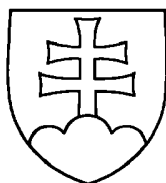


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

807-99

- (22) Dátum podania: 03.12.97
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 96203644.8
(32) Dátum priority: 19.12.96
(33) Krajina priority: EP
(40) Dátum zverejnenia: 13.03.2000
(86) Číslo PCT: PCT/EP97/06957, 03.12.97

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷ :

C 12N 11/02
C 12N 11/10
C 12P 7/64

- (71) Prihlasovateľ: UNILEVER NV, Rotterdam, NL;
- (72) Pôvodca vynálezu: Fabian Jürgen, AT Vlaardingen, NL;
Geurtsen Johan Paul T., AT Vlaardingen, NL;
Grote Martin Roger, AT Vlaardingen, NL;
Van Putte Karel Petrus Agnes Maria, AT Vlaardingen, NL;
Rozendaal Adrianus, AT Vlaardingen, NL;
- (74) Zástupca: Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob imobilizácie enzýmu a použitie imobilizovaného enzýmu**

- (57) Anotácia:
Spôsob imobilizácie enzýmu, zahŕňajúci výrobné kroky: a) selekciu amfifilného enzýmu na imobilizáciu, b) prípravu emulzie, obsahujúcej spojitú hydrofóbnu fázu a dispergovanú vodnú fázu, pričom vodná fáza obsahuje enzým a materiál, ktorý môže slúžiť ako nosič v ďalšom výrobnom kroku: uvedený materiál je čiastočne rozpustený a čiastočne nerozpustený vo vodnej fáze, c) odstraňovanie vody z dispergovanej fázy potiaľ, pokiaľ sa táto fáza nepremení na tuhé častice s povlakom enzýmu. Vhodná vodná fáza sa môže pripraviť zo surovej lipázovej fermentačnej tekutiny, ktorá obsahuje inaktivovanú biomasu, spôsobilú vykonávať úlohu nosiča. Spôsoby, ktoré využívajú imobilizovaný enzým zahŕňajú preesterifikáciu, acidolýzu a deacidifikáciu jedlých triglyceridových olejov. V uvedených spôsoboch je spotreba enzýmu veľmi nízka.

Spôsob imobilizácie enzýmu a použitie imobilizovaného enzýmu

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu imobilizácie enzýmov a použitia týchto imobilizovaných enzýmov na katalýzu pri spracovaní triglyceridových tukov.

Doterajší stav techniky

Enzýmy sa v priemyselnej miere používajú ako katalyzátory pri spracovaní rôznych surových materiálov. Tieto spôsoby spracovania sú cenovo výhodné iba vtedy, ak sa enzýmy môžu opakovane viackrát použiť. Na recirkuláciu enzýmov vo výrobnom procese sa musia enzýmy oddeliť od procesnej tekutiny. Je to uskutočniteľné vtedy, ak enzýmy sú viazané na nosič, ktorý možno oddeliť filtráciou alebo odstredením.

Dôležitá skupina priemyselných enzýmov má amfifilný charakter. Tieto enzýmy sa vyznačujú prítomnosťou hydrofilnej, ako aj hydrofóbnej časti v molekule. Predstaviteľmi tejto skupiny enzýmov sú lipázy a fosfolipázy. Amfifilné enzýmy sú také enzýmy, ktoré – ak sú dispergované v prostredí emulzie vody a oleja – putujú k rozhraniu a zhromažďujú sa na rozhraniach vodnej a olejovej fázy. Túto definíciu amfifilných enzýmov možno v rámci tohto vynálezu považovať za určujúcu. Hydrofóbná časť enzýmu preniká do hydrofóbnej fázy a hydrofilná časť kotví vo vodnej fáze.

Tento vynález sa opíše na prípade lipázy ako najdôležitejšom príklade amfifilného enzýmu. Ďalšie amfifilné enzýmy, ktoré sa priemyselne využívajú sú fosfolipázy; známe sú rôzne druhy fosfolipáz a používajú sa napríklad na hydrolýzu fosfolipidov na lyzofosfolipidy.

Lipázy sa využívajú na základe ich schopnosti meniť štruktúru a zloženie triglyceridových olejov a tukov. Katalyzujú rôzne druhy konverzných pochodov triglyceridov, ako je napríklad hydrolýza, esterifikácia a preesterifikácia (transesterification). Sú to rovnovážne vratné reakcie, ktoré v jednom smere vedú k hydrolýze triglyceridov na voľné masťné kyseliny a glycerol, mono- alebo

diglyceridy, a v druhom smere nastáva preesterifikácia glycerolu, monoglyceridov alebo diglyceridov na triglyceridy. Aby sa rovnováha preesterifikačnej reakcie posunula v smere syntézy triglyceridov je nevyhnutné odstraňovať reakciou vznikajúcu vodu.

Použitie lipázy v podstate bezvodom reakčnom prostredí vyžaduje disperziu lipázy v aktívnom stave v oleji, čo je hlavný problém tohto spôsobu. Na tento účel sa výhodne používa imobilizovaná lipáza; imobilizovaná lipáza je aktívna v oleji, ak olej obsahuje malé množstvo rozpustenej vody, ale neobsahuje dispergovanú vodu.

V súčasnosti hlavný spôsob na výrobu imobilizovanej lipázy zahŕňa najprv mikrobiologickú fermentáciu vhodných mikroorganizmov, ktoré vo vhodných podmienkach produkujú príslušný enzým, potom oddelenie mikroorganizmov a voliteľne čistenie enzýmu. Potom sa roztok pripravenej lipázy pridá k nosiču a enzým sa nechá viazať na povrch nosiča. Tento spôsob imobilizácie sa napríklad opisuje v použití na interesterifikáciu v patente GB 2 159 527. Fixácia enzýmu na nosič umožňuje ľahké oddelenie nevratne imobilizovaného enzýmu z procesného prostredia a následné ďalšie použitie imobilizovaného enzýmu.

Použitý materiál nosiča je vo všeobecnosti pórovitá, časticová, vo vode nerozpustná látka, ktorá má veľký povrch jednotkového objemu materiálu. Príprava imobilizovaných enzýmov sa opisuje napríklad v EP 0 140 542, EP 0 382 767, WO 95/22 606, EP 0 444 092 a WO 89/01 032.

Počas enzymatického spracovania triglyceridov stráca imobilizovaný enzým postupne svoju aktivitu. Musí sa potom často nahrádzať čerstvo pripraveným enzýmom. Spotreba enzýmu tvorí hlavnú časť celkových výrobných nákladov. Ekonomicky by bolo veľmi výhodné, ak by bolo možné výrobnú životnosť používaných enzýmov predĺžiť.

Pri použití bežných nosičových materiálov sa v dôsledku obmedzení v mechanizme prestupu látky ďalej znižuje aktivita lipázy.

Skoršia, ale nezverejnená patentová prihláška WO 97/01 632 autorov tohoto patentu opisuje spôsob imobilizácie enzýmu lacnou a ľahko uskutočniteľnou cestou ako aj spôsob regenerácie a reaktivácie pripravovaného enzýmu, ak je po použití vyčerpaný.

Prvý spôsob zahŕňa výrobné kroky:

- a) výber amfifilného enzýmu, vhodného na imobilizáciu;
- b) príprava emulzie, obsahujúcej spojitú hydrofóbnu fázu a dispergovanú vodnú fázu; vo vodnej fáze je rozpustený enzým a je prítomný materiál, vhodný na to, aby slúžil ako nosič enzýmu v ďalšom výrobnom kroku;
- c) oddelenie vody z dispergovanej fázy natoľko, až sa získajú tuhé častice pokryté enzýmom.

V uvedenej prihláške sa materiál nosiča opisuje ako látka celkom rozpustná vo vodnej fáze. Nie je uvedený nijaký odkaz na nejaký materiál, ktorý by bol vo vodnej fáze nerozpustený.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je spôsob imobilizácie enzýmu, ktorý pozostáva z nasledovných krokov:

- a) výber amfifilného enzýmu, vhodného na imobilizáciu;
 - b) príprava emulzie, obsahujúcej spojitú hydrofóbnu fázu a dispergovanú vodnú fázu; vo vodnej fáze je rozpustený enzým a je prítomná látka, vhodná na to, aby slúžila ako nosič enzýmu v ďalšom kroku;
 - c) oddelenie vody z dispergovanej fázy natoľko, až sa získajú tuhé častice pokryté enzýmom,
- pričom vodná fáza obsahuje navyše nerozpustený materiál.

Tento vynález zahŕňa tiež spôsob, ktorým sa pripravený imobilizovaný enzým využíva.

Východisková emulzia sa výhodne pripravila s obsahom 5 až 15 % hmotnostných, výhodnejšie s 8 až 10 % hmotnostnými vodnej fázy, ktorá je dispergovaná v hydrofóbnnej fáze. Vodná fáza obsahuje amfifilný enzým, ktorý sa má imobilizovať, ďalej rozpustenú a nerozpustenú látku, ktoré môžu slúžiť ako nosič po odparení vody z kvapôčiek vodnej fázy ako sa opisuje v ďalšom texte.

Látka vo vode rozpustená, ktorá má slúžiť ako nosičový materiál sa výhodne vyberie zo skupiny, ktorá zahŕňa cukry ako je sacharóza, laktóza a glukóza, škroby

ako je pšeničná múka, dextrán, vo vode rozpustné deriváty celulózy a fermentačné zvyšky.

Nerozpustená časť nosičového materiálu môže pozostávať z materiálu, ktorý nie je rozpustný ani vo vode ani v oleji. Voliteľne môže pozostávať z materiálu, ktorý samotný je síce rozpustný vo vode, ale v tomto prípade ostáva v nerozpustenej forme, pretože je dispergovaný vo vodnej fáze, ktorá je už nasýtená vo vode rozpustnou látkou. Ak bude kolísať teplota, zákonite sa bude meniť aj rozpustený podiel uvedenej látky.

Materiály, ktoré samotné sú nerozpustné sa vhodne vyberú zo skupiny, ktorá zahŕňa biomasu, obilné zrná a nerozpustné zložky sójových bôbov. Všeobecne to teda sú inertné zrná prírodných alebo syntetických materiálov; zo syntetických materiálov to môžu byť napríklad pórovité polypropylénové častice.

Výraz biomasa zahŕňa inaktivované, vo vode nerozpustné zvyšky mikroorganizmov, použitých vo fermentačných procesoch.

Ak nie je vo vodnej fáze nosičový materiál prítomný, alebo je prítomný v nedostatočnom množstve, môže sa pridať sa do vodnej fázy pred alebo po dispergácii vodnej fázy v spojitej hydrofóbnej fáze.

Množstvo nosičového materiálu sa výhodne vyberie tak, aby sa dosiahol dostatočne veľký povrch nosiča na fixáciu enzýmu. Výhodnejšie sú väčšie častice, nakoľko sa ľahšie oddeľujú, ale majú menší pomer povrchu k hmotnosti ako malé častice. Všeobecne sa použije nosičový materiál v množstve 0,5 až 5 % hmotnostných vzhľadom na olej, výhodne 1 až 2 % hmotnostné.

Výrazom fermentačné zvyšky sa rozumejú všetky látky, ktoré sú prítomné v fermentačnej tekutine po fermentácii a ktoré obsahuje supernatant po odstránení biomasy od fermentačnej tekutiny. Supernatant sa voliteľne môže skoncentrovať, napríklad jeho prechodom filtračným membránovým modulom z dutých filtračných vlákien (taký modul je napríklad známy ako umelá oblička). Fermentačné zvyšky obsahujú polysacharidy, proteínové látky, soli a cukry. Tieto látky sú rozpustené v fermentačnej tekutine, ale možno ich odstránením vody oddeliť ako tuhý časticový materiál. Podľa jedného uskutočnenia tohto vynálezu sa fermentačné zvyšky použijú spolu s niektorou vhodnou biomasou, ktorá plní funkciu nerozpustnej časti nosiča.

Dodatočne možno pridávať ďalšie nerozpustné nosičové materiály. Obsah nerozpustných nosičových materiálov sa môže meniť v širokom rozmedzí, napríklad od 0,001 do 99 % hmotnostných vzhľadom na celkovú hmotnosť nosičového materiálu, výhodne 0,01 až 80 % hmotnostných, výhodnejšie 0,1 až 20 % hmotnostných. Rozmedzie obsahov sa môže meniť v závislosti od materiálu nosiča alebo od kombinácie nosičových materiálov. Vhodné zloženia môže ľahko stanoviť odborník, skúsený v danej oblasti.

Vodná fáza, obsahujúca enzým sa bežnými emulznými technikami disperguje vo forme jemných kvapôčiek do hydrofóbnej fázy. Vzhľadom na svoje vlastnosti amfifilný enzým prechádza do fázových rozhraní medzi vodnou fázou a hydrofóbnou fázou, kde sa zhromažďuje.

Môže sa použiť ktorákoľvek lipáza, vhodná na hydrolyzu triglyceridov alebo na ich preesterifikáciu; výhodná je však lipáza, ktorá sa získa fermentáciou *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa* alebo *Rhizopus niveus*. Prídavok aktívneho enzýmu a jeho aktivita sa prispôbia výrobnému spôsobu, pre ktorý je enzým určený. Vhodná lipázová aktivita môže vo všeobecnosti byť 100 až 1 500 lipázových jednotiek (lipase unit, LU) na gram oleja. Jedna lipázová jednotka (LU) je určená ako také množstvo enzýmu, ktoré uvoľňuje jeden mikromol kyseliny maslovej za minútu z emulgovaného tributyrínového substrátu (pri pH 7,0 a 30 °C).

Hydrofóbnou fázou emulzie môže byť ktorákoľvek tekutina, ktorá má vhodné vlastnosti na potravinárske použitie a v ktorej sa môže dispergovať vodná fáza; výhodná hydrofóbná fáza je jedlý triglyceridový olej; hydrofóbná fáza pôsobí ako substrát enzýmu. Ak hydrofóbná fáza nie je substrátom, treba substrát pridávať osobitne. Imobilizované enzýmové častice sa voliteľne oddelia zo systému, v ktorom boli pripravené a uložia sa na budúce použitie, ktoré zahŕňa pridanie imobilizovaných enzýmových častíc do substrátového oleja. Hydrofóbná fáza výhodne obsahuje zmes triglyceridov; ďalej voliteľne obsahuje diglyceridy, monoglyceridy, glycerol a mastné kyseliny. Ak sa na imobilizáciu použije triglyceridový olej, výhodne sa vyberie taký olej, ktorý je v podstate bez fosfolipidov; v prípade, že sú fosfolipidy prítomné, môžu nepriaznivo vplývať na prípravu častíc s povlakom enzýmov. Je výhodné, ak triglyceridový olej neobsahuje viac ako 100 ppm hydratovateľných fosfolipidov.

Z uvedeného vyplýva, ak je cieľom enzymatického procesu hydrolyza fosfolipidov, potom sa častice imobilizovaných enzýmov musia pripraviť oddelene v prostredí, ktoré neobsahuje fosfolipidy.

Na nevyhnutné odstránenie vody z emulzie sú vhodné bežne používané spôsoby vrátane spôsobov s prídavkom molekulových sít alebo prebublávaním inertného plynu, ako je napríklad dusík. Sušenie sa najlepšie vykoná postupným odparovaním vody, výhodne pri 30 až 35 °C, s použitím vákua, výhodne 10^2 až 10^4 Pa (1 až 100 milibarov), výhodnejšie $3 \cdot 10^2$ až $2 \cdot 10^3$ (3 až 20 milibarov). Voliteľne možno použiť kombináciu uvedených opatrení.

Keď sa obsah vody vo vodnej fáze postupne znižuje, kvapôčky sa zmenšujú a vysychajú. Súčasne sa vylučujú rozpustené látky a vytvára sa tuhý časticový materiál. Enzým, ktorý je spočiatku nazhromaždený na fázovom rozhraní voda/olej sa ukladá a viaže na tuhý časticový materiál, ktorý sa vytvoril zmršťovaním vysychajúcich častíc. V závislosti od množstva enzýmu, dostupného vo vodnej fáze sa častice nosiča celkom, alebo iba čiastočne pokryjú vrstvou enzýmu. Týmto spôsobom vysychania dispergovanej fázy sa pripraví *in situ* imobilizovaný enzým. Pripravený imobilizovaný enzým sa môže ihneď použiť za predpokladu, že jeho substrát je dostupný v hydrofóbnej fáze, alebo sa imobilizovaný enzým môže oddeliť a pridať do substrátového oleja, alebo sa môže uskladniť na neskoršie použitie.

Na začiatku imobilizačného procesu sa vytvára emulzia typu voda v oleji (V/O), obsahujúca lipázu a molekuly glyceridov, ak sú triglyceridy prítomné, začínajú sa hydrolyzovať na mastné kyseliny a diglyceridy, monoglyceridy až glycerol. Hydrolyza pokračuje až sa dosiahne vopred určený stupeň hydrolyzy. Len čo sa však odstráni voda z reakčnej zmesi, enzýmová hydrolyza esterov sa zmení na enzýmový preesterifikačný proces. Sú však známe niektoré lipázy, ktoré nie sú schopné účinne preesterifikovať hydrolyzované glyceridy. Je to zrejme z malého sklonu krivky obsahov mastných kyselín na Obr. 1.

Imobilizačný proces sa výhodne uskutoční pri teplotách 30 až 35 °C.

Imobilizovaná lipáza má zvýšenú teplotnú stálosť, ak pôsobí v nevodnom prostredí, v ktorom chýba dispergovaná voda. Na počiatočný hydrolytický stupeň procesu je však nevyhnutná prítomnosť dostatočného množstva vody, rozpustenej v spracúvanom triglyceridovom oleji. V závislosti od druhu lipázy sú prípustné teploty

pri spracovaní 60 °C alebo ešte aj 70 °C. Pomocou týchto odolných enzýmových systémov možno spracúvať tuhé tuky, dokonca aj také, ktoré majú teploty topenia v oblasti 40 až 60 °C, čo sú teplotné oblasti, ktoré sú nad maximálnymi teplotami použitia väčšiny doterajších vodných lipázových prípravkov.

Imobilizované enzýmy podľa tohto vynálezu sa môžu použiť na násadové spracovanie ako aj na nepretržitý spôsob výroby. Veľkosť tuhých častíc s povlakom enzýmu má byť dostatočná na to, aby umožňovala oddelenie, napríklad odstredením, filtráciou alebo usadzovaním. Vzhľadom na ľahkosť oddeľovania častíc, mali by častice mať veľkosť najmenej 0,1 μm , výhodne najmenej 1 μm a ešte výhodnejšie 5 až 25 μm . Nakoľko sa so zvyšujúcou veľkosťou častíc znižuje povrch dostupný na pokrytie enzýmom (na jednotku hmotnosti častíc), treba voliť vhodné vyváženie medzi povrchom a veľkosťou častíc.

Podľa tohto vynálezu je výhodná najmä skutočnosť, že uskutočnenie vynálezu nevyžaduje čistý enzým. Časovo náročné a nákladné postupy na získanie a čistenie enzýmu z fermentačnej tekutiny sa môžu obísť, ak sa to vyžaduje, pretože napríklad fermentačné zvyšky a biomasa sú vhodné ako nosičové materiály.

Tento vynález ďalej zahŕňa spôsoby, katalyzované imobilizovaným amfifilným enzýmom podľa tohto vynálezu. Medzi takéto spôsoby patria lipázou katalyzované preesterifikácie a tiež acidolýzy, v ktorých triglyceridy reagujú s masnými kyselinami.

Spôsoby preesterifikácie môžu zahŕňať mono-, di-, alebo triglyceridy v ktorých sa katalytickým účinkom lipázy vymieňajú zvyšky masných kyselín na glycerolovej kostre triglyceridových molekúl.

Enzymatická deacidifikácia (odkyselinovanie) triglyceridového oleja zahŕňa katalytický účinok lipázy, pri ktorom sa odstraňujú masné kyseliny esterifikáciou s mono- alebo diglyceridmi, prítomnými v oleji.

Po oddelení z reakčnej násady buď filtráciou, usadzovaním alebo odstredením možno *in situ* imobilizované enzýmy podľa tohto vynálezu znova viackrát použiť.

Pri preesterifikačnom procese sa do násady triglyceridového oleja pridá imobilizovaný lipázový prípravok ako taký. Za predpokladu, že v spracúvanom

triglyceridovom oleji je prítomné dostatočné množstvo vody na počiatočný hydrolytický stupeň netreba pridávať nijakú vodu. Hoci sa v oleji pri teplote okolia rozpúšťa iba asi 0,3 % hmotnostných vody, toto množstvo je dostatočné na hladký priebeh enzymatickej reakcie.

Imobilizovaný enzým sa ekonomicky použije v sériách najmenej dvoch následných, enzýmom katalyzovaných reakciách, pričom v reakčných sériách je zahrnutý najmenej jeden krok regenerácie aktivity enzýmu.

Regeneračný alebo reaktivačný proces môže zahŕňať dispergovanie vody do systému imobilizovaného enzýmu v oleji, čo umožňuje, aby enzým a jeho nosič vstupovali do interakcie s vodou, čoho výsledkom je čiastočné rozpustenie nosičového materiálu; nasleduje odparenie vody z dispergovanej fázy tak, aby sa znova vytvorili častice nosiča s povlakom enzýmu.

Na reaktiváciu sa výhodne pridá 5 až 15 % hmotnostných vodnej fázy, výhodnejšie 8 až 10 % hmotnostných vodnej fázy, ktorá sa disperguje do hydrofóbnej fázy. Rozpustený enzým putuje k fázovému rozhraniu voda/olej, kde sa zhromažďuje. Ako už bolo uvedené, pri odstraňovaní vody sa kvapôčky vysychaním zmršťujú a pôvodne rozpustený nosičový materiál sa opäť vylučuje v tuhej forme. Ďalším únikom vody z vysychajúcich kvapôčiek sa nakoniec enzým opätovne fixuje na nosič.

Použitý enzým na nosiči sa môže voliteľne najprv odstrániť z reakčnej násady, zmiešať s vodnou fázou za tým účelom, aby sa enzým a časť nosiča rozpustili, potom sa vodná fáza disperguje v olejovej fáze a vysuší tak, ako už bolo uvedené.

Voliteľne sa enzým na nosiči po jeho oddelení z reakčného prostredia môže pridať k emulzii V/O, pripravenej na uskutočnenie reaktivačného procesu.

Výsledkom reimobilizácie je obnovenie, prinajmenšom aspoň čiastočné obnovenie aktivity enzýmu. Obnovenie aktivity sa môže vysvetľovať ako stabilizácia aktivity alebo zníženie zvyčajnej a očakávanej inaktivácie.

Reaktivácia reimobilizáciou sa môže opakovať znova a znova a poskytuje dlhodobé použitie enzýmu a nosičovej látky. Obr. 2, 3 a 4 znázorňujú opätovné použitie imobilizovaného lipázového enzýmu pri následnom používaní. Postupné znižovanie aktivity enzýmu v následných preesterifikačných krokoch sa čiastočne

napraví (obrazy 3 a 4) alebo sa prinajmenšom zastaví (obrázok 4) reimmobilizáciou (reimmobilizácia je v obrazoch vyznačená sivými plochami) s použitím toho istého enzýmu a toho istého nosičového materiálu. Znehodnotený alebo v procese spotrebovaný enzým možno voliteľne doplniť pridaním čerstvého enzýmového preparátu.

Aktivita a stálosť imobilizovaného enzýmu môže byť závislá od pH. Hodnota pH sa má nastaviť pred tým, ako sa vykoná (re-)immobilizácia. V závislosti od enzýmu a nosiča možno vhodné hodnoty pH zaznamenať v oblasti pH 5 až 8.

Pokračujúce opätovné používanie materiálov, lacná príprava enzýmu, ktorá vychádza z nečistených foriem enzýmu a nepotrebnosť drahých nosičových materiálov značne zvyšuje ekonomickú výhodnosť inak drahého katalyzátora. Navyše sa znižujú problémy spojené s odpadom a ukladaním upotrebeného enzýmového materiálu. Pre enzýmy imobilizované podľa doterajšieho stavu techniky neboli doteraz opísané hore uvedené výhody, ktoré sú v tejto oblasti jedinečné.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 znázorňuje, ako sa mení obsah vody a obsah voľných mastných kyselín počas uskutočnenia spôsobu s imobilizovaným enzýmom podľa tohto vynálezu.

Obr. 2 znázorňuje aktivitu lipázového enzýmu, imobilizovaného podľa tohto vynálezu počas niekoľkých následných použití, prerušených jedným reimmobilizačným spracovaním (tmavosivá oblasť grafu) po približne 48 hodinách.

Obr. 3 je obdobný ako obr. 2, vzťahuje sa ale na iný nosičový systém, použitý na immobilizáciu.

Obr. 4 je obdobný ako obr. 2, vzťahuje sa však na iný použitý immobilizačný systém; reimmobilizácia sa vykonala dva razy.

Vynález sa ďalej objasňuje nasledujúcimi príkladmi.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Všeobecne

Na sledovanie priebehu (monitorovanie) postupu pochodu v ďalej uvedených príkladoch sa odoberali vzorky v určitých časových intervaloch. Vzorky odobraté z reakčného prostredia sa s použitím ihlice zmiešali s bezvodým síranom sodným, aby sa z oleja odstránila zvyšková voda a potom sa zmes v 2 ml sklennej vzorkovnici zahriala na 85 °C, aby sa deaktivoval enzým.

Obsah voľnej mastnej kyseliny sa stanovoval po rozpustení asi 0,5 g zhomogenizovaného oleja v 50 ml neutrálneho rozpúšťadla, obsahujúceho rovnaké objemy etanolu (96%-ného) a dietyléteru (p.a.); roztok sa titroval odmerným roztokom hydroxidu sodného ($c_{\text{NaOH}} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$) s použitím fenolftaleínu ako indikátora. Obsah voľnej mastnej kyseliny (free fatty acid, FFA) vyplýva z:

$$\% \text{ FFA} = (V \cdot M \cdot 282) \cdot (W \cdot 1000)^{-1} \cdot 100 \%,$$

kde V je spotrebovaný objem titračného činidla (ml); W je hmotnosť analyzovanej vzorky oleja (g); M znamená koncentráciu titračného roztoku NaOH (v mol.dm^{-3}); 282 je typická molekulová hmotnosť mastných kyselín (napríklad kyseliny olejovej).

Aktivita katalyzátora vyplýva z nasledujúcich rovníc:

$$k = -\ln(1 - x) \cdot M \cdot (W \cdot t)^{-1},$$

kde k je aktivita katalyzátora (g oleja na gram katalyzátora za hodinu);

M hmotnosť oleja (g); W je hmotnosť katalyzátora (g enzýmového preparátu);

t je doba reakcie (h); x je stupeň konverzie definovaný ako

$$x = [\sum \text{CN}_t - \sum \text{CN}_i] \cdot [\sum \text{CN}_e - \sum \text{CN}_i]^{-1},$$

kde $\sum \text{CN}$ znamená súčet hodnôt rozmedzia uhlíkových čísel (carbon number, CN), vybraných pre určitý proces a indexy (t, i, e) sa vzťahujú na zloženie v čase (t), na počiatočné zloženie (i) a príslušné rovnovážne zloženie (e). Hodnoty uhlíkových

čísel sa získajú analýzou vzoriek plynovou kvapalinovou chromatografiou (GLC). Na výpočet stupňa konverzie pre preesterifikáciu zmesí SF/MCT sa vyberú hodnoty CN 34 až 46, pre preesterifikáciu zmesi PO/PK hodnoty CN 44 až 46.

Príklad 1

Obr. 1 znázorňuje obsah vody a obsah voľných mastných kyselín v priebehu imobilizácie in situ lipázy, získanej z *Humicola lanuginosa*. Ako nosič sa použil vodný kvasinkový extrakt, obsahujúci približne 0,1 % hmotnostných vo vode nerozpustných látok. Ako spojitá olejová fáza sa použil slnečnicový olej (sunflower, SF). Pretože reakčné prostredie obsahovalo vodu, pripravovali sa mastné kyseliny. Hydrolýza sa zastavila odstránením vody z reakčného systému pomocou vákuu.

V reaktore, vybavenom miešadlom sa miešalo 10 kg vody s 2 kg práškového kvasinkového extraktu (od Ohly, SRN), ktorý slúžil ako nosičový materiál a 1 kg tekutého enzýmového roztoku (od Novo, Dánsko), ktorý bol pripravený z fermentačnej tekutiny z *Humicola lanuginosa* a ktorý obsahoval 100 k NOVO lipázových jednotiek na gram roztoku. Do iného násadového reaktora, vybaveného miešadlom a vodným plášťom sa naplnilo 100 kg slnečnicového oleja (SF) a olej sa zahrial na teplotu 35 °C. Za účinného miešania sa do reaktora pridala zmes enzýmu a nosiča, pričom miešanie muselo zabezpečiť dokonalú homogenizáciu násady. Účinným miešaním sa získala emulzia V/O s jemne rozptýlenými kvapôčkami a s veľkým fázovým rozhraním medzi olejom a vodou.

Hydrolýza triglyceridových molekúl začala po pridaní vodnej fázy a pokračovala pri 35 °C až sa dosiahla 30%-ná úroveň obsahu FFA.

Znížením tlaku na $5 \cdot 10^2$ Pa (5 milibarov) sa voda z reakčnej zmesi odparila, čo spôsobilo, že sa lipáza deponovala a imobilizovala na sušenom nosičovom materiáli. S odstránením vody sa súčasne zastavila produkcia FFA a začala čiastočná preesterifikácia. Obr. 1 znázorňuje podiel voľných mastných kyselín a vody v reakčnom systéme v závislosti od doby reakcie. Odstraňovanie vody pokračovalo, kým sa obsah vody v oleji neznižil pod úroveň rozpustnosti, čo je pod 0,2 %.

Touto prípravou sa získal enzým, imobilizovaný na nosičovom materiále. Tento imobilizovaný enzým sa môže oddeliť od oleja a použiť, alebo opätovne použiť, na preesterifikačné reakcie na výrobu hodnotných jedlých olejov. Olej, ktorý bol použitý na imobilizáciu možno opätovne použiť na rovnaký účel.

Príklad 2

Obr. 2 znázorňuje aktivitu enzýmu (v gramoch premeneného oleja na gram enzýmu za hodinu) ako funkciu doby (hodiny) reakcie lipázy z *Humicola lanuginosa* a využitie enzýmu v následných sériách preesterifikačných násad. Tmavé plochy v grafe označujú *in situ* prípravu alebo reaktiváciu imobilizovaného enzýmu. Teplota *in situ* imobilizačného a reaktivačného pochodu bola 35 °C. Vlastný preesterifikačný proces prebiehal pri 60 °C. Na použitie v nasledujúcom procese sa preparát imobilizovaného enzýmu oddeľoval od oleja odstred'ovaním.

Príprava násady spôsobom imobilizácie *in situ* sa vykoná v podstate tak, ako sa opisuje v príklade 1 a ako je jej priebeh znázornený obrazom 1. V tomto prípade sa ako nosičový materiál (v množstve 1,39 % hmotnostných) použili plné pšeničné otruby, či je prírodný vedľajší produkt spracovania pšenice. Obsahujú okolo 60 % (hmotnostných) vo vode nerozpustných látok čo znamená asi 0,84 % (hmotnostne) tuhého podielu pri spracovaní oleja. Do násadového reaktora, vybaveného miešadlom a vodným plášťom sa nasadila dávka preesterifikačnej zmesi 127,2 g triglyceridov so stredne dlhými reťazcami (medium chain triglycerides, MCT) a 238,95 g slnečnicového oleja (SF). MCT obsahovali masťné kyseliny, z ktorých 95 % hmotnostných boli masťné kyseliny C₈ až C₁₀ a 5 % hmotnostných tvorili ostatné kyseliny.

Vykonal sa preesterifikácia počas reakčnej doby, ktorá bola približne 16 hodín, v niektorých prípadoch 8 hodín.

Obr. 2 zreteľne znázorňuje zmeny priemernej aktivity v násadách počas jednotlivých preesterifikácií SF/MCT zmesi olejov. V tomto prípade medzi násadou Re1 a Re3 (nakol'ko doba procesu bola v obidvoch prípadoch rovnaká, výsledky možno priamo porovnávať) nastala deaktivácia na úrovni poklesu o 36 %.

Regenerácia po treťom preesterifikačnom kroku viedla k iba mierne vyššej aktivite. Bez regenerácie by však nastal jej ďalší pokles.

Príklad 3

Obr. 3 znázorňuje, ako sa využila lipáza, získaná z *Humicola lanuginosa* v následných sériách preesterifikačných násad. Na obraze je znázornená aktivita (gramy premeneného oleja na gram enzýmu za hodinu) ako funkcia času (hodiny). Ako nosičový materiál sa využili deaktivované fermentačné zvyšky a pórovité polypropylénové častice. Tmavosivé plochy v grafe vyznačujú *in situ* prípravu alebo reaktiváciu enzýmového preparátu. Teplota *in situ* imobilizácie a reaktivačného procesu bola 35 °C, pričom preesterifikačný proces prebiehal pri 60 °C. Pred použitím v ďalšom procese sa imobilizovaný enzýmový preparát oddelil od oleja odstredeníím a filtráciou.

Násada na *in situ* imobilizáciu a spôsob imobilizácie sa vykonali v podstate rovnako, ako sa opisuje v príklade 1 a znázorňuje na Obr. 1. Použité nosičové materiály boli 5,1 g deaktivovaných fermentačných zvyškov z fermentácie *Rhizopus niveus*, rozpustené v 30,9 g vody a 1,8 g pórovitých polypropylénových častíc (Accurel®, od spoločnosti Akzo, Holandsko). Do násadového reaktora s miešadlom a vodným plášťom sa na preesterifikáciu nasadila zmes 127,2 g triglyceridov so stredne dlhými reťazcami (MCT) a 238,95 g slnečnicového oleja (SF). MCT obsahoval mastné kyseliny, z ktorých 95 % hmotnostných boli C₈ až C₁₀ mastné kyseliny a 5 % hmotnostných boli iné kyseliny.

Obr. 3 zreteľne znázorňuje zmeny priemernej aktivity enzýmu počas preesterifikácie SF/MCT olejovej zmesi. V tomto prípade počiatočná aktivita enzýmu pri preesterifikácii Re1 klesla z hodnoty 100 % na úroveň 54,7 % pri preesterifikácii Re3. Výsledky možno priamo porovnávať, nakoľko doba reakcia bola rovnaká. Regenerácia po treťom preesterifikačnom stupni zvýšila aktivitu na 73,9 % pôvodnej úrovne aktivity. Bez regenerácie sa očakával ďalší pokles aktivity enzýmu.

Príklad 4

Na obr. 4 je znázornená aktivita enzýmu (gramy premeneného oleja na gram enzýmu za hodinu) ako funkcia doby reakcie (hodiny) pre lipázu, získanú z *Humicola lanuginosa* a použitú v následných preesterifikáciách (Re). Tmavé plochy na grafe poukazujú na *in situ* prípravu alebo reaktiváciu imobilizovaného enzýmu. Teplota *in situ* imobilizácie a reaktivačného procesu bola 35 °C, pričom preesterifikačný proces prebiehal pri 60 °C. Pred použitím v ďalšom procese sa imobilizovaný enzýmový preparát oddelil od oleja odstredením a filtráciou.

Násada na *in situ* imobilizáciu a spôsob imobilizácie sa uskutočnili v podstate rovnako, ako sa opisuje v príklade 1 a znázorňuje na Obr. 1. Katalyzátor sa dispergoval a rozpúšťal vo vodnom roztoku. Na začiatku imobilizácie sa hodnota pH nastavila na 7 a nastavenie sa opakovalo na začiatku druhej regenerácie. Na začiatku prvej regenerácie bolo pH nastavené na hodnotu 6,3. Tentoraz sa ako nosičový materiál použil kvasinkový extrakt, obsahujúci okolo 0,1 % hmotnostného vo vode nerozpustných látok a menej ako 1 % hmotnostné soli.

Do násadového reaktora s miešadlom a vodným plášťom sa na preesterifikáciu nasadila zmes 127,2 g triglyceridov so stredne dlhými reťazcami (MCT) a 238,95 g slnečnicového oleja (SF). MCT obsahoval masťné kyseliny, z ktorých 95 % hmotnostných boli C₈ až C₁₀ masťné kyseliny a 5 % hmotnostných boli iné kyseliny.

Vykonal sa osem preesterifikácií, každá z nich trvala 22 až 23 hodín; u dvoch preesterifikácií bola reakčná doba 73 a 93 hodín (cez víkend). Reaktivácie sa zaradili po preesterifikáciách Re5 a Re9.

Na obr. 4 vidno zreteľne zmeny priemernej aktivity v jednotlivých násadách po jednotlivých preesterifikáciách zmesi SF/MCT olejov. V tomto prípade v preesterifikácii Re1 klesla aktivita z pôvodnej hodnoty 100 % na hodnotu 53 % v preesterifikácii Re5. Nakoľko reakčné doby v týchto preesterifikáciách boli rovnaké, výsledky možno priamo porovnávať. Regenerácia po piatej preesterifikácii spôsobila zvýšenie aktivity na 64 % pôvodnej hodnoty. Bez regenerácie by však nastal ďalší pokles aktivity na úroveň 39 až 47 % podobne, ako sa zaznamenal pokles po preesterifikáciách Re3 a Re4.

V deviatej preesterifikácii klesla enzýmová aktivita na 26,8 % pôvodnej hodnoty, ale regeneráciou sa dosiahlo zvýšenie na 32,7 % počiatočnej hodnoty.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob imobilizácie enzýmu, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa:
 - a) výber lipázového enzýmu na imobilizáciu;
 - b) prípravu emulzie, obsahujúcej spojitú hydrofóbnu fázu a dispergovanú vodnú fázu, pričom vodná fáza obsahuje nerozpuštný materiál, rozpustený enzým a rozpustený materiál, vhodný na to, aby slúžil ako nosič enzýmu v ďalšom kroku;
 - c) odstránenie vody z dispergovanej fázy natoľko, až sa z tejto fázy získajú tuhé častice pokryté enzýmom, pričom hydrofóbná fáza obsahuje látky, ktoré sa majú enzymaticky spracovať, pričom jedna alebo viac z nich sú vybrané zo skupiny, ktorá zahŕňa triglyceridy, diglyceridy, monoglyceridy, glycerol a mastné kyseliny.
2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že lipáza sa získa fermentáciou *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa* alebo *Rhizopus niveus*.
3. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že vodná fáza obsahuje fermentačnú tekutinu.
4. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že hydrofóbná fáza je jedlý triglyceridový olej.
5. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že nosičový rozpustný materiál sa vyberie zo skupiny, ktorá zahŕňa cukry, škrob, dextrán, vo vode rozpustné deriváty celulózy a fermentačné zvyšky.
6. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že nerozpustený nosičový materiál pozostáva buď z materiálu, ktorý nie je rozpustný ani vo vode ani v oleji, alebo z materiálu, ktorý ako taký je rozpustný vo vodnej fáze, ale ktorý je v danom prípade navyše prítomný v nerozpustenej forme vo vodnej fáze, ktorá je už nasýtená už uvedeným, vo vode rozpustným materiálom.

7. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že enzým ako aj nosičová látka, ktoré sa majú rozpustiť vo vodnej fáze pochádzajú z častíc imobilizovaného enzýmu, pripravených podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov a oddelených z reakčnej násady.

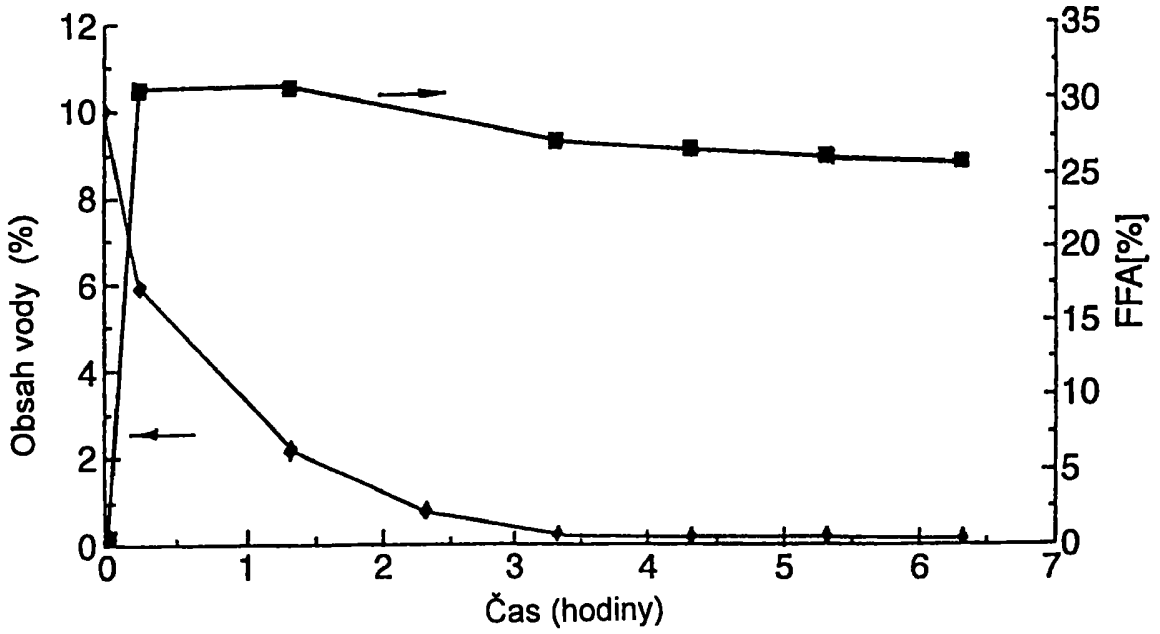
8. Spôsob katalyzovaný enzýmom lipázou, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že enzým je imobilizovaný enzým, pripravený podľa niektorého z nárokov 1 až 7.

9. Použitie imobilizovaného enzýmu, získaného podľa niektorého z nárokov 1 až 7, v sérii najmenej dvoch následných, lipázou katalyzovaných reakcií, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že do série reakcií sa zaradi najmenej raz krok regenerácie aktivity enzýmu, ktorý zahŕňa pridanie vody k imobilizovanému enzýmu, umožnenie, aby enzým a jeho nosič vstúpil do interakcie s vodou, a odparenie vody potom, čo vodná fáza s enzýmom a zdrobneným nosičom bola dispergovaná do olejovej fázy, čím sa znova vytvoria častice nosiča s povlakom enzýmu.

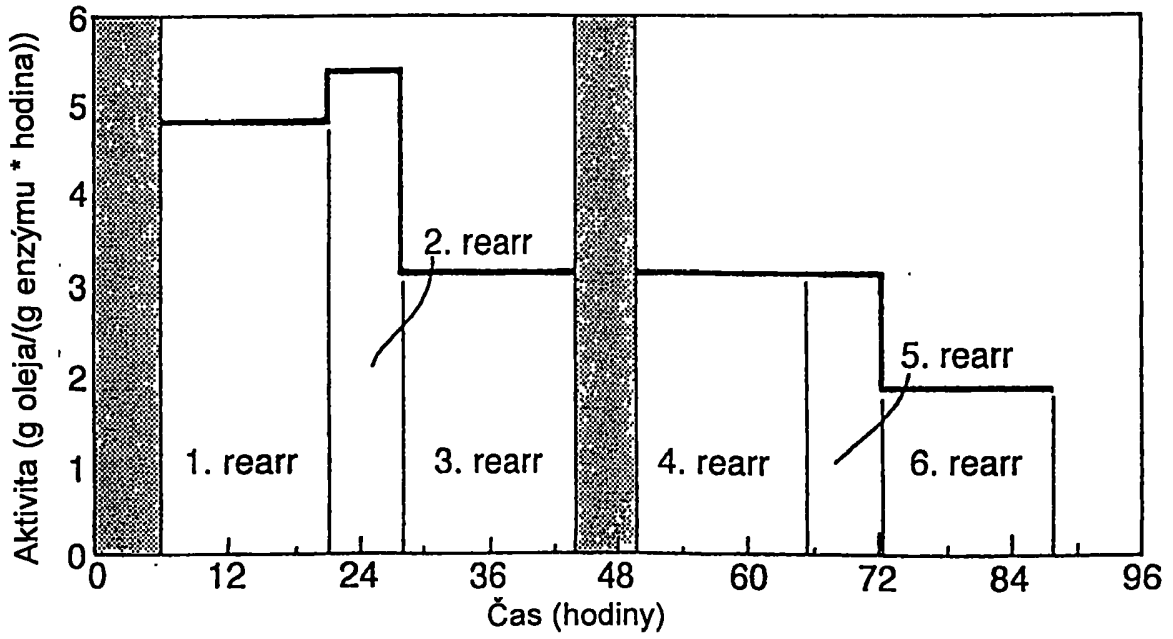
10. Spôsob preesterifikácie mono-, di- alebo troglyceridov, v ktorom sa na glycerolovej uhlíkovej kostre za katalytického účinku lipázy vymenia zvyšky mastných kyselín, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že lipáza je imobilizovaný enzým, získaný podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7.

11. Spôsob enzymatickej deacidifikácie triglyceridového oleja, pri ktorom za katalytického pôsobenia lipázy sa mastné kyseliny esterifikujú mono- alebo diglyceridmi, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že lipáza je enzým, ktorý je schopný reesterifikovať a ktorý je pripravený podľa niektorého z nárokov 1 až 7.

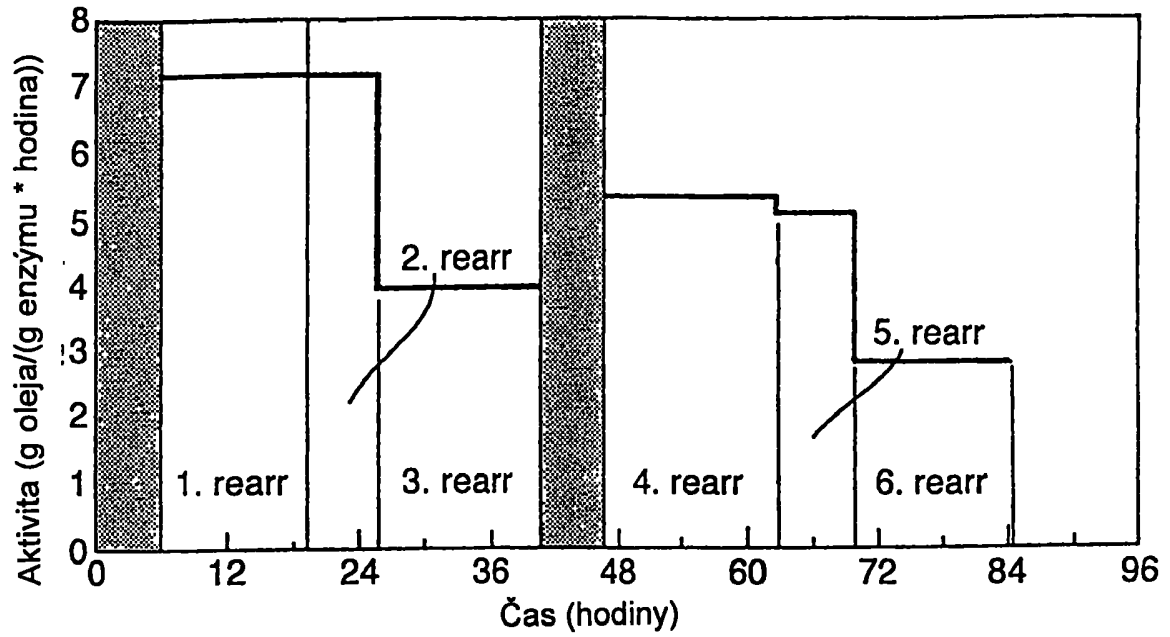
1/2



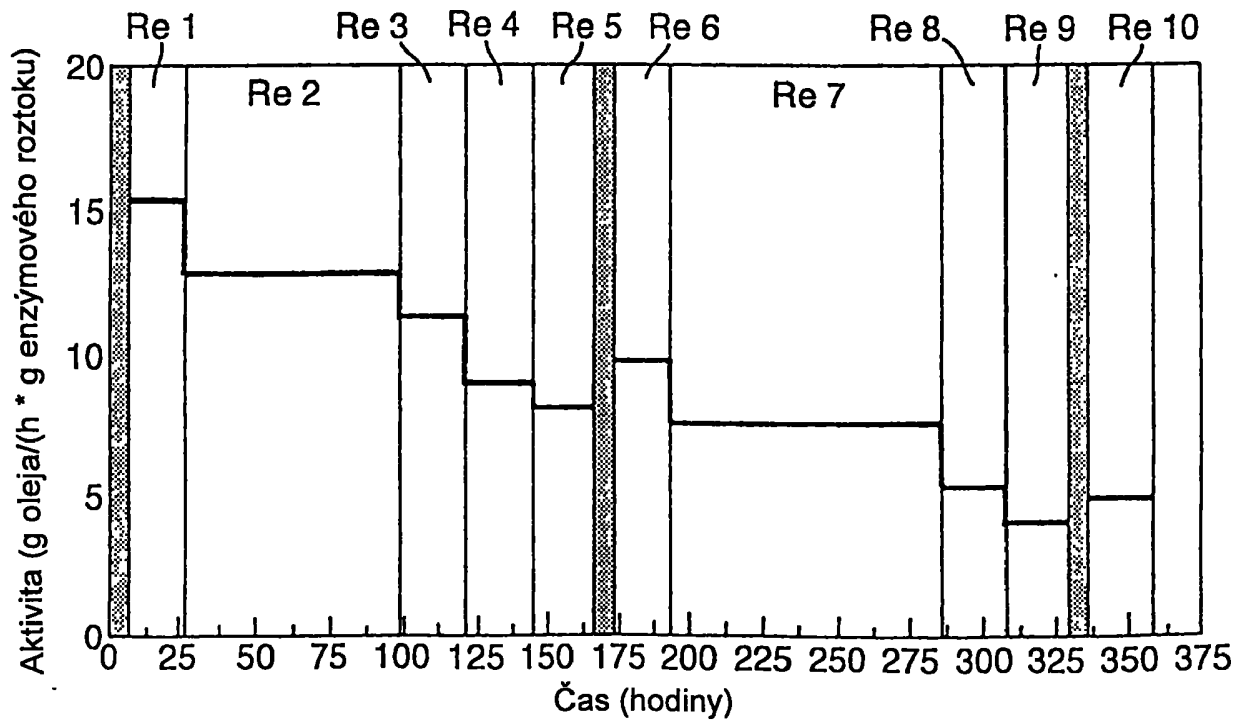
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4