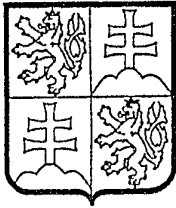


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 275 886

(21) Číslo přihlášky : 8237-87.C

(22) Přihlášeno : 17 11 87

(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 16 07 91

(47) Uděleno : 20 12 91

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18 03 92

(13) Druh dokumentu : B 6

(51) Int. Cl.⁵ :

C 13 K 1/00

C 13 K 3/00

C 12 N 9/26

(73) Majitel patentu : CHEMICKÝ ÚSTAV SAV, BRATISLAVA

(72) Původce vynálezu : BIELY PETER RNDr.CSc., VRŠANSKÁ MÁRIA RNDr.
CSc., ŽITNANSKÝ BOHUMIL RNDr.CSc.,
BRATISLAVA, HUNČÍKOVÁ SOŇA ing., KOHÚT JOZEF
ing., TRENCÍN, ZAVŘELOVÁ MARTA ing., HORNÉ
SRNIE

(54) Název vynálezu : Enzymový preparát na přípravu invertného cukru

(57) Anotace :

Enzymový preparát na přípravu invertného cukru enzymovou hydrolýzou sacharózy. Preparát pozostáva z lyofilizovanej alebo sušenej frakcie bunkových stien kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, ktorá predstavuje odpad pri izolácii rozpustných kvasničných bielkovín pre potravinárske účely po mechanickej dezintegrácii kvasiniek. Aktívnu zložkou preparátu je zvyšok cytoplazmy obsahujúci invertázu o enzymovej aktivite 100 až 4 000 jednotiek invertázy v 1 g lyofilizovaného preparátu. Aktívna zložka umožňuje jednoduchú prípravu invertného cukru vhodného na prípravu krmív pre jarné a jesenné podnecovanie včiel, pre prikrmovanie včiel v bezznáškovom období a v oplodničkoch a na zazimovanie. Krmivá sa dajú kombinovať s ďalšími nutričnými a liečivými preparátmi.

Vynález sa týka enzýmového preparátu na prípravu invertného cukru.

Rieši využitie frakcií bunkových stien získaných po mechanickej dezintegrácii kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* za účelom izolácie rozpustných bielkovín pre humánnu výživu, ako enzýmového preparátu na prípravu invertného cukru hydrolýzou sacharózy a cukrového cesta vhodného na kŕmenie včiel.

V poslednom období sme svedkami zvýšenej starostlivosti o včelstvá, ktorej súčasťou je kŕmenie včiel lacnými sacharidmi. V potrave včiel hrajú najdôležitejšiu úlohu jednoduché šesťuhlíkaté sacharidy, D-glukóza a D-fruktóza, základné stavebné zložky disacharidu sacharózy. Sacharóza je veľmi utilizovaná iba po predošlej hydrolýze na D-glukózu a D-fruktózu, ktorá sa uskutočňuje enzýmom invertázou (EC 3.2.1.26). Invertázu vylučujú včely do prijímanej potravy. Sacharóza sa používa na kŕmenie včiel v čase jarného a jesenného podnecovania, na prikrmovanie v bezznáškovom období a po vytočení medu na zazimovanie.

Najvhodnejšími druhmi krmív sú tie, ktoré majú vláčnu konzistenciu, ako je napr. cukromedové cesto, na prípravu ktorého je potrebný med v množstve zhruba jednej štvrtiny hmotnosti cesta. Vláčne cesto na kŕmenie včiel sa dá pripraviť z práškoveho cukru (sacharózy), ak sa med nahradí invertným cukrom. Invertný cukor sa pripravuje chemickou alebo enzymatickou hydrolýzou sacharózy (Bacílek J. a spol., J. Apic. Res. 19, 187, 1980; Vojakina A. E. a spol., PRI Patent No. 780 901, SU 676 370). Chemická hydrolýza sa katalyzuje organickými alebo anorganickými kyselinami pri zvýšenej teplote, napr. kyselinou mliečnou pri 100 °C. Za určitých prísne kontrolovaných podmienok kyslá hydrolýza sacharózy vedie k uspokojivým výsledkom. Vo väčšine prípadov však chemická hydrolýza vedie k dekompozícii časti sacharidov za tvorby látok, ktoré sú pre včely toxické, napr. 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd (HMF).

K tvorbe toxických látok nedochádza pri enzýmovej hydrolýze sacharózy účinkom invertázy. Ako zdroj invertázy sa najčastejšie používajú pekárenské kvasinky. Invertáza sa v nich nachádza v periplazmatickom priestore pod bunkovou stenou a na efektívnu hydrolýzu sacharózy je potrebné enzým z buniek uvoľniť. Obvyklou technikou prípravy invertného cukru pomocou kvasiniek je zahrievanie zmesi sacharózy a droždí na teploty 60 až 100 °C, čím sa uvoľní invertáza a zvýšením teploty sa rozklad sacharózy značne urýchli. Tento postup je energeticky náročný a vyžaduje prísnu kontrolu teploty a intenzívne miešanie zahrievaných zmesí. Výhodnejšie sú tie postupy, ktoré využívajú homogenáty kvasiniek pripravené mechanicou dezintegráciou buniek, prípadne centrifugáciou vyčírené extrakty buniek. Homogenáty kvasiniek sa vo veľkom meradle pripravujú za účelom izolácie vnútrobunkových bielkovín, ktoré sa dajú použiť v potravinárskom priemysle ako doplnok ľudskej výživy. Väčšina procesov získavania kvasničných homogenátov na prípravu bielkovín pre potravinárske účely je založená na mechanickej dezintegrácii kvasiniek sklenenými alebo kovovými guľôčkami (tzv. balotínou). Bielkoviny sa z homogenátov izolujú po odstránení bunkových stien, napr. centrifugáciou. Frakcia bunkových stien získaná v prevádzkových podmienkach má tekutú konzistenciu v dôsledku prítomnosti vysokého obsahu na invertázu bohatej cytoplazmatickej tekutiny. Takže hladina invertázy v stenovej frakcii nie je oveľa nižšia ako v cytoplazme. Nepremytá frakcia bunkových stien kvasiniek predstavuje takto potenciálny zdroj technickej invertázy, ktorá sa dá využiť na prípravu invertného cukru pre včelárske účely. Invertný cukor sa dá pripraviť vo vysokej koncentrácii, ktorá umožňuje pripravovať cukrové cesto, ktoré včely konzumujú a ktoré vyžaduje od včiel menšiu námahu na spracovanie, než krmivá na báze čistej sacharózy.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že enzýmový preparát invertázy na prípravu invertného cukru pozostáva z frakcie bunkových stien kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, obsahujúcej zvyšok cytoplazmy s invertázou o enzýmovej aktivite 100 až 4 000 jednotiek invertázy v 1 g lyofilizovaného preparátu. Stenová frakcia sa po izolácii, napr. centrifugáciou, buď lyofilizuje alebo suší a v pevnej forme sa uchováva, čím sa vylúči jej mikrobiálna kontaminácia a nároky na uchovávanie v zmrazenom stave. Využitie stenovej frakcie ako

zdroja invertázy na prípravu invertného cukru predstavuje vysoký stupeň zhodnotenia zatiaľ prakticky bezcenného materiálu.

Výhodou použitia vyššie popísanej frakcie nepremytých bunkových stien kvasiniek na prípravu invertného cukru je to, že

- sa jedná o výnimočne lacný zdroj invertázy;
- enzýmový preparát je stabilný v lyofilizovanom alebo suchom stave počas skladovania pri izbovej teplote;
- preparát obsahuje okrem invertázy rad iných bielkovín, ktoré zvyšujú nutričnú hodnotu včelám ponúkaného krmiva na báze invertného cukru;
- prítomnosť bunkových stien v preparáte umožňuje mikroskopickú kontrolu pôvodu invertného cukru, čím sa vylučujú možnosti jeho zneužitia na narúšanie prírodného medu;
- umožňuje viesť prípravu invertného cukru v takých koncentrovaných roztokoch sacharózy, ktoré sú vhodné na prípravu cukrového cesta bez zahusťovania priamym miešaním s práškovým cukrom.

Príklad 1

Suspenzia pekárenských kvasiniek obsahujúca 10 % objemových buniek sa dezintegruje na prietokovom dezintegrátore FRYMA, typ MSM-12 pri prietoku 6 až 7 litrov/hod a 80 % obj. plnení dezintegračného priestoru balotínou o priemere 0,75 až 1 mm pri otáčkach rotora 3 000/min. Vytekajúca zmes sa centrifuguje pri 2 650 g po dobu 30 min a sediment pozostávajúci z bunkových stien a malej časti intaktných kvasiniek sa lyofilizuje. Lyofilizovaný preparát sa použije na prípravu invertného cukru.

Sacharóza 2 kg sa rozpustí v 1,2 l vody, roztok sa okyselí 5 až 10 ml octu na pH 4,5 až 5,0 a pridá sa 5 až 10 g lyofilizovaného preparátu bunkových stien vopred suspendovaných v malom objeme vody. Invertný cukor sa získa po 3 až 5 dňovej inkubácii pri 24 °C a po 2 až 3 dňovej inkubácii pri 37 °C. Tvorba invertného cukru sa sleduje polarimetricky. Príprava invertného cukru sa dá v letných mesiacoch realizovať bez spotreby energie kdekoľvek v teréne. Invertný cukor takto získaný je vhodný na prípravu cukrového cesta na kŕmenie včiel miešaním so 6 až 8 kg práškového cukru.

Príklad 2

Postupuje sa tak ako v príklade 1 s tým rozdielom, že kvasinky sa dezintegrujú balotínou v dezintegrátore (FRYMA (Švajčiarsko), typ MSM - 65) a že miesto 1,2 l vody sa sacharóza rozpustí v 1,8 l vody. Invertný cukor sa v tomto prípade získa po kratšej dobe, po 2 až 4 dňovej inkubácii pri 24 °C a po 1 až 2 dňovej inkubácii pri 37 °C. Roztok invertného cukru je vhodný na kŕmenie včiel v tekutom stave. Pre použitie invertného cukru v potravinárstve je nutné bunkové steny z neho odstrániť filtráciou. Cukrové cesto sa dá z takto vyrobeného invertu pripraviť iba po predošlom zahutnení, najlepšie vo vákuu pri zníženej teplote. Z celkového objemu treba v takom prípade odpariť približne 0,6 l vody.

Účinnosť enzýmového preparátu sa hodnotí stanovením aktivity invertázy polarimetricky meraním zmeny optickej otáčavosti čerstvého 1% roztoku sacharózy v 0,05 M acetátovom pufrí o pH 4,6 pri 30 °C. Na základe zmeny optickej otáčavosti sa počíta množstvo hydrolyzovanej sacharózy. Jednotka aktivity invertázy sa definuje ako také množstvo enzýmu, ktoré katalyzuje za uvedených podmienok hydrolýzu 1 μ mol sacharózy za 1 minútu.

Pripravený enzýmový preparát obsahoval 2 000 až 4 000 jednotiek invertázy na 1 gram lyofilizovaného preparátu. Na prípravu invertného cukru je ovšem možné použiť i enzýmový preparát s oveľa nižšou aktivitou, v podstate od 100 jednotiek invertázy v 1 g lyofilizovaného alebo sušeného preparátu, samozrejme pri veľkom predĺžení doby inkubácie. Preto je ekonomickejšie používať preparát s vyššou enzýmovou aktivitou.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Enzýmový preparát na prípravu invertného cukru hydrolýzou sacharózy, vyznačujúci sa tým, že pozostáva z lyofilizovanej alebo sušenej frakcie nepremytých bunkových stien kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* obsahujúcej časť cytoplazmy s invertázou o enzýmovej aktivite 100 až 4 000 jednotiek invertázy v 1 g lyofilizovaného preparátu, pričom frakcia predstavuje odpad po izolácii rozpustených kvasničných bielkovín pre potravinárske účely po dezintegrácii buniek.