



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

210 222
(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 03 03 80
(21) PV 1425-80

(51) Int. Cl.³ C 12 P 19/12

(40) Zverejnené 30 04 81
(45) Vydané 30 08 82

(75)

Autor vynálezu HEINRICHOVÁ KVETA ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob výroby kyseliny digalakturónovej enzýmovou hydrolýzou

Vynález sa týka spôsobu prípravy kyseliny digalakturónovej enzýmovou hydrolýzou.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že sa na kyselinorozpustnú polygalakturónovú kyselinu pôsobí enzýmom endo-D-galakturonázou pri teplote 30 až 40 °C a pH 4,2 až 5, pričom kyselina digalakturónová sa oddelí chromatograficky na kolóne a efluent sa odparí alebo vysuší mrazovou sublimáciou.

Význam vynálezu spočíva v použití kyseliny digalakturónovej na testovanie rôznych enzymatických preparátov používaných v konzervárskom, kožiarskom a textilnom priemysle.

Vynález sa týka spôsobu prípravy kyseliny digalakturónovej enzýmovou hydrolýzou.

Kyselina digalakturónová sa doteraz priemyselne nevyrába. Bola pripravená v niekoľkých laboratóriách cestou chemickej hydrolýzy (Hatanaka C., Ozawa J. J. Agr. Chem. Soc. Japan Vol. 40 str. 98 (1966); Rexová-Benková L., Chem. zvesti 24 (1970), str. 59; van Hon-denhoven F., Wittp. D., Visser J. Carbohydr. Res. 34, str. 233 (1974)). Všetky popísané postupy sú viacstupňové a značne sa odlišujú heterogenitou získaného produktu. Spoločným rysom týchto postupov je, že vedú k malým výťažkom kyseliny digalakturónovej popri vysokom výťažku vyšších oligogalakturónových kyselín. Získanie kyseliny digalakturónovej v čistom stave zo zmesi oligogalakturónových kyselín má mnohé nevýhody ako je pracnosť, časová náročnosť a viacstupňové izolácie.

Tieto nedostatky odstraňuje spôsob výroby kyseliny digalakturónovej enzýmovou hydrolýzou, ktorého podstata spočíva v tom, že sa na kyselinorozpustnú polygalakturónovú kyselinu pôsobí enzýmom endo-D-galakturonázou pri teplote 30 až 40 °C a pH 4,2 až 5, pričom kyselina digalakturónová sa oddelí chromatograficky na kolóne a efluent sa odparí alebo vysuší mrazovou sublimáciou.

Výhodou tohto postupu je, že endo-D-galakturonáza sa nemusí izolovať v čistom stave. Na enzýmovú hydrolýzu sa môže použiť endo-D-galakturonáza z komerčných preparátov pektolytických enzýmov (Pectinase, Rohament, Pectinex Ultra, Pekticín, Leozym a i.) bežne používaných v konzervárskom priemysle. Jedinou požiadavkou na použitý enzýmový preparát je nízky obsah exo-D-galakturonázy. Ďalšou veľkou prednosťou uvedeného spôsobu je, že hydrolýza prebieha formou jednostupňovej reakcie a pre priebeh reakcie nie je potrebný ďalší substrát alebo koenzým.

Kyselina digalakturónová je látka dôležitá z hľadiska teoretického štúdia enzýmov a pektínových látok a pre charakterizáciu v priemysle používaných pektolytických enzýmov.

Príklad 1

Pri príprave substrátu (kyselinorozpustnej polygalakturónovej kyseliny) pre hydrolýzu sa postupovalo podľa upraveného postupu Mc Creadi Seegmiller: Archiv of Biochim. and Biophys. 50, 440, 1954. 50 g pektínu sa za stáleho miešania pridáva do 2 l 1N kyseliny sírovej. Po rozpustení sa suspenzia zahrieva pri 100 °C 60 minút. Suspenzia sa chladí a v kyseline nerozpustný podiel sa oddelí filtráciou. Supernatant sa zráža 2 litrami etylalkoholu a nechá stáť 24 hodín. Vyzrážaná kyselinorozpustná polygalakturónová kyselina sa oddelí centrifugovaním pri 10 000 g. Supernatant sa zráža štyrmi litrami 96 % etylalkoholu a postup sa opakuje ako v prvom prípade. Obidva podiely vyzrážanej kyselinorozpustnej polygalakturónovej kyseliny sa spoja, dvakrát premyjú 70 % etylalkoholom a nakoniec 1 krát acetónom. Preparát sa voľne vysuší pri laboratórnej teplote alebo sa rozpustí v destilovanej vode a vysuší mrazovou sublimáciou.

Príklad 2

500 mg kyselinorozpustnej polygalakturónovej kyseliny o priemernom polymerizačnom stupni 10, pripravenej podľa príkladu 1, sa postupne za miešania rozpustí v 70 ml octano-

vého tlmivého roztoku ($\text{pH} = 5$). 10 mg enzýmového preparátu (Pektinase) sa rozpustí v 30 ml octanového tlmivého roztoku. Po prefiltrovaní roztoku enzýmu sa obidva roztoky spoja. Enzýmová hydroláza prebieha pri 40°C za miešania alebo trepania 4 až 6 hodín. Priebeh enzýmovej hydrolýzy sa kontroluje chromatograficky. Ak v reakčnom médiu sú prítomné len kyselina digalakturónová a kyselina D-galaktopyranurónová reakcia sa ukončí 20 minútovým varom. Roztok po ochladení sa prefiltruje a supernatant sa vysuší mrazovou sublimáciou. Potom sa na kolónu naplnenú molekulovým sitom (Sephadex G-10) dispergovaným vo vode naniesie 180 mg lyofilizátu a efluent s kyselinou digalakturónovou sa odparí, alebo vysuší mrazovou sublimáciou. Výťažok kyseliny digalakturónovej je až 90 %.

Príklad 3

Postupovalo sa ako v príklade 2 s tým rozdielom, že sa enzýmový preparát (Pektofoedín) rozpustil v acetónovom tlmivom roztoku o $\text{pH} = 4,4$ a enzýmová hydrolýza prebiehala pri teplote 30°C počas 3 až 5 hodín. Výťažok kyseliny digalakturónovej bol až 70 %.

Príklad 4

Kvalitatívne stanovenie kyseliny digalakturónovej sa uskutočnilo chromatografiou na tenkých vrstvách silikagélu na platniach (Silufol) v systéme n-butanol-kyselina mravčičavá (2:3:1) a detekciou anilínftalátom. Kyselina digalakturónová sa identifikovala na základe hodnoty $\log \frac{1-R_f}{R_f}$, ktorá je lineárne závislá od stupňa polymerizácie oligogalakturónových kyselín. Ako referenčná vzorka sa použila kyselina D-galaktopyranurónová. Druhým kritériom čistoty bol pomer obsahu karboxylových skupín k obsahu redukujúcich skupín stanovených podľa Bittera a spo. (Bitter T., Muir H. M. Annal. Biochem. 41, 330, 1962).

Význam vynálezu spočíva v použití kyseliny digalakturónovej na testovanie rôznych enzymatických preparátov používaných v konzervárskom, kožiarskom a textilnom priemysle.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob výroby kyseliny digalakturónovej enzýmovou hydrolýzou vyznačujúci sa tým, že sa na kyselinorozpustnú polygalakturónovú kyselinu pôsobí enzýmom endo-D-galakturonanázou pri teplote 30 až 40°C a pH 4,2 až 5, pričom kyselina digalakturónová sa oddelí chromatograficky na kolóne a efluent sa odparí alebo vysuší mrazovou sublimáciou.