



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

218198

(11)

(B1)

(22) Prihlášené 07 09 81
(21) (PV 6576-81)

(40) Zverejnené 28 05 82

(45) Vydané 15 09 84

(51) Int. Cl.³
C 12 P 19/00

(75)
Autor vynálezu

REXOVÁ-BENKOVÁ LUBOMÍRA RNDr. CSc., OMELKOVÁ JIŘINA
ing. BRATISLAVA, KUBÁNEK VLADIMÍR doc. ing. CSc., KRALUPY
NAD VLTAVOU

(54) Spôsob prípravy kyselín D-galaktopyranurónovej, digalakturónovej
a trigalakturónovej

Vynález sa týka spôsobu prípravy kyselín
D-galaktopyranurónovej, digalakturónovej
a trigalakturónovej.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že sa pek-
tan sodný degraduje za katalytického účin-
ku endopolygalakturonázy ireverzibilné imo-
bilizovanej na polymérnu látku typu poly-
kondenzátu na báze diolov a dikarboxylových
kyselín.

Látky pripravené podľa vynálezu majú po-
užitie pri izolácii a charakterizácii pektolytic-
kých enzýmov.

Vynález sa týka spôsobu selektívnej produkcie kyselín D-galaktopyranurónovej, digalakturónovej a trigalakturónovej enzýmovou hydrolýzou pektanu sodného. Uvedené látky sa používajú pri izolácii a charakterizácii pektolytických enzýmov; kyselina D-galaktopyranurónová ako štandarda pri stanovovaní aktivity polygalakturonáz, kyselina digalakturónová ako substrát exopolygalakturonázy a kyselina trigalakturónová po kovalentnom naviazaní na nerozpustný nosič ako špecifická afinanta pre selektívnu izoláciu endopolygalakturonázy.

Doteraz známe spôsoby získavania týchto látok sa zakladajú na parciálnej hydrolýze kyseliny pektovej uskutočňovanej v kyslom prostredí pri vysokej teplote, alebo za miernejších podmienok v roztokoch obsahujúcich pektolytické enzýmy endopolygalakturonázu a exopolygalakturonázu. Obecnou nevýhodou týchto postupov je, že pri oboch spôsoboch degradácie vzniká zmes oligogalakturónových kyselín so širokým rozpätím stupňa polymeryzácie, v dôsledku čoho sú výťažky uvedených troch sacharidov nízke a ich oddelenie z reakčnej zmesi obtiažne. Produkciu oligogalakturónových kyselín so stupňom polymeryzácie vyšším ako 3 je možné potlačiť ak sa enzýmová degradácia uskutoční endopolygalakturonázou kovalentne imobilizovanou na Sepharózu, celulózu, alebo sklo. Nevýhodou použitia takto imobilizovaných enzýmov je nízka operačná stabilita, súvisiaca s postupným uvoľňovaním enzýmu z nerozpustného nosiča do roztoku, ako aj operačná a materiálová náročnosť prípravy týchto imobilizovaných enzýmových preparátov.

Uvedené nedostatky dosiaľ známeho spôsobu získavania uvedených látok parciálnou hydrolýzou kyseliny pektovej sa odstraňujú postupom podľa vynálezu. Jeho podstatou je, že sa pektan sodný degraduje za katalytického účinku endopolygalakturonázy ireverzibilne imobilizovanej na polymérnu látku typu polykondenzátu na báze diolov a dikarboxylových kyselín, s výhodou na polyetyléntereftalát.

Základný účinok spôsobu prípravy uvedených látok podľa vynálezu spočíva v selektívnej produkcii približne ekvimolárnej zmesi kyselín D-galaktopyranurónovej, digalakturónovej a trigalakturónovej, podmieňujúcej vysoké výťažky a možnosť jednoduchšej separácie týchto látok chromatografiou na vymieňačoch iónov, alebo molekulových sitách. Ďalšou výhodou spôsobu podľa vynálezu je možnosť mnohonásobne opakovaného použitia imobilizovaného enzýmu, kontinuálne ale-

bo diskontinuálne, daného neobyčajne vysokou operačnou stabilitou zakotvenia. Spôsob podľa vynálezu ďalej umožňuje uskutočnenie imobilizácie enzýmu, ako aj degradácie substrátu v jednom operačnom stupni, za rovnakých reakčných podmienok, bez kontaminácie reakčnej zmesi chemikáliami na imobilizáciu.

Spôsob prípravy galakturónových kyselín podľa vynálezu je vysvetlený na nasledujúcich príkladoch jeho prevedenia.

Príklad 1

1 g preparátu imobilizovanej endopolygalakturonázy pripraveného adsorpciou enzýmu na polyetyléntereftalát sa suspenduje v 0,1 M octanovom tlmivom roztoku o pH odpovedajúcom pH optimu použitého enzýmu, najčastejšie 3,8 až 4,6. Suspenzia sa zmieša s roztokom pektanu sodného v rovnakom tlmivom roztoku a zmes sa inkubuje za miešania pri teplote nepresahujúcej 45 °C dovtedy, kým sa štiepia glykozidické väzby substrátu. Po skončení reakcie sa gél imobilizovaného enzýmu oddelí filtráciou alebo centrifugáciou a môže sa použiť k degradácii ďalšej dávky substrátu. V roztoku prítomné produkty degradácie — kyseliny D-galaktopyranurónová, digalakturónová a trigalakturónová sa po zahustení separujú obvyklým spôsobom, napr. chromatografiou na vymieňačoch iónov, alebo na molekulovom site.

Príklad 2

1 g polyetyléntereftalátu sa suspenduje v 0,1 M octanovom tlmivom roztoku o pH odpovedajúcom pH optimu použitej endopolygalakturonázy, najčastejšie pH 3,8 až 4,6 a naplní sa do chromatografickej kolonky. Cez stĺpec gélu sa najskôr prefiltruje roztok obsahujúci endopolygalakturonázu a potom sa ňou nechá pretekať roztok pektanu sodného v tom istom tlmivom roztoku. Efluent z kolonky sa zahustí a produkty enzýmovej degradácie, ktorými sú kyseliny D-galaktopyranurónová, digalakturónová a trigalakturónová sa separuje ako je uvedené v príklade 1.

Výťažky selektívne produkovaných kyselín D-galaktopyranurónovej, digalakturónovej a trigalakturónovej sú závislé na stupni degradácie substrátu, ktorý je daný ako pri kontinuálnom, tak pri diskontinuálnom spôsobe degradácie dĺžkou doby styku pektanu sodného s imobilizovaným enzýmom.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy kyselín D-galaktopyranurónovej, digalakturónovej a trigalakturónovej parciálnou hydrolýzou kyseliny pektovej vyznačujúci sa tým, že sa pektan sodný degraduje za katalytického účinku endopolygalak-

turonázy ireverzibilne imobilizovanej na polymérnu látku typu polykondenzátu na báze diolov a dikarboxylových kyselín, s výhodou na polyetyléntereftalát.