

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

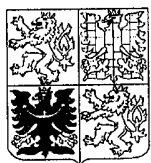
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2218-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03. 12. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.12.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/96203644**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 11. 99**
(Věstník č. 11/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/06957**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/27199**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

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

(71) Přihlášovatel:

UNILEVER N. V., Rotterdam, NL;

(72) Původce:

Fabian Jürgen, Vlaardingen, NL;
Geurtsen Johan Paul T., Vlaardingen, NL;
Grote Martin Roger, Vlaardingen, NL;
van Putte Karel Petrus Agnes Maria,
Vlaardingen, NL;
Rozendaal Adrianus, Vlaardingen, NL;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdenka JUDr., Spálená 29, Praha
1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob imobilizace enzymu

(57) Anotace:

Způsob imobilizace enzymu zahrnující kroky:
a/ volbu amfifilního enzymu pro imobilizaci,
b/ přípravu emulze obsahující spojitou
hydrofobní fázi a dispergovanou vodnou fázi,
ve které je rozpuštěn enzym a materiál vhodný
jako nosič enzymu při provádění dalšího
kroku, c/ odstranění vody z dispergované
fáze, dokud se tato fáze nepřemění na pevné
enzymem potažené částice, kde vodná fáze
navíc obsahuje nerozpuštěný materiál. Vhodná
vodná fáze může být připravena ze surové
fermentační kapaliny lipázy, která obsahuje
inaktivovanou biomasu vhodnou pro použití
jako nosič. Způsoby využívající imobilizova-
ného enzymu zahrnují přeuspořádání enzy-
mů, acidolýzu a odkyselení jedlých triglyceri-
dových olejů. Tyto procesy mají velmi nízkou
spotřebu enzymu.

CZ 2218-99 A3

Způsob imobilizace enzymů

59584

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu imobilizace enzymů a použití imobilizovaných enzymů pro katalýzu zpracování triglyceridových tuků.

Dosavadní stav techniky

Enzymy se v průmyslovém měřítku používají jako katalyzátory pro zpracování různých surovin. Často jsou tyto způsoby cenově výhodné pouze v případě, jestliže lze enzymy mnohokrát opakovaně použít. Pro recirkulaci musí být enzymy odděleny od zpracovávané kapaliny. To je možné, jestliže se enzymy připojí na nosič, který může být filtrován nebo centrifugován.

Důležitá skupina průmyslových enzymů má amfifilní povahu. Tyto enzymy jsou charakterizovány přítomností hydrofilní části a zároveň hydrofobní části v molekule. Příklady této skupiny enzymů jsou lipázy a fosfolipázy. Amfifilní enzymy jsou enzymy, které při dispergování v emulzi oleje a vody budou migrovat a hromadit se na rozhraní vodné fáze a olejové fáze. To je definice amfifilních enzymů v souvislosti předkládaného vynálezu. Hydrofobní část enzymu směřuje do hydrofobní fáze a hydrofilní část směřuje do fáze vodné.

Vynález bude popisován s lipázou jako nejdůležitějším příkladem amfifilního enzymu. Jinými průmyslově použitelnými amfifilními enzymy jsou fosfolipázy, v nichž jsou známy různé typy a které se například používají pro hydrolýzu fosfolipidů na lyzofosfolipidy.

Lipázy se používají pro jejich schopnost modifikovat strukturu a složení triglyceridových olejů a tuků. Katalyzují různé typy konverzí

triglyceridů jako je hydrolýza, esterifikace a transesterifikace. Jde o rovnovážné reakce, které jedním směrem vedou k hydrolýze triglyceridů na mastné kyseliny a glycerol, mono- nebo diglyceridy, a ve druhém směru vedou k reesterifikaci glycerolu, monoglyceridů a diglyceridů na triglyceridy. Pro reesterifikační proces odstraňování vody, která se tvoří v reakčním prostředí, je nutné posunout rovnováhu ve směru syntézy triglyceridů.

Použití lipázy ve v podstatě bezvodém prostředí vyžaduje disperzi lipázy v oleji v aktivní formě, což způsobuje největší problémy. Pro tento účel se používá s výhodou imobilizovaná lipáza, která je aktivní v oleji, který obsahuje malé množství rozpuštěné vody, ale nikoliv vodu dispergovanou.

V současnosti hlavní způsob výroby imobilizované lipázy zahrnuje nejprve mikrobiologickou fermentaci vodného mikroorganismu, který za vhodných podmínek produkuje enzym, oddělení mikroorganismu a popřípadě čištění enzymu. Potom se roztok získané lipázy přidá k nosiči a enzym se ponechá přichytit na povrch nosiče. Tato metoda imobilizace se pro způsob interesterifikace jako příklad uvádí například v GB 2 159 527. Přichycení enzymu na nosič umožňuje snadnou separaci ireverzibilně imobilizovaného enzymu z média pro následující použití.

Použité nosné materiály jsou obecně porézní, ve vodě nerozpustné látky ve vodě částic, které poskytují velké povrchové plochy na jednotkový objem. Příprava imobilizovaných enzymů se popisuje například v EP 0 140 542, EP 0 382 767, WO 95/22606, EP 0 444 092 a WO 89/01032.

Během enzymatického zpracování triglyceridů ztrácí imobilizovaný enzym postupně svou aktivitu. Ta musí být často nahrazována čerstvým enzymovým preparátem. Spotřeba enzymu určuje hlavní část celkových nákladů na zpracování. Pokud by bylo

možné prodloužit životnost enzymu, představovalo by to velkou ekonomickou výhodou.

V obvyklých porézních nosných materiálech dále snižují aktivitu lipázy omezení spojená s přenosem hmoty.

5 Nepředuveřejněná patentová přihláška WO 97/01632 autorů vynálezu popisuje laciný a snadný způsob imobilizace enzymu stejně jako způsob regenerace a reaktivace takového enzymatického preparátu po jeho případném opotřebení při používání. První způsob zahrnuje kroky

- 10 a. volbu amfifilního enzymu pro imobilizaci,
- b. přípravu emulze obsahující spojitou hydrofobní fázi a dispergovanou vodnou fázi, ve které je rozpuštěn enzym a materiál vhodný jako nosič enzymu při provádění dalšího kroku,
- 15 c. odstranění vody z dispergované fáze, dokud se tato fáze nepřemění na pevné enzymem potažené částice.

V uvedené přihlášce se nosný materiál popisuje jako materiál úplně rozpustný ve vodné fázi. Žádným způsobem se nehovoří o materiálu ve vodné fázi, který je nerozpustný.

20

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje způsob zahrnující kroky

- a. volbu amfifilního enzymu pro imobilizaci,
- b. přípravu emulze obsahující spojitou hydrofobní fázi a dispergovanou vodnou fázi, ve které je rozpuštěn enzym a materiál vhodný jako nosič enzymu při provádění dalšího kroku,
- 25

- c. odstranění vody z dispergované fáze, dokud se tato fáze nepřemění na pevné enzymem potažené částice, kde vodná fáze navíc obsahuje nerozpuštěný materiál.

Vynález také poskytuje způsoby, kterými se získaný
5 imobilizovaný enzym používá.

Výchozí emulze se připravuje s výhodou s 5 až 15 % hmotnostními, výhodněji 8 až 10 % hmotnostními vodné fáze, která se disperguje v hydrofobní fázi. Vodná fáze by měla obsahovat amfifilní enzym pro imobilizaci, a dále jak rozpuštěný, tak i nerozpuštěný
10 materiál, přičemž oba tyto materiály mohou působit jako nosič po odpaření vody z kapiček vodné fáze, jak bude popsáno dále.

Ve vodě rozpustný nosný materiál se s výhodou volí ze skupiny cukrů jako je sacharóza, laktóza a glukóza, škrobů jako je pšeničná mouka, dextranu, ve vodě rozpustných derivátů celulózy
15 a fermentačních zbytků.

Nerozpuštěná část nosného materiálu se může skládat z materiálu, který není rozpustný ani ve vodě, ani v oleji. Alternativně se může skládat z materiálu, který je jako takový rozpustný ve vodné fázi, ale který je v popisovaném případě přítomen v nerozpustné
20 formě, protože je dispergován ve vodné fázi, která je již tímto ve vodě rozpustným materiálem nasycena. V důsledku toho při kolísání teploty také bude kolísat rozpuštěné množství takového materiálu.

Materiály, které nejsou jako takové rozpustné, se vhodně volí ze skupiny biomasy, cereální drti a nerozpustných složek soji. Je možno
25 také obecně použít inertní drti přírodního nebo syntetického materiálu, jako jsou porézní polypropylenové částice.

Rozumí se, že biomasa obsahuje inaktivované ve vodě rozpustné zbytky mikroorganismů použitých při fermentaci.

Pokud není nosný materiál přítomen ve vodné fázi nebo pokud je přítomen v nedostatečném množství, přidává se do vodné fáze před nebo po dispergaci vodné fáze do hydrofobní spojité fáze.

Množství nosného materiálu se s výhodou volí tak, aby bylo pro
5 enzym k dispozici dostatečné množství nosné plochy pro přichycení. Větší částice jsou výhodnější pro snadnější separaci, ale mají menší poměr povrch/hmotnost než malé částice. Nosný materiál se obecně používá v množství 0,5 až 5 % hmotnostních vzhledem k oleji, s výhodou 1 až 2 % hmotnostních.

10 Rozumí se, že fermentační zbytky jsou všechny látky, které zbývají ve fermentační kapalině po fermentaci, a které jsou obsaženy v supernatantu po oddělení ve vodě nerozpustné biomasy z fermentační kapaliny. Tento supernatant se případně koncentruje, například průchodem přes mikrofiltrační membránový modul z dutých
15 vláken s příčným tokem (známý jako umělá ledvina). Fermentační zbytky obsahují polysacharidy, proteinový materiál, soli a cukry. Tyto látky jsou rozpuštěny ve vodné fermentační kapalině, ale budou se oddělovat jako pevný materiál ve formě částic, jestliže se voda odstraní. Podle konkrétního provedení se fermentační zbytky používají
20 spolu s jakoukoliv vhodnou biomasou, která bude působit jako nerozpustná část nosiče. Další nerozpustný nosný materiál může být přidán dodatečně.

Obsah nerozpustného nosného materiálu může kolísat v širokých mezích, například od 0,001 do 99 % hmotnostních
25 celkového nosného materiálu, s výhodou 0,01 až 80 % hmotnostních a výhodněji 0,1 až 20 % hmotnostních. Rozsah může kolísat v závislosti na nosném materiálu nebo kombinaci nosných materiálů. Vhodné směsi může snadno sestavit odborník v oboru.

Vodná fáze obsahující enzym se disperguje ve formě jemných
30 kapiček v hydrofobní fázi obvyklými emulgačními technikami. Podle

povahy amfifilní enzym migruje a hromadí se na rozhraní vodné fáze a hydrofobní fáze.

Může být použita jakákoliv lipáza vhodná pro hydrolýzu nebo reesterifikaci triglyceridů, ale s výhodou se používá lipáza získaná fermentací z *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa* nebo *Rhizopus niveus*. Množství přidané enzymatické aktivity je upraveno podle konkrétního postupu, pro který se bude používat. Obecně je vhodná aktivita lipázy 100 až 1500 lipázových jednotek (LU) na gram oleje. Jedna lipázová jednotka se definuje jako množství enzymu, který uvolní jeden mikromol kyseliny máselné za minutu z emulgovaného tributyrinového substrátu (při pH 7,0 a teplotě 30 °C).

Hydrofobní fáze emulze může být jakákoliv potravinářská tekutina, ve které může být vodná fáze dispergována, kterou je s výhodou jedlý triglyceridový olej, a která se chová jako substrát enzymu. Jestliže hydrofobní fáze není substrát, měl by být přidán odděleně. Alternativně se imobilizované částice enzymu oddělují ze systému, ve kterém byly připraveny, a shromažďují se pro pozdější použití, kterým je přídavek k olejovému substrátu. Hydrofobní fáze se s výhodou skládá ze směsi triglyceridů, která případně dále obsahuje diglyceridy, monoglyceridy, glycerol a mastné kyseliny.

Jestliže se pro imobilizace použije triglyceridový olej, s výhodou se volí olej, který v podstatě neobsahuje fosfolipidy, jinak mohou fosfolipidy nepříznivě interferovat s tvorbou částic potažených enzymem. Triglyceridový olej s výhodou neobsahuje více než 100 ppm hydratovatelných fosfolipidů. Jestliže je cílem enzymatického procesu hydrolýza fosfolipidů, musí být imobilizované částice enzymů připraveny v odděleném systému, který fosfolipidy neobsahuje.

Pro nezbytné odstranění vody z emulze jsou k dispozici běžné standardní způsoby včetně přidávání molekulových sít a probublávání inertního plynu jako je dusík skrz emulzi. Sušení se nejlépe provádí postupným odpařováním vody, s výhodou při 30 °C až 35 °C použitím

vakua s výhodou 100 Pa až 10 kPa, výhodněji 300 Pa až 2000 Pa. Je možné případně použít kombinaci těchto způsobů.

Jak se voda postupně odstraňuje z dispergované vodné fáze, kapičky se smršťují a vysoušejí se. Současně se bude rozpuštěný materiál oddělovat jako pevná látka ve formě částic. Enzym, který se na počátku hromadí na rozhraní voda/olej, se bude případně ukládat na pevný materiál ve formě částic, který se vytvořil při smršťování vysušené kapičky, a bude se na něj navazovat. V závislosti na množství enzymu dostupného ve vodné fázi budou částice nosiče úplně nebo částečně potaženy vrstvou enzymu. Tímto způsobem poskytne sušení dispergované fáze imobilizovaný enzymatický preparát. Enzym může být po imobilizaci použit okamžitě za předpokladu, že jeho substrát bude dostupný hydrofobní fázi nebo může být imobilizovaný enzym oddělen a přidán k oleji - substrátu nebo může být uchován pro pozdější použití.

Na začátku imobilizačního postupu se vytvoří emulze voda/olej obsahující lipázu, a pokud jsou přítomny molekuly glyceridů, začnou se hydrolyzovat na mastné kyseliny a diglyceridy, monoglyceridy a glycerol. Hydrolýza pokračuje, dokud se nedosáhne předem zvolené úrovně. Jakmile se však ze zpracovávané směsi odstraní voda, enzymatická hydrolýza esterů se převrátí na proces enzymatické reesterifikace. Některé lipázy však nejsou schopny hydrolyzované glyceridy účinně reesterifikovat. To je zřejmé ze zvolna klesající hladiny mastných kyselin (viz obr. 1).

Imobilizace se s výhodou provádí při teplotě 30 °C až 35 °C. Imobilizovaná lipáza má zvýšenou teplotní stabilitu za předpokladu, že enzym působí v nevodném prostředí, které neobsahuje žádnou dispergovanou vodu. Voda rozpuštěná ve zpracovávaném triglyceridovém oleji by však měla dostačovat pro počáteční krok hydrolýzy. V závislosti na typu lipázy jsou dovoleny pracovní teploty 60 °C nebo dokonce 70 °C. S takovými odolnými enzymatickými

systémy je možné zpracovávat tuhé tuky, i když mají teploty tání v rozmezí 40 až 60 °C, což je za hranicí maximální pracovní teploty většiny vodných lipázových preparátů.

5 Imobilizované enzymy podle vynálezu mohou být používány při vsádkovém postupu stejně jako kontinuálním způsobu zpracování. Velikost pevných částic potažených enzymem by měla být dostatečně velká pro umožnění separace, například centrifugací, filtrací nebo dekantováním. Pro snadné provádění separace je velikost alespoň 0,1 μm , s výhodou alespoň 1 μm a výhodněji 5 až 25 μm . Protože se 10 vzrůstající velikostí se povrch dostupný pro přichycení enzymu (na jednotku hmotnosti) zmenšuje, je nutno zachovat správnou rovnováhu.

Zvláštní výhodou předkládaného vynálezu je to, že vynález nepotřebuje čistý enzym. V případě potřeby je možno vynechat časově náročné a drahé postupy získávání a čištění enzymu ze surové 15 fermentační kapaliny, jestliže například fermentační zbytky a biomasa poskytují vhodné nosné materiály.

Vynález dále zahrnuje způsoby katalyzované imobilizovaným amfifilním enzymem podle vynálezu. K těmto způsobům patří lipázou katalyzované přeuspořádání esterů a také acidolýza, při které 20 triglyceridy reagují s mastnými kyselinami.

Přeuspořádání esterů se může týkat mono-, di- nebo triglyceridů, u kterých se za katalytického působení lipázy vyměňují skupiny mastných kyselin na glycerolových kostrách triglyceridových molekul.

25 Enzymatické odkyselení triglyceridového oleje zahrnuje katalytické působení lipázy, kde se mastné kyseliny odstraňují esterifikací s mono- nebo diglyceridy, které jsou také přítomny v oleji.

Jestliže se enzymy imobilizované in situ podle vynálezu oddělí z reakčního prostředí buď filtrací, dekantací nebo centrifugací, mohou 30 být mnohokrát opakovaně použity.

Pro způsob přeuspořádání se preparát imobilizované lipázy přidává jako takový ke vsádce triglyceridového oleje. Není nutno přidávat žádnou vodu za předpokladu, že je dostatečné množství vody pro počáteční krok hydrolýzy přítomno v rozpuštěné formě ve
 5 zpracovávaném triglyceridovém oleji. Ačkoliv se při pokojových teplotách rozpouští v oleji pouze 0,3 % hmotnostních vody, dostačuje to pro hladký průběh enzymatické reakce.

Imobilizovaný enzym se ekonomicky používá pro řadu alespoň dvou následných enzymaticky katalyzovaných reakcí, kde v řadě
 10 reakcí je zahrnut alespoň jeden krok regenerace enzymatické aktivity.

Taková regenerace nebo reaktivace se může provádět dispergací vody do systému imobilizovaný enzym v oleji, ponecháním enzymu a jeho nosiče interagovat s vodou za částečného rozpuštění nosného materiálu a potom odpařením vody z dispergované fáze
 15 takovým způsobem, že se opět vytvoří enzymem pokryté částice nosiče.

Pro uvedenou reaktivaci se přidává s výhodou 5 až 15 % hmotnostních, výhodněji 8 až 10 % hmotnostních vodné fáze, která se disperguje do hydrofobní fáze. Rozpuštěný enzym migruje do rozhraní
 20 voda/olej a hromadí se v něm. Když se voda odstraní jak bylo popsáno výše, kapičky se vysycháním smrští a rozpuštěný nosný materiál se opět oddělí jako pevná látka. Pokud voda postupně odchází ze sušených kapiček, enzym nakonec opět přilne k nosiči.

Alternativně se nejprve použitý enzym na nosiči oddělí
 25 z reakčního prostředí, smísí se s vodnou fází, přičemž se enzym a část nosiče rozpustí a získaná vodná fáze se potom disperguje v olejové fázi a suší se jak bylo popsáno výše.

Enzym na nosiči se případně po oddělení přidá k hotové emulzi voda/olej pro reaktivační působení.

Opakovaná imobilizace vede k obnovení, alespoň částečnému, enzymatické aktivity. Vliv obnovení může být zaznamenán jako stabilizace aktivity nebo snížení obvyklé a očekávané inaktivace.

Reaktivace novou imobilizací může být znovu a znovu opakována a poskytuje možnost prodlouženého použití enzymu a nosného materiálu. Obrázky 2, 3 a 4 ukazují opětné použití imobilizovaného enzymu lipázy v za sebou následujících vsádkách. Postupné snižování enzymatické aktivity při následných krocích přeuspořádání se částečně zlepší (obr. 3 a 4) nebo alespoň zastaví (obr. 2) použitím opětné imobilizace (vyznačeno tmavě stínovanými oblastmi) použitím stejného enzymu a stejného nosného materiálu. Enzym poškozený nebo spotřebovaný při procesu je možno kompenzovat přidávkem určitého množství čerstvého enzymatického preparátu.

Aktivita a stabilita imobilizovaného enzymu může být závislá na pH. pH by mělo být před provedením (opětné) imobilizace nastaveno. Vhodné hodnoty pH mohou být v rozmezí 5 až 8 v závislosti na enzymu a nosiči.

Budoucí opakované použití materiálů, laciná příprava enzymu z nepurifikované formy a nepřítomnost nákladného nosného materiálu ve velké míře snižuje náklady na drahý katalyzátor. Navíc se snižují problémy spojené s ukládáním vypotřebovaného enzymatického materiálu do odpadu. Tyto výhodné rysy jsou jedinečné a nejsou popsány pro enzymy imobilizované způsoby podle dosavadního stavu techniky.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 ukazuje, jak se během imobilizace enzymu in situ podle předkládaného vynálezu mění obsah vody a obsah volných mastných kyselin.

Obr. 2 ukazuje aktivitu enzymu lipázy imobilizovaného podle vynálezu v průběhu několika následujících procesů přeuspořádání přerušovaných jedním krokem opětne imobilizace (tmavě stínovaná oblast) po přibližně 48 hodinách.

5 Obr. 3 viz obr. 2, ale s použitím odlišného nosného systému pro imobilizaci.

Obr. 4 viz obr. 2, ale s použitím odlišného nosného systému pro imobilizaci.

Byly použity dvě opětne imobilizace.

10

Vynález bude ilustrován následujícími příklady:

Příklady provedení vynálezu

15 Pro monitorování postupujícího způsobu podle následujících příkladů byly v časových intervalech odebírány vzorky oleje. Vzorky odebrané z reakčního média jehlou byly smíseny s bezvodým síranem sodným pro odstranění zbývající vody z oleje a potom zahřáty na teplotu vyšší než 85 °C ve 2 ml skleněných zkumavkách pro deaktivaci enzymů.

20 Obsah volných mastných kyselin byl stanoven rozpuštěním přibližně 0,5 g homogenizovaného oleje v 50 ml neutrálního rozpouštědla obsahujícího stejné objemy ethanolu (96 %) a diethyletheru (p.a.) a titrací směsí roztokem hydroxidu sodného 0,1 mol/l s použitím fenolftaleinu jako indikátoru. Obsah volných
25 mastných kyselin (free fatty acid. FFA) se vypočte podle následující rovnice:

$$\% \text{ FFA} = \frac{V \cdot M \cdot 282}{W \cdot 1000} \cdot 100 \%$$

kde: V = titrovaný objem (ml)

W = hmotnost vzorku oleje (g)

M = molarita roztoku NaOH

5 282 = typická molekulová hmotnost mastných kyselin
(v kyselině olejové)

Aktivita katalyzátoru se vypočte z následujících rovnic:

10
$$k = -\ln(1 - x) \cdot M/W \cdot t$$

kde: k = aktivita katalyzátoru (g oleje/g katalyzátoru za
hod)

M = hmotnost oleje (g)

15 W = hmotnost katalyzátoru (g enzymatického
preparátu)

t = čas (hod)

x = stupeň konverze definovaný jako

20
$$x = \frac{\sum CN_t - \sum CN_i}{\sum CN_e - \sum CN_i}$$

$\sum CN$ znamená součet hodnot rozmezí počtů uhlíků zvolených
pro specifický proces, kde indexy (t, i, e) se vztahují k prostředí
25 v jakémkoli časovém okamžiku (t), k počáteční směsi (i) a
k rovnovážné směsi (e). Hodnoty počtů uhlíků se získávají analýzou
vzorků plynovou kapalinovou chromatografií (GLC). Pro přeuspořádání
směsi SF/MCT se volí pro výpočet stupně přeměny hodnoty CN 34 -
46 a pro přeuspořádání směsi PO/PK se volí hodnoty CN 44 - 46.

Příklad 1

Obr. 1 ukazuje obsah vody a volných mastných kyselin v průběhu imobilizace lipázy získané z *Humicola lanuginosa* in situ. Jako nosný materiál byl použit vodný kvasničný extrakt obsahující
5 přibližně 0,1 % hmotnostních ve vodě nerozpustného materiálu a jako spojitá olejová fáze byl použit slunečnicový olej (SF). Volné mastné kyseliny byly produkovány pro obsah vody ve zpracovávaném prostředí. Hydrolýza se zastavila, když byla použitím vakua ze systému odstraněna voda.

10 V reaktoru opatřeném míchadlem bylo smícháno 10 kg vody s 2 kg práškového kvasničného extraktu (firmy OHLY, Německo), který sloužil jako nosný materiál, a 1 kg kapalného roztoku enzymu (firma NOVO, Dánsko), který byl vyroben z fermentační kapaliny *Humicola lanuginosa* a který obsahoval 100 k lipázových jednotek NOVO na
15 gram roztoku. Oddělený vsádkový reaktor opatřený míchadlem a vodním pláštěm byl naplněn 100 kg slunečnicového oleje (SF) a zahřát na teplotu 35 °C. Směs enzym - nosič byla vložena do oleje po důkladném míchání pro zajištění homogenního stavu. Důkladné míchání poskytlo emulzi voda/olej s jemně rozptýlenými kapičkami
20 vody a velkým rozhraním oleje a vody.

Hydrolýza triglyceridových molekul začala po přidavku vodné fáze a pokračovala při 35 °C až do dosažení hladiny 30 % FFA.

Snížením tlaku na 500 Pa byla odpařena voda, což způsobilo uložení a imobilizaci lipázy na usušený nosný materiál. Spolu
25 s odstraněním vody se zastaví tvorba FFA a začala částečná reesterifikace. Obr. 1 ukazuje procento volných mastných kyselin a vody přítomných v systému v průběhu času. Odstraňování vody pokračovalo, dokud obsah vody v oleji nepoklesl pod mez rozpustnosti, která byla nižší než 0,2 %.

30 Tento postup poskytl enzym, který byl imobilizován na nosném materiálu. Uvedený imobilizovaný enzym může být z oleje oddělen

a použit nebo znovu použit pro reakce přeuspořádání pro výrobu cenných jedlých olejů. Olej použitý pro imobilizaci může být opakovaně použit ke stejnému účelu.

5 Příklad 2

Obr. 2 ukazuje enzymatickou aktivitu (gramy přeměněného oleje na gram enzymu za hodinu) jako funkci času (hodiny) pro lipázu získanou z *Humicola lanuginosa* a použitou v za sebou následující řadě přeuspořádání ve vsádkovém provedení. Tmavě stínované oblasti
10 v grafu označují přípravu in situ, popřípadě opětnou aktivaci imobilizovaného enzymu. Teploty imobilizace in situ a postupu opětné aktivace byly 35 °C. Samotný proces přeuspořádání probíhal při 60 °C. Imobilizovaný enzymatický preparát byl z oleje oddělen centrifugací pro použití při následujícím postupu.

15 Příprava šarže pro imobilizaci in situ byla prováděna v podstatě stejně jak bylo popsáno v příkladu 1 a jak je ilustrováno na obr. 1. Tentokrát byly jako nosný materiál použity (1,39 % hmotnostních) celé pšeničné otruby, které jsou přírodním vedlejším produktem zpracování pšeničného zrna. Obsahují přibližně 60 % hmotnostních ve vodě
20 nerozpustného materiálu, který poskytuje ve zpracovávaném oleji 0,84 % hmotnostních pevných látek. Vsádkový reaktor opatřený míchadlem a vodním pláštěm byl naplněn směsí pro přeuspořádání složenou ze 127,2 g triglyceridů se střední délkou řetězce (MCT) a 238,95 g slunečnicového oleje (SF). 95 % hmotnostních mastných
25 kyseliny materiálu MCT tvořily C₈-C₁₀ mastné kyseliny a 5 % hmotnostních jiných kyselin. Za sebou následující postupy přeuspořádání byly prováděny s reakčními dobami, z nichž některé byly přibližně 16 hodin (přes noc) a některé 8 hodin.

Obr. 2 jasně ukazuje změnu průměrné aktivity na šarži
30 v průběhu různých kroků přeuspořádání olejové směsi SF/MCT. V tomto konkrétním případě je deaktivace mezi přeuspořádáním Re1

a Re3 (je umožněno přímé porovnání, protože je stejná doba trvání procesu) 36 %. Regenerace po třetím kroku přeuspořádání vedla k pouze mírně vyšší aktivitě. Bez regenerace však došlo k dalšímu poklesu aktivity.

5

Příklad 3

Obr. 3 ukazuje, jak byla použita imobilizovaná lipáza získaná z *Humicola lanuginosa* v za sebou následující řadě šarží přeuspořádání. Aktivita (gram přeměněného oleje na gram enzymu za 10 hodinu) je ukázána jako funkce času (hodiny). Jako nosných materiálů bylo použito deaktivovaných fermentačních zbytků a porézních polypropylenových částic. Tmavě stínované oblasti v grafu ukazují přípravu in situ, popřípadě opětovnou aktivaci enzymatického preparátu. Teplota imobilizace in situ a postupu opětovné aktivace byla 35 °C, 15 zatímco přeuspořádání probíhalo při 60 °C. Před použitím v následujícím procesu byl enzymatický preparát z oleje oddělen centrifugací a filtrací.

Pro imobilizaci in situ byla připravena šarže a bylo použito stejného postupu jak se popisuje v příkladu 1 a jak je ilustrováno na 20 obr. 1. Použitými nosnými materiály bylo 5,1 g deaktivovaných fermentačních zbytků z *Rhizopus niveus* rozpuštěných ve 30,9 g vody a 1,8 g porézních polypropylenových částic (Accurel™, firma AKZO, Holandsko). Vsádkový reaktor opatřený míchadlem a vodním pláštěm byl naplněn směsí 127,2 g triglyceridů se střední délkou řetězce (MCT) 25 a 238,95 g slunečnicového oleje (SF) pro přeuspořádání. 95 % mastných kyselin MCT tvořily C₈-C₁₀ mastné kyseliny a 5 % tvořily jiné kyseliny.

Obr. 3 jasně ukazuje změnu průměrné enzymatické aktivity s časem v průběhu přeuspořádání směsi olejů SF/MCT. V tomto 30 konkrétním případě poklesla počáteční aktivita enzymů při přeuspořádání Re1 z hodnoty 100 % na hodnotu 54,7 %

u přeuspořádání Re3. Přímé porovnání je umožněno, protože procesy trvají stejnou dobu. Regenerace po třetím kroku přeuspořádání vedla ke zvýšení aktivity na 73,9 % počáteční úrovně. Bez regenerace byl očekáván další pokles aktivity proti počáteční úrovni.

5

Příklad 4

Obr. 4 ukazuje enzymatickou aktivitu (gram přeměněného oleje na gram enzymu za hodinu) jako funkci času (hodiny) pro lipázu získanou z *Humicola lanuginosa* a použitou v následujících řadách přeuspořádání (Re). Tmavě stínované oblasti v grafu ukazují přípravu imobilizovaného enzymu in situ a popřípadě jeho opětnou aktivaci. Teplota při imobilizaci in situ a opětné aktivaci byla 35 °C. Samotný postup přeuspořádání probíhal při 60 °C. Imobilizovaný enzymatický preparát byl z oleje oddělen centrifugací pro použití při následujícím postupu.

15

Příprava vsádky pro imobilizaci in situ byla v principu provedena stejně jak se popisuje v příkladu 1 a jak je ilustrováno na obr. 1. Katalyzátor byl dispergován a rozpuštěn ve vodném roztoku. Při imobilizaci bylo nastaveno pH na 7 a stejně tak na začátku druhé regenerace. Na začátku první regenerace bylo pH nastaveno na 6,3. Tentokrát byl použitým nosným materiálem kvasničný extrakt obsahující přibližně 0,1 % hmotnostních ve vodě nerozpustné látky a méně než 1 % hmotnostní soli.

20

Vsádkový reaktor opatřený míchadlem a vodním pláštěm byl naplněn směsí pro přeuspořádání 127,2 g triglyceridů se středním řetězcem (MCT) a 238,95 g slunečnicového oleje (SF). 95 % hmotnostních mastných kyselin tvořících MCT byly C₈-C₁₀ mastné kyseliny a 5 % dalších kyselin. S reakčními dobami 22 až 23 hodin a pro dvě reakční doby 73 a 93 hodin (přes víkend) bylo provedeno osm následujících přeuspořádání. Opětná aktivace byla vložena po přeuspořádání Re5 a Re9.

30

Obr. 4 jasně ukazuje změnu průměrné aktivity na šarži v průběhu doby při různých přeuspořádáních směsi oleje SF/MCT. V tomto konkrétním případě poklesla aktivita enzymu proti přeuspořádání Re1 s počáteční hodnotou 100 % na hodnotu 53 %
5 v přeuspořádání Re5. Přímé porovnání je umožněno díky stejné době trvání procesu.

Regenerace po pátém kroku přeuspořádání vedla k přírůstku aktivity na 64 % z počáteční hodnoty. Bez regenerace však došlo k dalšímu poklesu aktivity na úroveň 39 % až 47 % podobně jako po
10 krocích přeuspořádání Re3 a Re4. Při devátém kroku přeuspořádání poklesla aktivita enzymu na 26,8 % počáteční hodnoty, ale regenerace potom vedla ke zvýšení na 32,7 % počáteční hodnoty.

Zastupuje:

27.08.99

- 18 -

PV2218-99

~~59581~~

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob imobilizace enzymu, charakterizovaný kroky:
 - 5 a. volbou lipázového enzymu pro imobilizaci,
 - b. přípravou emulze obsahující spojitou hydrofobní fázi a dispergovanou vodnou fázi, která obsahuje nerozpuštěný materiál, a ve které je rozpuštěn enzym a materiál vhodný jako nosič enzymu při provádění dalšího kroku,
 - 10 c. odstraněním vody z dispergované fáze, dokud se tato fáze nepřemění na pevné enzymem potažené částice, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e hydrofobní fáze obsazuje látky, které jsou určeny ke zpracování enzymem, z nichž jedna nebo více je zvolena ze skupiny triglyceridů, diglyceridů, monoglyceridů, glycerolu a mastných kyselin.
 - 15
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e lipáza se získává z fermentace *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa* nebo *Rhizopus niveus*.
- 20
3. Způsob podle některého z nároků 1 až 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e vodná fáze obsahuje fermentační kapalinu.
4. Způsob podle některého z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e hydrofobní fázi je jedlý triglyceridový olej.
- 25
5. Způsob podle některého z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e rozpuštěný nosný materiál je zvolen ze

skupiny cukrů, škrobu, dextransu, ve vodě rozpustných derivátů celulózy a fermentačních zbytků.

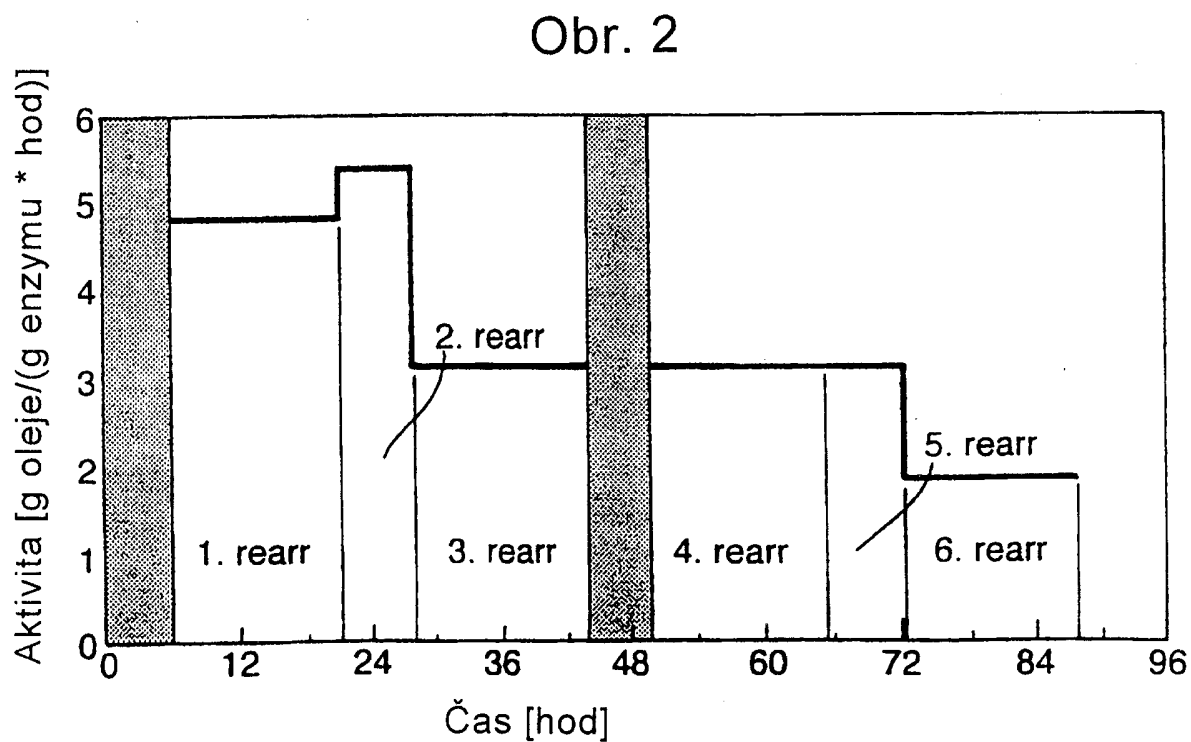
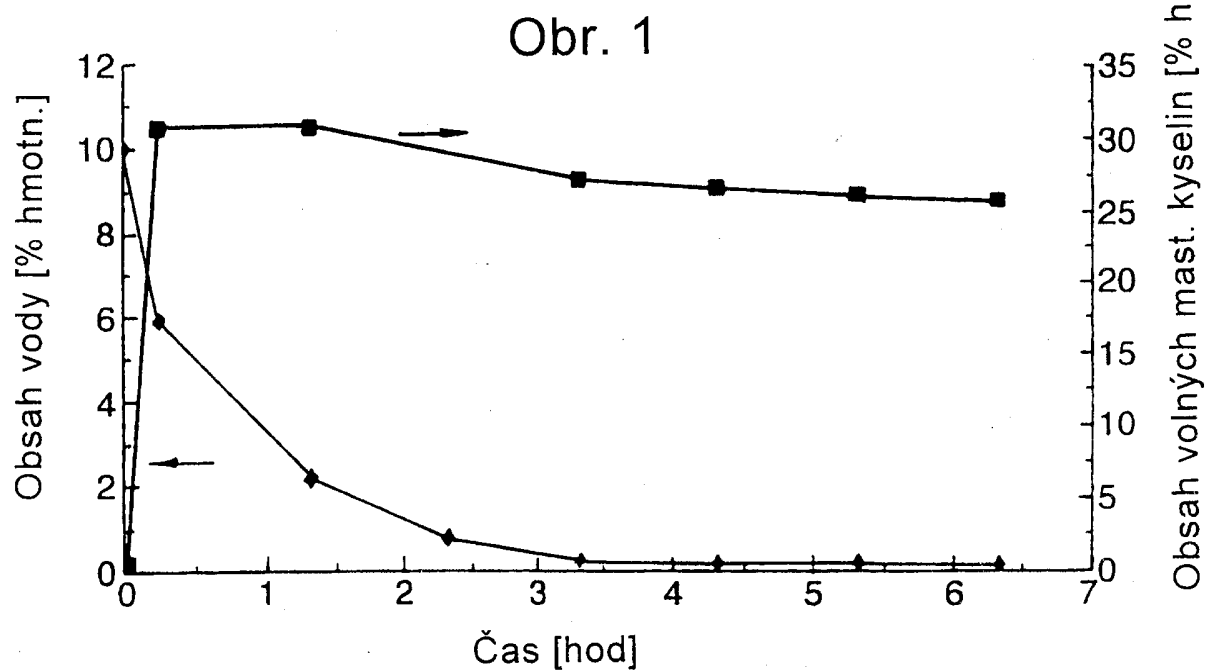
- 5 6. Způsob podle některého z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e nerozpuštěný nosný materiál se skládá buď z materiálu, který není rozpustný ani ve vodě, ani v oleji, nebo materiálu, který je jako takový rozpustný ve vodné fázi, ale který je v konkrétním případě navíc k vodné fázi, která je již tímto ve vodě rozpustným materiálem nasycena, přítomen v 10 nerozpuštěné formě.
- 15 7. Způsob podle některého z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e enzym stejně jako nosná látka, které mají být rozpuštěny ve vodné fázi, jsou odvozeny z imobilizovaných enzymových částic vyrobených podle některého z předcházejících nároků a oddělených z reakční směsi.
- 20 8. Způsob katalyzovaný enzymem lipázou, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e enzymem je imobilizovaný enzym získaný podle některého z nároků 1 až 7.
- 25 9. Použití imobilizovaného enzymu získaného podle některého z nároků 1 až 7 pro řadu alespoň dvou následujících lipázou katalyzovaných reakcí, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e v řadě reakcí je zahrnut alespoň jednou krok regenerace aktivity enzymu, který zahrnuje přidavek vody k imobilizovanému enzymu, ponechání enzymu a jeho nosiče interagovat s vodou a odpaření vody po tom, co byla vodná fáze s enzymem a desintegrovaným nosičem dispergována do

olejové fáze, přičemž se znovu vytvoří enzymem potažené nosné částice.

- 5 10. Způsob přeuspořádání esterů mono-, di- nebo triglyceridů, při kterém se za katalytického působení lipázy vymění na glycerolové kostře skupiny mastné kyseliny, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e lipázou je imobilizovaný enzym získaný podle některého z nároků 1 až 7.
- 10 11. Způsob enzymatického odkyselení triglyceridového oleje, kde za katalytického působení lipázy se esterifikují mastné kyseliny s mono- nebo diglyceridy, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e lipázou je enzym schopný reesterifikovat, získaný podle některého z nároků 1 až 7.

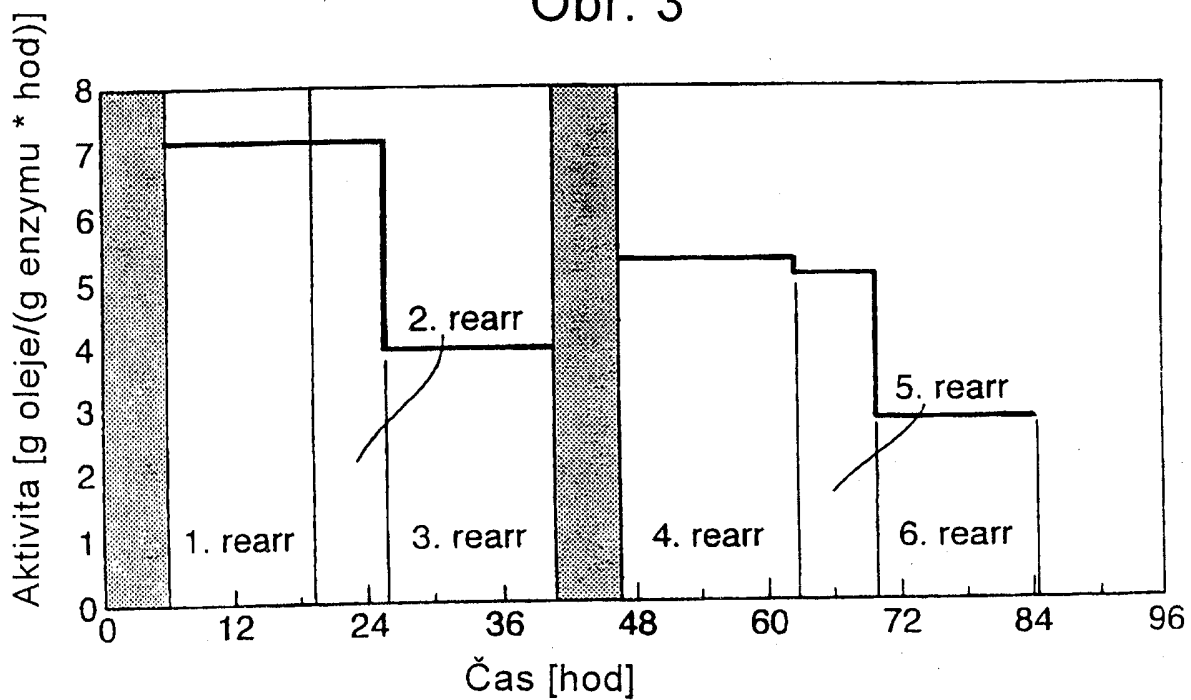
15

Zastupuje:



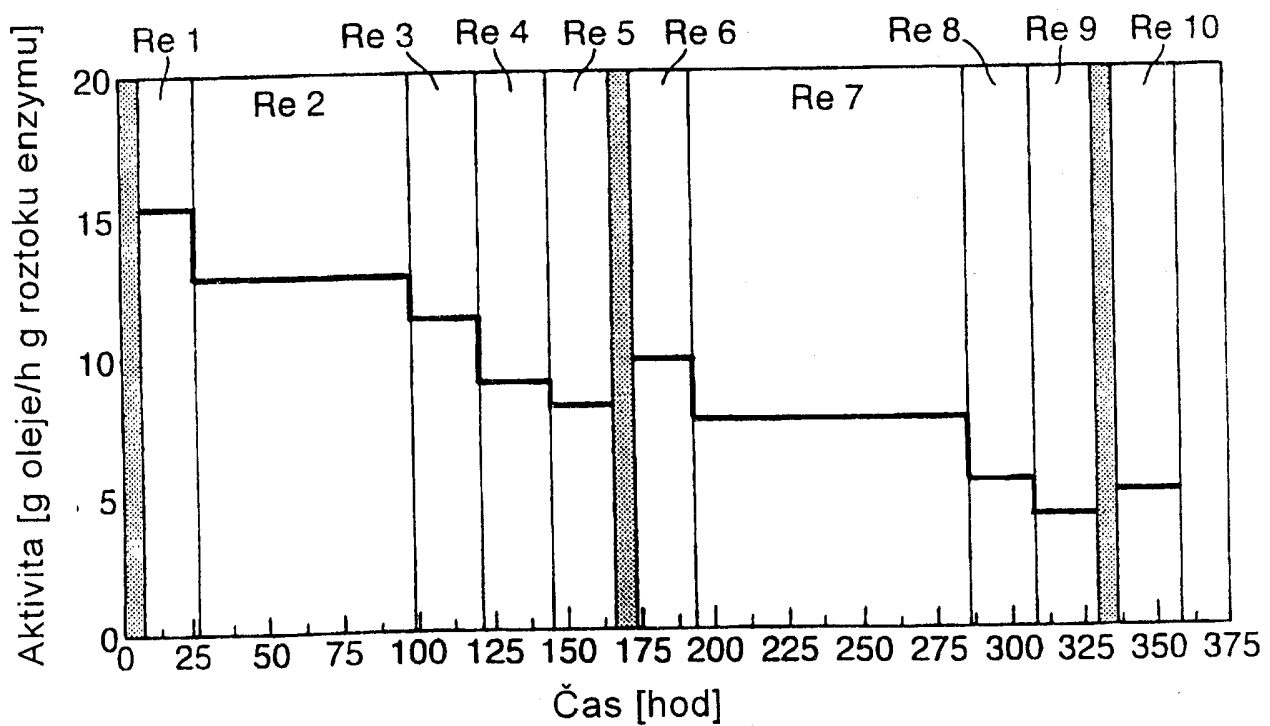
rearr. = pořadí reakce přeuspořádání

Obr. 3



rearr. = pořadí reakce přeuspořádání

Obr. 4



Re = pořadí reakce přeuspořádání