

VÝROBA TECHNICKY DÔLEŽITÝCH DIKARBOXYLOVÝCH KYSELÍN

HELENA MIKOVÁ, MICHAL ROSENBERG
a LUDMILA KRÍŠTOFIKOVÁ

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: miko@chelin.chtf.stuba.sk

Došlo dňa 6.1.2000

Kľúčové slová: dikarboxylové kyseliny, výroba

Obsah

1. Úvod
2. Kyselina epoxyjantárová
3. Kyselina fumarová
4. Kyselina jablčná
5. Kyselina vínna
6. Záver

1. Úvod

Maleínanhydrid a kyselina maleínová sú polyfunkčné chemikálie, ktoré sú svojim komerčným využitím v centre pozornosti už mnoho rokov. Doposiaľ sú dôležitými surovinami najmä v nepotravinárskych segmentoch priemyslu a to vo výrobe alkydových a polyesterových živíc, povrchových náterov, prísad do mazív, zmäkčovadiel, kopolymérov a rozličných poľnohospodárskych chemikálií. S rozvojom biotechnológií sa zvyšuje snaha využívať netradičné, ľahko dostupné suroviny na biosyntézu potravinársky a farmaceuticky významných látok. V poslednom období sa uvažuje o anhydride kyseliny maleínovej ako o dobrom štartovacom materiáli pre chemickú a biotechnologickú prípravu viacerých organických kyselín s rozširujúcim sa uplatnením najmä v potravinárskom a farmaceutickom priemysle. Súčasná možnosť využitia maleínanhydridu na syntézu, resp. biosyntézu týchto látok sú schematicky znázornené na obr. 1. Niektoré kyseliny je možné pripraviť mikrobiálne priamo z kyseliny maleínovej (kyselina D-jablčná, kyselina L-jablčná, kyselina fumarová), iné sa dajú pripraviť zatiaľ len kombináciou chemickej a mikrobiálnej syntézy (všetky izoméry kyseliny vínnej), prípadne iba chemickou syntézou (kyselina *cis*- a *trans*-epoxyjantárová). Neustále však silnie snaha nahrádzať chemické postupy mikrobiálnymi fermentáciami.

2. Kyselina epoxyjantárová

Táto kyselina bola doposiaľ veľmi málo používanou surovinou v priemyselných odvetviach. V 80. a 90. rokoch bola

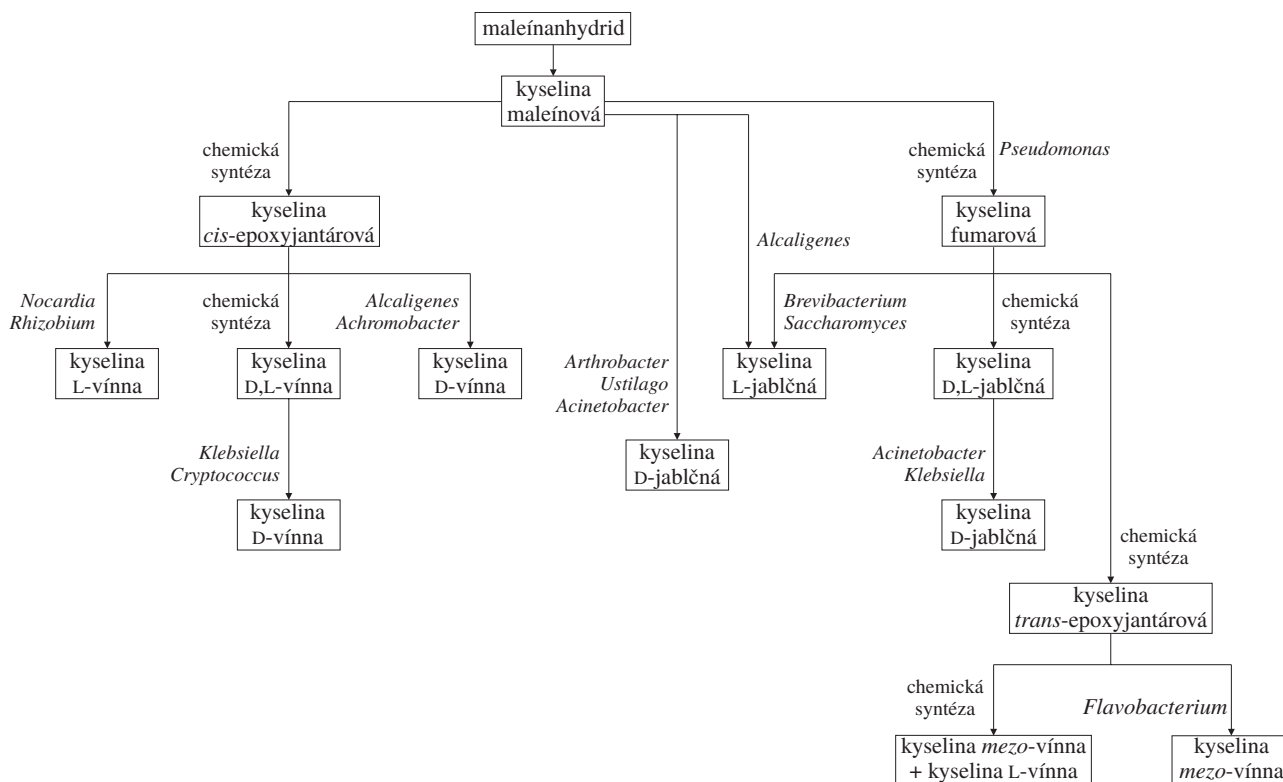
popísaná príprava rôznych derivátov tejto kyseliny a ich využitie vo farmaceutickom priemysle. Výhodou týchto zlúčenín je ich extrémne nízka toxicita. V roku 1983 bolo syntetizovaných niekoľkých derivátov kyseliny *trans*-epoxyjantárovej, ktoré sa ukázali byť dobrými inhibítormi tiolproteázovej aktivity¹. Priaznivý účinok bol potvrdený aj pri liečbe svalových chorôb². Kyselina *trans*-epoxyjantárová sa ľahko transformuje na kyselinu β -hydroxy-L-asparágovú, ktorá má vynikajúce antibakteriálne účinky a používa sa na prípravu β -laktámových antibiotík³.

Kyselina epoxyjantárová sa vyskytuje v dvoch konfiguráciách, a to ako *cis*- a *trans*-forma. Obidve je možné pripraviť z maleínanhydridu, resp. kyseliny maleínovej. Kyselina *cis*-epoxyjantárová sa pripravuje zatiaľ iba chemickou syntézou – oxidáciou kyseliny maleínovej za prítomnosti katalyzátora. Ako katalyzátor boli spočiatku používané rozpustné soli paládia alebo vanádu. Oxidujúcim činidlom bol kyslík, mednaté soli, kyselina dusičná, prípadne dusičnany alkalických kovov. Takouto oxidáciou sa v minulosti pripravovala kyselina D,L-vínna, pričom ako medziprodukt vznikala kyselina *cis*-epoxyjantárová. Vhodnou úpravou reakčných podmienok je však možné získať veľmi čistú kyselinu *cis*-epoxyjantárovú⁴. Maleínanhydrid sa zmieša v destilovanej vode s CaCO₃, peroxidom vodíka a katalyzátorom – wolfrámanom, resp. molybdénanom sodným. Maleínan vápenatý následne konvertuje na *cis*-epoxyjantaran vápenatý pri teplote 60–70 °C a hodnote pH 4–6 v priebehu 4 hodín. Výťažok reakcie je 96 %. Takto pripravený *cis*-epoxyjantaran sa ďalej používa na výrobu kyseliny vínnej. Neskôr bol popísaný postup prípravy vysokočistých solí kyseliny *cis*-epoxyjantárovej z maleínanhydridu, keď epoxidácia prebiehala vo vodno-alkoholickom roztoku (30–90 % vodný roztok alkoholu – metanolu, etanolu, propanolu a pod.)⁵.

Kyselina *cis*-epoxyjantárová sa pripravuje iba chemickou syntézou, doteraz nie je známy mikroorganizmus, ktorý by dokázal syntetizovať túto kyselinu, príp. jej soli.

Kyselinu *trans*-epoxyjantárovú je možné pripraviť dvoma spôsobmi, buď epoxidáciou kyseliny fumarovej (D,L-forma) alebo mikrobiálnou cestou (L-forma). Priebeh epoxidácie je podobný ako pri príprave *cis*-formy tejto kyseliny, zásadný rozdiel je iba v množstve pridaného katalyzátora. Na dosiahnutie 80–86 % konverzie je potrebná 5-násobne vyššia koncentrácia wolfrámanu, resp. molybdénanu⁶. Teplota je udržiavaná v rozmedzí 65–75 °C.

Mikrobiálne sa kyselina *trans*-epoxyjantárová pripravuje z glukózy alebo etanolu pomocou vláknitých húb *Paecilomyces varioti*, *Penicillium vineferum*, *Aspergillus fumigatus*⁷. Štúdiá mechanizmu biosyntézy ukázali, že kyselina *trans*-epoxyjantárová je syntetizovaná z dvojhľikátých zlúčenín cez cyklus glyoxálovej kyseliny a uhlíková kostra fumaranu je transformovaná na *trans*-epoxyjantaran. Epoxidový kyslík *trans*-epoxyjantaranu sodného pochádza priamo z molekule kyslíka⁸. Fermentačnou prípravou kyseliny *trans*-L-epoxyjantárovej sa zaoberala aj japonská pracovná skupina Yamaguchi a kol. V práci boli použité nové kmene vláknitých húb *Aspergillus clavatus*, *A. fumigatus*, *Neosartorya fischeri*,



Obr. 1. Možnosti prípravy kyseliny epoxyjantárovej, fumarovej, vínnej a jablčnej z anhydridu kyseliny maleínovej

Paecilomyces elegans, *Talaromyces wortmannii* a *Byssosclamyces nivea*⁹.

Obe formy kyseliny *trans*-epoxyjantárovej (D,L- aj L-forma) je v súčasnosti možné použiť na chemickú alebo mikrobiálnu prípravu kyseliny *mezo*-vínnej.

3. Kyselina fumarová

Kyselina fumarová je prirodzenou látkou, prítomnou v mnohých mikroorganizmoch, rastlinách i živočíchoch. Je pomenovaná podľa rodu *Fumaria*. Spolu s kyselinou jablčnou je súčasťou Krebsovho cyklu a cyklu kyseliny glyoxálovej. Používa sa v potravinárstve ako prísada do práškových nápojových zmesí, do želatínových dezertov, pudíngov a náplní do koláčov. V mäsovom priemysle sa pridáva do konzervovaného mäsa a do hydínových produktov na urýchlenie stabilizácie farby. V nepotravinárskych odvetviach sa používa kyselina fumarová pri výrobe polyesterových živíc, náterov na nábytok a rýchloschnúcich farieb. Okrem toho je východiskovým materiálom pre priemernú produkciu kyseliny L-jablčnej a kyseliny L-asparágovej. Komerčne sa kyselina fumarová pripravuje chemicky-katalytickou izomerizáciou kyseliny maleínovej od roku 1932. Mikrobiálne môže byť produkovaná z glukózy použitím vláknitých húb z rodu *Rhizopus*. Za potenciálnych producentov možno považovať hlavne dva druhy *Rhizopus arrhizus* a *R. nigricans*. Mikrobiálne bola kyselina fumarová vyrábaná v 40. rokoch firmou Pfizer (4000 ton/rok), ale ekonomicky výhodnejšia chemická syntéza postupne donútila túto firmu zastaviť fermentačnú výrobu¹⁰. Okrem sacharidických substrátov pre priamu konverziu na fumaran sú

ridických substrátov pre priamu konverziu na fumaran sú v literatúre zmienky o možnom využití odpadových sulfitových výluhov¹¹, resp. etanolu¹². V roku 1986 vyšlo doposiaľ najucelenejšie vysvetlenie biochemizmu syntézy kyseliny fumarovej¹².

Kyselina fumarová môže byť pripravovaná z kyseliny maleínovej nielen chemicky ale aj mikrobiálne prostredníctvom baktérií rodov *Arthrobacter*, *Pseudomonas* a *Alcaligenes*. Z kmeňa *Arthrobacter* sp. TPU 5446 bola izolovaná a charakterizovaná maleát *cis-trans*-izomeráza. Tento enzým bol veľmi nestabilný a pri jeho purifikácii došlo k vysokej strate aktivity¹³.

V roku 1997 bol uskutočnený screening baktérií využívajúcich kyselinu maleínovú zo 600 pôdných vzoriek odobratých na rôznych miestach Japonska¹⁴. 20 z nich bolo schopných premieňať kyselinu maleínovú na iné organické kyseliny. 4 z nich mali zvýšenú aktivitu maleát *cis-trans*-izomerázy, teda enzýmu, ktorý katalyzuje izomerizáciu maleánu na fumaran. Najvyššiu aktivitu vykazoval kmeň *Pseudomonas alcaligenes* XD-1, u ktorého bol molárny výťažok kyseliny fumarovej približne 70 % po šiestich hodinách inkubácie. Na druhej strane, za tento čas vzniklo asi 18,4 % kyseliny L-jablčnej ako vedľajšieho produktu. Koncentrácia kyseliny maleínovej musí byť však nižšia ako 100 g.l⁻¹, pri vyšších koncentráciách dochádza k inhibícii produkcie kyseliny fumarovej. Autori uvádzajú, že produktivita kyseliny fumarovej bola až 27× vyššia v porovnaní s výsledkami produkcie kyseliny fumarovej fermentáciou s vláknitými hubami rodu *Rhizopus*¹⁵. Výskumy v tejto oblasti stále pokračujú a v budúcnosti môže byť tento spôsob prípravy kyseliny fumarovej veľmi atraktívnym.

4. Kyselina jablčná

Kyselina jablčná je dikarboxylová kyselina vyskytujúca sa v troch modifikáciách – D(+)-, L(-)-formy sú opticky aktívne a D,L-forma je opticky inaktívna. V prírode sa nachádza iba L-forma a to hlavne v jablkách, melónoch, čerešniach, grapefruitoch, slivkách, brokolici, mrkve a v ďalších druhoch ovocia a zeleniny. Kyselina jablčná (D,L-forma) sa používa v potravinárskom priemysle ako okysľovadlo nealko-nápojov a prírodných štiav. Na dosiahnutie požadovanej kyslosti sa pridáva aj do rôznych potravín ako napr. kandizované ovocie, želatína, jogurty, pudinky a šalátové nálevy. Vo farmácii sa používa do prostriedkov proti kašlu a na liečbu hyperanémie. Kyselina jablčná sa pridáva aj do umelých sladidiel, čím sa potláča ich horká chuť. V kozmetike sa mieša spolu s AHA-kyselinami do krémov na vyhladzovanie vrások a tiež sa používa vo výrobe ťažkých sladkých parfémov. V nepotravinárskych odvetviach sa používa kyselina jablčná pri výrobe zmäčkovadiel; jej chelatačné vlastnosti sa využívajú pri odstraňovaní hrdze a nežiadúcich kovových iónov.

Kyselina jablčná sa pripravuje chemickou syntézou (racionálna zmes) alebo mikrobiálnou cestou (buď D- alebo L-forma v závislosti od použitého mikroorganizmu). Chemicky sa kyselina jablčná syntetizuje hydratáciou kyseliny maleínovej alebo fumarovej za vysokého tlaku a teploty. Cena kyseliny D,L-jablčnej je porovnateľná s cenou kyseliny citrónovej. Preto nové technológie počítajú s možnosťou použitia kyseliny D,L-jablčnej ako náhrady kyseliny citrónovej v nápojov a potravínach. Na druhej strane, rastúci trend používania prírodných potravinárskych zložiek by mohol zvýšiť dopyt po prírodnej L-forme kyseliny jablčnej, pripravovanej biotechnologickými postupmi. Kyselinu jablčnú je možné pripraviť fermentačne alebo biokonverziou kyseliny fumarovej¹⁶.

Fermentačným spôsobom je možné pripraviť kyselinu L-jablčnú zo sacharidických substrátov (glukóza, sacharóza a pod.) hlavne pomocou vláknitých húb rodov *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *A. oryzae* a *A. parasiticus*)¹⁷. S kmeňom *A. flavus* boli dosiahnuté výťažky okolo 50 % (z teor. výťažku). V roku 1991 Batat a kol. uskutočnili doplňujúcu optimalizáciu niektorých zložiek fermentačného média a podarilo sa im zvýšiť produktivitu z 0,3 g.l⁻¹.hod⁻¹ na 0,59 g.l⁻¹.hod⁻¹ a aj výťažok na 60 % (cit.¹⁸). Ako autori porovnávajú z 1 mol glukózy vzniká teoreticky 268 g kyseliny L-jablčnej, pričom kyseliny citrónovej iba 192 g (cit.¹⁹). Okrem sacharidických substrátov bola popísaná u vláknitých húb aj tvorba kyseliny L-jablčnej fermentáciou etanolu (*Schizophyllum commune*)²⁰, n-parafínov, acetát (*Paecilomyces varioti*)²¹. Nevýhodou postupov prípravy kyseliny jablčnej je však dlhý čas fermentácie, vznik vedľajších produktov (napr. polyolov), ktoré sťažujú samotnú izoláciu produktu. Okrem toho je známe, že skupina vláknitých húb *Aspergillus flavus* je známa tvorbou mykotoxínov.

Podstatne výhodnejším spôsobom prípravy tejto kyseliny je konverziou kyseliny fumarovej.

Svedčí o tom aj fakt, že v súčasnosti sa 13 % s celkovej svetovej produkcie kyseliny jablčnej pripravuje enzýmovou konverziou kyseliny fumarovej prostredníctvom baktérií *Brevibacterium flavum* imobilizovaných do κ-karagénanu¹⁶. Jednou z nevýhod tejto konverzie je tvorba vedľajšieho produktu – kyseliny jantárovej. Tú je však možné úspešne zastaviť inkubovaním buniek pred imobilizáciou v roztoku fumaranu

s prídavkom žľožového extraktu²². Tým dôjde nielen k inhibícii jantarandehydrogenázy ale aj k niekoľkonásobnému zvýšeniu aktivity fumarázy. Dobré výsledky v potláčaní tvorby kyseliny jantárovej sa dosiahli aj pri použití kyseliny cholovej, deoxycholovej a iných detergentov. Biokonverzia prebieha na 80–86 % a nezreagovaný fumaran je naspäť recyklovaný. Okrem rodu *Brevibacterium* je produkcia kyseliny jablčnej popísaná aj u druhov *Lactobacillus*^{23,24}, *Corynebacterium*²⁵ a *Escherichia*²⁶. Avšak posledné práce v tejto oblasti sa venujú rodu *Brevibacterium*, zvyšovaniu aktivity fumarázy u týchto kmeňov a imobilizácii do vhodných nosičov^{27,28}. Konverzia kyseliny fumarovej na kyselinu L-jablčnú bola popísaná aj u niektorých rodov kvasiniek. Najviac preštudované sú kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*^{29,30} a kvasinky rodu *Candida*^{21,22}. U kvasiniek je tvorba kyseliny jantárovej účinne potláčaná prídavkom kyseliny malónovej³³. Podobne ako u baktérií aj u kvasiniek je možné zvýšiť aktivitu fumarázy prídavkom detergentov. Na zvýšenie permeability membrány kvasiniek *S. cerevisiae* bol úspešne použitý dodecylsírán sodný a aktivita fumarázy imobilizovaných buniek sa zvýšila až 60× (cit.³⁰) oproti pôvodnej aktivite 0,94 mmol.hod⁻¹.g⁻¹ imobilizovaných buniek²⁹. Zvýšená aktivita fumarázy bola pozorovaná aj u kvasiniek rodu *Dipodascus*, pričom v priebehu konverzie fumaranu na jablčnan nedochádza k tvorbe kyseliny jantárovej. Aktivita fumarázy intaktných aj dezintegrovateľných buniek bola 8–10× vyššia v porovnaní s kvasinkami *S. cerevisiae*³⁴.

Okrem konverzie kyseliny fumarovej na kyselinu L-jablčnú sú známe mikroorganizmy, ktoré konvertujú priamo kyselinu maleínovú na kyselinu L-jablčnú (rod *Alcaligenes*) alebo na kyselinu D-jablčnú (rody *Pseudomonas*, *Ustilago*, *Arthrobacter*), prípadne dokážu selektívne utilizovať L-formu z racemickej zmesi kyseliny jablčnej (*Acinetobacter*, *Serratia*, *Corynebacterium*).

Konverzia kyseliny maleínovej na kyselinu L-jablčnú bola podrobne študovaná u baktérií *Alcaligenes* sp. T501 (cit.³⁵). Molárny výťažok konverzie 20 % roztoku maleínanu vápenatého na jablčnan vápenatý bol 98,4 % a po prečistení bol molárny výťažok čistej kyseliny L-jablčnej 83,1 %. Zistilo sa, že táto transformácia si vyžaduje u mikroorganizmov prítomnosť dvoch enzýmov a to maleátizomerázy a fumarázy. V prvom stupni je kyselina maleínová konvertovaná na kyselinu fumarovú a tá je následne účinkom fumarázy transformovaná na kyselinu L-jablčnú. Enzým, ktorý by bol schopný katalyzovať priamu konverziu maleátu na L-jablčnan bez tvorby fumaranu ako intermediátu, nebol nájdený. Doteraz bol tento enzým (maleáthydratáza) detegovaný iba u *Pseudomonas* sp. a v cicavčích obličkách³⁶. Hydratačným produktom bola však kyselina D-jablčná.

O príprave kyseliny D-jablčnej z kyseliny maleínovej prostredníctvom baktérií bolo publikovaných niekoľko prác. Túto schopnosť majú baktérie rodov *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*. V roku 1993 bola urobená štúdia, v ktorej boli nájdené prvýkrát aj eukaryotické mikroorganizmy schopné konvertovať kyselinu maleínovú na kyselinu D-jablčnú³⁷. Vysokú aktivitu maleáthydratázy vykazovali kmene rodov *Ustilago*, *Saccharomycopsis* a *Rhodotorula*. Najlepší z nich, kmeň *Ustilago sphaerogena* S402, bol schopný konvertovať roztok maleínanu disodného na 50 %, po prídavku 1 % Tritonu X-100. Okrem toho sa zistilo, že tento kmeň dokáže konvertovať kyselinu fumarovú na kyselinu L-jablčnú, avšak nie je schopný premieňať maleínan na fumaran. Nevýhodou tohto

spôsobu prípravy D-formy kyseliny jablčnej nie je len nízky stupeň konverzie ale aj veľmi nízka optická čistota produktu a potreba prídavku drahého induktora do kultivačného média.

Schopnosť konvertovať maleínan na jablčnan s 50–70 % molárnym výťažkom majú aj kmene *Sporosarcina ureae*, *Mycoplasma dimorpha*, *Vibrio tyrogenes*³⁸.

Kyselinu D-jablčnú je možné pripraviť aj z racemickej zmesi kyseliny jablčnej a to pomocou mikroorganizmov, ktoré využívajú L-formu tejto kyseliny. Do tejto skupiny radíme baktérie rodov *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*³⁹. Avšak ani touto metódou nedosiahneme uspokojivé výťažky a čistotu produktu.

Doteraz najefektívnejší spôsob mikrobiálnej prípravy kyseliny D-jablčnej konverziou kyseliny maleínovej bol popísaný v roku 1993, keď boli na konverziu použité bunky *Arthrobacter* sp.⁴⁰. Výťažky boli 70–72 % kyseliny D-jablčnej a optická čistota bola 100 %.

5. Kyselina vínna

Táto dikarboxylová organická kyselina sa radí do skupiny dôležitých látok s rozširujúcim sa použitím najmä v potravinárskom a farmaceutickom priemysle. Vyskytuje sa v štyroch rôznych modifikáciách, ako L-, D-forma, mezo-forma a D,L-forma. V prírode sa prirodzene vyskytuje iba L-forma tejto kyseliny a to najmä v ovoci.

Najviac sa kyselina vínna využíva v potravinárstve, kde slúži ako acidifikačné činidlo do džúsov, práškových nápojov a iných potravinárskych produktov (želatína, cukrovinky, pudinky, ...). V pekárstve sa používa vo forme tzv. datem esterov (diacetyl ester monoglyceridov mastných kyselín), ktoré zlepšujú kvalitu múky a tým aj celkovú chuť pečiva. Vo farmaceutickom priemysle sú soli kyseliny vínnej dôležitými intermediátmi pri príprave antacid, antibiotík a chirálnych zlúčenín. Technická kyselina vínna sa používa hlavne vo fotografickom, metalurgickom a keramickom priemysle.

Prírodná L-forma kyseliny vínnej sa získava izoláciou z vínneho kameňa a kalu ako vedľajší produkt pri výrobe vína. Preto aj najväčší výrobcovia sa nachádzajú v krajinách s najväčším vinárskym priemyslom (Taliano, Francúzsko, Portugalsko). Z vínneho kameňa sa pripravuje vínan vápenatý, z ktorého sa izoluje kyselina vínna. Nevýhodou tejto zatiaľ jedinej komerčnej výroby kyseliny vínnej je sezónnosť základného materiálu, čím je množstvo vyrobenej kyseliny limitované. Preto bola snaha vyvinúť iné či už chemické alebo mikrobiálne spôsoby produkcie tejto kyseliny. Jedným z chemických spôsobov je aj epoxidácia kyseliny maleínovej resp. kyseliny fumarovej pričom vzniká kyselina D,L-, resp. mezo-vínna. Do reakcie vstupuje peroxid vodíka, CaCO₃ (alebo NaOH v závislosti od pripravovanej soli) a katalyzátor, ktorým sú najčastejšie wolfrámany alebo molybdénany⁴¹. Reakcia prebieha pri teplote 60–75 °C a pH 4,5–5,5. Výťažok kyseliny D,L-vínnej je 95–97 %.

Doposiaľ ešte nie komerčne použitým spôsobom prípravy kyseliny vínnej je fermentačná výroba. V nej majú z mikroorganizmov význam iba niektoré druhy baktérií. Všeobecne ich možno rozdeliť do štyroch skupín v závislosti od formy kyseliny vínnej, ktorú chceme pripraviť (obr. 2).

Jednou z možností prípravy kyseliny L-vínnej je fermentácia zo sacharidických substrátov, najčastejšie z glukózy,

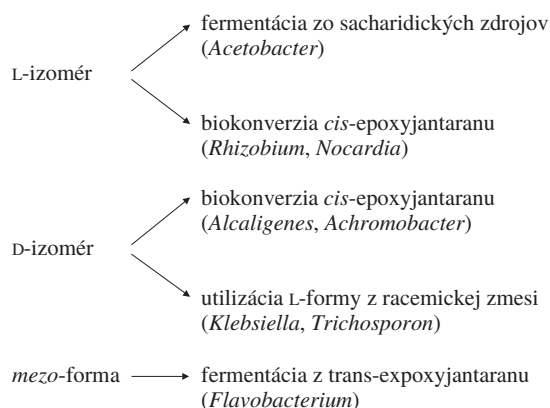
prostredníctvom baktérií z rodu *Acetobacter*. V roku 1972 bol ukázaný pravdepodobný biochemizmus tvorby kyseliny vínnej u týchto baktérií. Glukóza je oxidovaná na kyselinu 5-keto-D-glukónovú, ktorá sa premieňa ďalej na kyselinu 1,2-dihydroxyetylhydrogénvinnu⁴². Z nej vzniká kyselina L-vínna. Reakcia môže byť urýchlená prídavkom katalyzátora – vanadičnych solí. Nevýhodou tohto postupu sú však malé výťažky kyseliny vínnej a tvorba vedľajších produktov (hlavne kyselina glykolová). V 80. rokoch boli pripravené mutantné kmene *Acetobacter suboxydans*, ktoré produkovali dvojnásobné množstvo kyseliny vínnej v porovnaní s pôvodným kmeňom⁴³.

Klasen a kol. poukázal vo svojej práci na neschopnosť kmeňa *Gluconobacter oxydans* produkovať kyselinu vinnu⁴⁴. Tento kmeň oxiduje glukózu na kyselinu D-glukónovú a z nej ďalej tvorí kyselinu 5-keto-D-glukónovú a kyselinu 2-keto-D-glukónovú, ktoré sú vylučované do média. Kyselina 2-keto-D-glukónová je ďalej konvertovaná na kyselinu 2,5-diketo-D-glukónovú. Predchádzajúce štúdie ukázali, že kyselina 5-keto-D-glukónová je vhodným prekurzorom pre tvorbu kyseliny L(+)-vínnej. Výsledky tejto práce však ukázali, že kmeň *G. oxydans*, hoci produkuje kyselinu 5-keto-D-glukónovú, nie je schopný produkovať samotnú kyselinu L(+)-vinnu.

Ďalšie experimenty s kmeňom *G. oxydans* boli zamerané na sledovanie vplyvu koncentrácie sorbitolu a kvasničného extraktu v kultivačnom médiu na produkciu kyseliny vínnej⁴⁵. Zistilo sa, že pre rast baktérií a produkciu kyseliny vínnej je optimálny obsah sorbitolu v médiu 20 g.l⁻¹ a kvasničného extraktu 2 g.l⁻¹.

Keďže ani výsledky kontinuálnej prípravy kyseliny vínnej zo sacharidických substrátov neprinesli očakávané zlepšenie vo výťažkoch a navyše dochádzalo k tvorbe vedľajších produktov, stal sa tento proces pre priemyselné využitie ekonomicky málo atraktívny.

Atraktívnejším spôsobom prípravy prírodnej, L-formy kyseliny vínnej je biokonverzia kyseliny cis-epoxyjantárovej, resp. jej solí na kyselinu vinnu pomocou niektorých druhov baktérií rodov *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter* a *Nocardia*. Biokonverzie prebiehajú v nesterilných podmienkach, pri teplote 10–50 °C, hodnote pH 6–10, v batch-režime, semikontinuálne alebo kontinuálne. Veľmi dobré výťažky boli dosiahnuté u kmeňov *Rhizobium validum*, ktoré sa pohybovali v rozmedzí 80–85 % s čistotou produktu 98 % (cit.^{46,47}). Ešte lepšie výsledky boli dosiahnuté u kmeňov *Nocardia tartari-*



Obr. 2. Možnosti mikrobiálnej prípravy izomérov kyseliny vínnej

cans ATCC 311 90 a ATCC 311 91, kde boli výťažky 95 až 99,5 % (cit.^{48,49}). Bunky sú po kultivácii separované z kultivačného média, premyté a kontaktované s kvapalným roztokom *cis*-epoxyjantaranu sodného (prípadne inej soli). Reakčná rýchlosť je ovplyvňovaná prídavkom rôznych detergentov (Tween 80, Triton X-100, SDS a pod.), pričom nevzniká žiadny vedľajší produkt⁴⁸. Na biokonverziu je možné použiť intaktné, dezintegrované alebo imobilizované bunky, prípadne čistý enzým *cis*-epoxyjantaranhydrolázu. V posledných rokoch sa pracuje intenzívne s kmeňom *N. tartaricans* SW 13-57, ktorý bol imobilizovaný do želatíny. Dosiahnuté molárne výťažky boli 92–93 % a po 9-tich opakovaných konverziách nebola pozorovaná strata enzýmovej aktivity^{50–52}. Bunky *N. tartaricans* ATCC 311 91 imobilizované do pektátového gélu vykazovali po 450 dňoch ešte cca 30 % pôvodnej aktivity *cis*-epoxyjantaranhydrolázy⁵³. Pri použití baktérií z rodov *Alcaligenes* a *Achromobacter* sa výťažky pohybujú v rozmedzí 91–93 % (cit.⁵⁴).

Príprava kyseliny vínnej konverziou kyseliny *cis*-epoxyjantárovej bola odskúšaná aj u kmeňov *Acetobacter* a *Corynebacterium*, ale výťažky kyseliny vínnej boli veľmi nízke a čas konverzie príliš dlhý^{55,56}.

Okrem L-izoméru je možné účinkom enzýmu D-vínan epoxidázy pripraviť biokonverziou kyseliny *cis*-epoxyjantárovej aj D-izomér kyseliny vínnej. Tento reakcie sa zúčastňujú baktérie z rodov *Alcaligenes* a *Achromobacter*. Podmienky konverzie sú podobné ako v prípade L-formy kyseliny vínnej a výťažky D-izoméru sa pohybujú v rozmedzí 91–93 % (cit.⁵⁶). V 80. rokoch bol popísaný spôsob prípravy kyseliny D-vínnej založený na utilizácii L-formy tejto kyseliny z racemickej zmesi účinkom mikroorganizmov z rodov *Klebsiella*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* a *Pseudomonas*⁵⁷. Koncentrácia kyseliny D,L-vínnej v kultivačnom médiu je 30–150 g.l⁻¹. Po skončení fermentácie sú baktérie odseparované z média a do zmesi je pridaný chlorid vápenatý, čím sa vyzráža D(-)-vínan vápenatý. Použitím kmeňa *Trichosporon cutaneum* sa získalo z 36,4 g.l⁻¹ kyseliny D,L-vínnej 19,3 g kyseliny D-vínnej, pri kmeni *Cryptococcus laurentii* sa získalo z 72,2 g.l⁻¹ kyseliny D,L-vínnej 45,1 g kyseliny D-vínnej.

Kyselinu mezo-vínnu je možné pripraviť chemickou syntézou alebo mikrobiálne biotransformáciou kyseliny *trans*-epoxyjantárovej účinkom enzýmu *trans*-epoxyjantaranhydrolázy, ktorej zvýšená aktivita bola nájdená u baktérií *Flavobacterium* sp.⁷ Tieto baktérie dokážu premieňať nízke koncentrácie solí kyseliny *trans*-epoxyjantárovej (6 g.l⁻¹) na mezo-vínan s výťažkom 100 %. Na konverziu sa však používajú iba bezbunkové extrakty enzýmu, pretože pri použití intaktných buniek bola pozorovaná dlhá počiatočná fáza reakcie. Pre priemyselnú výrobu kyseliny mezo-vínnej je však tento spôsob málo perspektívny, pretože pri vyšších koncentráciách substrátu je reakčný čas veľmi dlhý.

6. Záver

Chemické spôsoby prípravy rôznych látok sú postupne nahrádzané novými biotechnologickými postupmi. Maleínanhydrid, resp. kyselina maleínová je perspektívnym zdrojom pre biotechnologickú prípravu niekoľkých organických kyselín, z nich však najväčší význam má príprava prírodných foriem kyseliny vínnej a jablčnej. Oblasť použitia týchto ky-

selín a ich derivátov sa v poslednom čase veľmi rozšírila. Kyselina jablčná je už z časti vyrábaná mikrobiálne a je iba otázkou času kedy bude zavedená mikrobiálna výroba kyseliny vínnej. Výhoda biotechnologického spôsobu prípravy týchto kyselín spočíva v jednoduchej konverzii substrátu na produkt v nerastových, často nesterilných podmienkach pomocou voľných, permeabilizovaných buniek, prípadne enzýmov z nich izolovaných. Tieto jednoduché biotransformačné reakcie sú ideálnym modelom pre imobilizáciu producenta, čo výrazne zlejšuje stabilitu buniek a umožňuje kontinualizáciu procesu. Všeobecne biotransformačné reakcie sa pre svoju jednoduchosť, efektívnosť stávajú v súčasnosti predmetom zvýšeného záujmu výskumnej aj výrobnjej sféry.

Táto práca bola uskutočnená s príspevím grantu VEGA evid. č. 1-6252/99.

LITERATÚRA

1. Sawada J., Hanada K., Tamai M., Morimoto S., Omura S.: DE 2 809 036 (1978); Chem. Abstr. 90, 87233 (1979).
2. Murata M., Yokoo Ch., Hanada K.: EP 407 017 (1991); Chem. Abstr. 115, 92954 (1991).
3. Yamaguchi T., Nogami I.: EP 236 760 (1987); Chem. Abstr. 108, 110877 (1988).
4. Petritsch K., Korl P.: DE 25 55 699 (1976); Chem. Abstr. 85, 143406 (1976).
5. Sato K., Murayama K., Ida K.: WO 94 17 049 (1994); Chem. Abstr. 121, 255626 (1994).
6. Payne G. B., Williams P. H.: J. Org. Chem. 24, 54 (1959).
7. Martin W. R., Foster J. W.: J. Bacteriol. 70, 405 (1955).
8. Wilkoff L. J., Martin W. R.: J. Biol. Chem. 238, 843 (1963).
9. Miall L. M.: *Organic Acids 2.*, str. 108. Academic Press, London 1978.
10. Romano A. H., Bright M. M., Scott W. E.: J. Bacteriol. 93, 600 (1967).
11. Foster J. W., Waksman S. A.: J. Am. Chem. Soc. 61, 127 (1939).
12. Kenealy W., Zaady E., Du Preez J. C., Stieglitz B., Goldberg I.: Appl. Environ. Microbiol. 52, 128 (1986).
13. Kato Y., Yamagishi J., Asano Y.: J. Ferment. Bioeng. 80, 610 (1995).
14. Nakajima-Kambe T., Nozue T., Mukouyama M., Nakahara T.: J. Ferm. Bioeng. 84, 165 (1997).
15. Petruccioli M., Angiani E., Federici F.: Process Biochem. 31, 463 (1996).
16. Chibata I., Takata I.: Trends Biotechnol. 1, 9 (1983).
17. Samson R. A.: *Biology and Industrial Applications* (Bennett J. W., Klich M. A., ed.), str. 355. Butterworth-Heinemann, Stoneham 1992.
18. Batat E., Peleg Y., Bercovitz A., Rokem J. S., Goldberg I.: Biotechnol. Bioeng. 37, 1108 (1991).
19. Goldberg I., Peleg Y., Rokem J. S.: *Biotechnology and Food Ingredients* (Goldberg I., Williams R. A., ed.), str. 349. Van Nostrand Reinhold., New York 1991.
20. Tachibana S., Murakami T.: J. Ferment. Technol. 52, 511 (1974).
21. Cambell S. M., Todd J. R., Anderson J. G.: Biotechnol. Lett. 9, 393 (1987).
22. Yamamoto K.: Eur. J. Appl. Microbiol. 3, 169 (1976).

23. Veryovkin A. N., Yakovleva V. I.: *Prikl. Biokhim. Biotekhnol.* 26, 19 (1990).
24. Avsyuk I. V.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 27, 658 (1991).
25. Kučerová H., Špaček B., Černý J.: *Kvas. Prum.* 36, 101 (1990).
26. Veryovkin A. N., Zueva N. N., Yakovleva V. I., Sokolova E. N.: *Prikl. Biokhim. Biotekhnol.* 24, 35 (1988).
27. Wang X., HU Y., Ouyang P.: CN 1 093 752 (1994); *Chem. Abstr.* 122, 185544 (1995).
28. Wu W., Tang W.: CN 1 081 206 (1994); *Chem. Abstr.* 122, 29890 (1995).
29. Figueiredo Z. M. B., Carvalho L. B.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30, 217 (1991).
30. Oliveira E. A., Costa A. A. R., Figueiredo Z. M. B., Carvalho L. B.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47, 65 (1994).
31. Kalis V. E., Skordelis O. E.: SU 1254004 (1986); *Chem. Abstr.* 107, 5722 (1987).
32. Skordelis O. E., Kalis V. E., Viesture Z. A.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 25, 498 (1989).
33. Godbole S. S., Kaul R.: *Biotechnol. Bioeng.* 25, 217 (1983).
34. Miková H., Rosenberg M., Křištofiková L., Liptaj T.: *Biotechnol. Lett.* 20, 833 (1998).
35. Kimura T., Kawabata Y., Sato E.: *Agric. Biol. Chem.* 50, 89 (1986).
36. Nakayama K., Kobayashi Y.: JP 03 53 888 (1991); *Chem. Abstr.* 115, 90697 (1991).
37. Nakajima T., Manzen S., Shigeno T., Nakahara T.: *Bio-sci. Biotech. Biochem.* 57, 490 (1993).
38. Ohnishi N., Niwa Ch., Yokozeki K.: US 582 44 49 (1997); *Chem. Abstr.* 127, 330444 (1997).
39. Nakayama K., Miyama M.: JP 02 242 699 (1990); *Chem. Abstr.* 114, 80110 (1991).
40. Yamada H., Asano Y., Sashita R.: JP 05 103 680 (1993); *Chem. Abstr.* 119, 47619 (1993).
41. Oludipe J. O., Koiki K. K., Litvintsev I. U., Sapunov V. N.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 55, 103 (1992).
42. Kotera U., Kodama T., Minoda Y.: *Agr. Biol. Chem.* 36, 1315 (1972).
43. Bhat H. K., Qazi G. N.: *Res. Ind.* 31, 148 (1986).
44. Klasen R., Bringer-Meyer S., Sahn H.: *Biotechnol. Bioeng.* 40, 183 (1992).
45. Mantha D., Basha Z. A., Panda T.: *Bioproc. Eng.* 19, 285 (1998).
46. Kamatani Y., Hisayoshi O.: DE 26 19 311 (1976); *Chem. Abstr.* 86, 105953 (1977).
47. Huang T., Qian X.: *Gongye Weishengwu* 20, 14 (1990); *Chem. Abstr.* 115, 6912 (1991).
48. Miura Y., Yutani K., Takesue H.: DE 26 05 921 (1976); *Chem. Abstr.* 86, 70103 (1977).
49. Rosenberg M., Miková H., Křištofiková L.: *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 221 (1999).
50. Zheng P., Sun Z.: *Gongye Weishengwu* 24, 12 (1994); *Chem. Abstr.* 122, 29814 (1995).
51. Sun Z., Zheng P.: *Shengwu Gongcheng Xuebao* 11, 372 (1995); *Chem. Abstr.* 124, 287155 (1996).
52. Sun Z., Zheng P.: *Weishengwu Xuebao* 36, 109 (1996); *Chem. Abstr.* 125, 165755 (1996).
53. Rosenberg M., Miková H., Křištofiková L.: *Biotechnol. Lett.* 6, 491 (1999).
54. Tsurumi Y., Fujioka T., Tsuyuki K., Isshiki T., Miura M.: DE 26 16 673 (1976); *Chem. Abstr.* 86, 105949 (1977).
55. Zhang J., Huang T.: *Gongye Weishengwu* 20, 7 (1990); *Chem. Abstr.* 113, 57368 (1990).
56. Sato E., Yanai A.: US 3 957 579; 1975; *Chem. Abstr.* 84, 89630 (1976).
57. Sato H.: EP 0 311 835; 1989; *Chem. Abstr.* 111, 172503 (1989).

H. Miková, M. Rosenberg, and L. Křištofiková (*Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Production of Dicarboxylic Acids Important for Technology**

Maleic anhydride is a suitable and easily available substrate for preparation of organic acids for pharmaceutical and food industries. The paper describes preparation, based on maleic acid, of tartaric, malic, fumaric and epoxysuccinic acids by chemical synthesis or microbial transformation. In biotransformations, pure cultures of microorganisms, immobilized cells, enzyme solutions or immobilized enzymes are used. Production of tartaric and malic acids can be accomplished by typical biotransformations with immobilized cells in high yields.