invertního roztoku je mikrobiálně stálý.

Vynález se týká způsobu přípravy invertního cukru enzymovou hydrolysou heterogenním biokatalysátorem.

Invertní cukr, tj. ekvimolární směs D-glukosy a D-fruktosy, představuje velmi cennou surovinu v cukrovarnickém průmyslu zvláště v zemích, kde je vyšší zemědělská výroba sacharosy ve srovnání se škrobem /a z této suroviny vyráběným fruktosovým sirupem/. Ve srovnání se sacharosou má invertní cukr lepší organoleptické vlastnosti, poněkud vyšší sladivost a především je aplikovatelný i ve vysokých koncentracích, při nichž si ponechává svoji velmi malou ochotu krystalizovat. Vedle potravinářského průmyslu má invertní cukr značný význam i ve včelařství a při výrobě apyrogenní D-glukosy. Průmyslově byla též aplikována chromatografická separace obou monosacharidů, tj. výroba žádoucí D-fruktosy.

Invertní cukr je možno připravit buď chemickým nebo enzymovým způsobem. Chemické inverzi sacharosy ať již minerálními nebo organickými kyselinami, popřípadě pomocí ionexů byla věnována řada prací. Společnou nevýhodou těchto postupů je tvorba rozkladných produktů, tj. 5-hydroxymethylfuran-2-karbaldehydu /HMF/, kyseliny levulové a kyseliny mravenčí. Především z důvodů toxických vlastností HMF a jeho kondenzačních produktů byla aplikována řada postupů enzymové hydrolysy sacharosy pomocí enzymu invertasy. Ve většině případů byla použita čistá invertasa izolovaná z různých druhů kvasinek rodu *Saccharomyces*. Aplikace volného enzymu má vedle zvýšené ekonomické náročnosti dané vyšší spotřebou enzymu nevýhodu v kontaminaci produktu použitým enzymem. Z tohoto důvodu byla popsána příprava celé řady heterogenních biokatalyzátorů s imobilisovanou invertasou ať již vázanou na

různé druhy nosičů či zabudovanou do přírodních či syntetických gelů. Příprava těchto biokatalyzátorů je technicky i ekonomicky poněkud náročná zvláště v případě kovalentní vazby invertasy na nosiče, které u syntetických polymerů představují nezanedbatelný podíl materiálních nákladů.

Způsob přípravy invertního cukru podle vynálezu enzymovou hydrolysou sacharózy heterogenním biokatalyzátorem spočívá v tom, že se hydrolysa provádí syntetickým či přírodním gelem s výhodou hydrofilním gelem oxidu křemičitého, do jehož matrice se zabudují buněčné stěny kvasinek s obsahem invertázy.

K přípravě gelu je možno použít buněčných stěn získaných jako odpadní produkt výroby kvasničného autolysátu. Buněčné stěny lze aplikovat i v sušeném stavu, ve kterém má obsažená invertasa vysokou stabilitu.

Aktivitu invertasy v biokatalyzátoru připraveného podle vynálezu je dále možno výrazně zvýšit parciální destrukcí buněčných stěn s výhodou pomocí jodistanové oxidace vicinálních diolů přítomných polysacharidů.

Použití buněčných stěn kvasinek nejenom odstraňuje techniky i ekonomicky náročnou izolaci vlastního enzymu, ale navíc zabudování nerozpustných subcelulárních částic /tj. buněčných stěn kvasinek, ve kterých je invertasa obsažena/ do gelu je na rozdíl od volného rozpustného enzymu pevnější s podstatně nižším nebezpečím úniku enzymu z matrice gelu do reakčního prostředí. Použitá invertasa se na rozdíl od izolovaného enzymu nachází ve "fyziologičtějším prostředí", které se více blíží prostředí buňky a z toho důvodu je i stabilita takto imobilisovaného enzymu vyšší.

Druh gelu i způsob zabudování buněčných stěn do jeho matrice je závislý od zamýšleného způsobu aplikace připraveného biokatalyzátoru. Pro kolonová uspořádání je třeba volit přípravu gelu vytvářejícího pokud možno rovnoměrnou distribuci sférických částic, pro vsádkové postupy přípravy invertního cukru není tento požadavek tolik rozhodující.

Způsobem podle vynálezu je možno invertovat i roztoky sacharosy s vysokou koncentrací, takže získaný sirup invertního cukru je mikrobiálně stálý. Je rovněž prostý produktů vedlejších reakcí či kontaminujících složek.

Vynález je dokumentován příklady použití.

Příklad 1

Roztok 50 ml vodního skla a 200 ml vody byl za intenzivního míchání okyselen 6 M kyselinou mravenčí na pH 3,9. Po ochlazení na 10 °C bylo přidáno 75 ml koncentrovaného roztoku močoviny. Po dalších 30 minutách míchání bylo přidáno 5 g buněčných stěn kvasinek *Saccharomyces uvarum*. Po dalším 0,5 h míchání byla získaná homogenní směs přikapána za intenzivního míchání do 800 ml trifluortrichlorethanu. Vytvořený hydrogel byl promyt 1% roztokem Tweenu a vodou. U získaného gelu byla zjištěna invertasová aktivita 1,34 ukat/g sušiny. Po vysušení tohoto hydrogelu ve vakuu vodní vývěvy byla invertasová aktivita rovna 0,57 ukat/g sušiny.

K 50 g hydrogelu byly přidány 2 l 40% roztoku sacharosy a reakční směs byla míchána při 60 °C do úplné inverse sacharosy. Po usazení biokatalyzátoru byl vzniklý invertní cukr odsát, do reakce byly vloženy opět 2 l 40% sacharosy a v hydrolyse bylo pokračováno, aniž by došlo k podstatné změně aktivity biokatalyzátoru.

Příklad 2

K 8 g buněčných stěn kvasinek *Saccharomyces uvarum* v 4,5 l 0,05 M acetátového pufru pH 5 bylo přidáno 80 ml 0,05 M jodistanu sodného a reakční směs byla míchána 6 h za nepřístupu světla. Po odstředění byly oxidované buněčné stěny přidány ke směsi 25 ml vodního skla a 100 ml vody /po úpravě pH kyselinou mravenčí na hodnotu 3,9/. Po třech hodinách míchání byl vytvořený hydrogel promyt 3krát 250 ml vody. Získaný biokatalyzátor anorganického hydrogelu se zabudovanými oxidovanými buněčnými stěnami kvasinek *Saccharomyces uvarum* vykazoval aktivitu invertasy 22 ukat/g sušiny.

K získanému hydrogelu byly přidány 4 l 60% sacharosy a reakční směs byla míchána při 60 °C po dobu 10 h. Odfiltrovaný biokatalyzátor byl opakovaně používán k dalším hydrolyzám, aniž by výrazně klesala jeho aktivita.

Příklad 3

8 g buněčných stěn kvasinek *Saccharomyces uvarum* bylo oxidováno viz příklad 2. K odstředěným buněčným stěnám ve 35 ml 0,05 M fosfátového pufru pH 6 bylo za míchání přidáno 0,64 g akrylamidu a 0,035 g N,N'-methylenbisakrylamidu, 0,37 ml 5% roztoku 3-dimethylaminopropionitrilu a 0,37 ml 2,5% roztoku persíranu draselného. Po ztuhnutí byl vzniklý gel temperován 30 minut při 37 °C a poté byl rozmixován. Získaný gel měl invertasovou aktivitu 3,3 ukat/g sušiny.

50% roztok sacharosy byl hydrolysován za katalysy připraveným gelem shodným postupem jako v příkladu 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

233 886

1. Způsob přípravy invertního cukru enzymovou hydrolysou sacharosy heterogenním biokatalyzátorem, vyznačující se tím, že se hydrolysa provádí syntetickým nebo přírodním gelem, s výhodou hydrogelem oxidu křemičitého, do jehož matrice se zabudují buněčné stěny kvasinek s obsahem invertasy.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že ^{jako} buněčné stěny kvasinek s obsahem invertasy se ^{používá} vedlejší produkt z výroby kvasničného autolysatu.
3. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se aktivita invertasy obsažené v buněčných stěnách zvýší jodistanovým oxidativním štěpením vicinálních diolů v buněčných stěnách obsažených polysacharidů.