

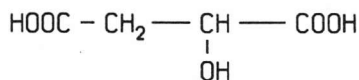
Mikrobiálna príprava kyseliny jablčnej a jej použitie

HELENA MIKOVÁ - MICHAL ROSENBERG - LUDMILA KRIŠTOFÍKOVÁ

SÚHRN. V článku sú uvedené novšie poznatky o použití kyseliny jablčnej v potravinárstve, farmácii a v ďalších priemyselných oblastiach. Bežne sa používa ako acidifikačné činidlo do potravín a nápojov. V príspevku sú ďalej uvedené možnosti prípravy kyseliny jablčnej. Komerčne sa pripravuje dvoma spôsobmi, chemickou syntézou - katalytickou hydratáciou kyseliny maleínovej alebo kyseliny fumarovej, pričom vzniká racemická zmes kyseliny jablčnej, alebo enzymatickou konverziou kyseliny fumarovej na kyselinu L-jablčnú pomocou buniek obsahujúcich fumarázu.

Organické kyseliny nachádzajú stále väčšie uplatnenie v rôznych priemyselných odvetviach. V poslednom období stúpa dopyt po kyseline L-jablčnej, vzhľadom k jej využitiu v potravinárstve (lepšie organoleptické vlastnosti než kyselina citrónová), farmaceutickom priemysle a v ďalších odboroch.

Kyselina jablčná je dvojsýtna kyselina s jedným asymetrickým uhlíkom. Je to relatívne silná organická kyselina s podobnými fyzikálnymi vlastnosťami ako kyselina citrónová. Sumárny vzorec kyseliny jablčnej je $C_4H_6O_5$ a má nasledovnú štruktúru:



Kyselina jablčná sa vyskytuje v troch rôznych modifikáciách. Kyselina D(+)- a L(-)-jablčná sú opticky aktívne, racemická zmes [kyselina (D,L)-jablčná] je opticky inaktívna. V prírode je rozšírená iba L-forma kyseliny jablčnej.

Kyselina jablčná sa nachádza v rôznych druhoch ovocia, predovšetkým v jablkách, hruškách, v kôstkovom ovocí, hrozne a banánoch. I keď hrozno obsahuje veľa kyseliny vínnej, jeho hlavnou zložkou je kyselina jablčná, pretože

Ing. Helena Miková, Ing. Michal Rosenberg, CSc., prom. chem. Ludmila Krištofíková, Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

počas dozrievania vína je postupne konvertovaná na kyselinu mliečnu. Okrem toho sa kyselina jablčná nachádza aj v iných vyšších rastlinách, živočíchoch a mikroorganizmoch (baktérie, kvasinky, vláknité huby) [1]. Je intermediátom dvoch metabolických cyklov - Krebsov cyklus a glyoxálový cyklus, ktoré majú významnú úlohu v bunkovom metabolizme.

V súčasnosti sa pripravuje dvoma v zásade odlišnými spôsobmi: chemickou syntézou a fermentačne. V USA, Kanade a v Európe sa komerčne pripravuje iba chemickou syntézou, a to kyselina D,L-jablčná, v Japonsku sa okrem tejto formy pripravuje kyselina L-jablčná aj fermentačným spôsobom [2].

V nasledujúcej časti práce bude stručne popísaný chemický spôsob prípravy tejto kyseliny a pozornosť bude zameraná predovšetkým na perspektívy biotechnologickej prípravy kyseliny L-jablčnej.

Chemický spôsob prípravy a izolácia z prírodných zdrojov

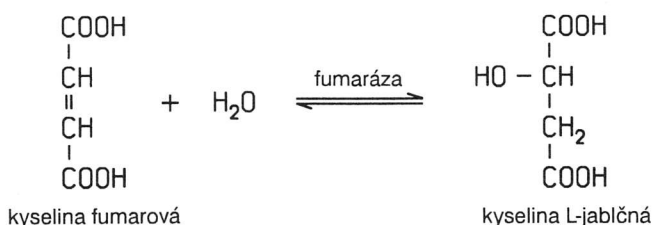
Jedným z prvých spôsobov prípravy kyseliny L-jablčnej bola extrakcia z jablkových džúsov, ktoré obsahujú asi 0,4 - 0,7 % kyseliny jablčnej [3]. Kyselina jablčná sa získava vo forme sodnej soli po perkolácii cez anex a po kryštalizácii. Čistota jablčnanu sodného je 97 % a prídavkom kyseliny sírovej možno získať voľnú kyselinu.

Najstarším a najpoužívanejším spôsobom prípravy kyseliny jablčnej je organická syntéza. V súčasnosti predstavuje tento spôsob prípravy asi 85 % celkovej produkcie kyseliny jablčnej. Katalytickou hydratáciou kyseliny maleínovej, resp. kyseliny fumarovej vzniká racemická zmes D- a L-formy kyseliny jablčnej, pričom je schopná sa štiepiť na dva aktívne (+)- a (-)-izoméry. Reakcia prebieha pri zvýšenej teplote a tlaku. V praxi sa zahrieva kvapalný roztok kyseliny maleínovej na teplotu 150 °C pri tlaku 1,4 MPa, pričom zdržný čas je 3 - 5 hodín. V prvom stupni vzniká kyselina fumarová, ktorá ďalej pomaly izomeruje na kyselinu jablčnú [4]. Výsledná zmes obsahuje kyselinu D,L-jablčnú, určité percento kyseliny fumarovej a maleínovej. Takto pripravená kyselina jablčná sa purifikuje v 2-stupňovom kryštalizačnom procese. V USA bola prvýkrát synteticky pripravená kyselina D,L-jablčná v roku 1923. Až do roku 1960 bola produkovaná v malej miere, čím bola limitovaná aj jej priemyselná aplikácia. Kontinualizáciou procesu začiatkom 60-tych rokov sa kyselina jablčná postupne stala veľkoobjemovou priemyselnou organickou kyselinou.

Postup prípravy kyseliny jablčnej chemickou cestou má však veľa nevýhod. Hlavnou nevýhodou je, že syntézou vzniká opticky inaktívna zmes D- a L-formy kyseliny jablčnej, z ktorej sa musí pre potravinárske a farmaceutické účely izolovať L-izomér. Ešte stále existujú totiž pochybnosti o tom, či D-forma nie je z fyziologického hľadiska škodlivá.

Fermentačné spôsoby prípravy

Zatiaľ jedinou ekonomicky výhodnou prípravou kyseliny jablčnej je využitie enzýmovej transformácie kyseliny fumarovej pomocou intracelulárneho enzýmu fumarázy. Tento enzým sa nachádza v mnohých biologických systémoch, ako sú baktérie, kvasinky vlákňité huby, vyššie rastliny a živočíchy. Je súčasťou cyklu trikarboxylových kyselín, kde katalyzuje reakciu znázornenú na obr. 1.



OBR. 1. Tvorba kyseliny L-jablčnej z kyseliny fumarovej účinkom enzýmu fumarázy.
FIG. 1. The formation of L-malic acid from fumaric acid by the action of the enzyme fumarase.

Prvé práce venované príprave kyseliny jablčnej prostredníctvom mikroorganizmov boli publikované už veľmi dávno. Avšak až v 60-tych rokoch sa začalo intenzívnejšie pracovať v tejto oblasti a postupne sa testovalo veľké množstvo mikroorganizmov na rôznych substrátoch. Kyselinu L-jablčnú je možné produkovať tak zo sacharidických substrátov ako aj konverziou fumaranu \rightarrow jablčnan. Prvý typ prípravy predstavuje klasickú niekoľkodňovú fermentáciu v podmienkach intenzívnej aerácie na komplexnom médiu. Nevýhodou tohto je malá výťažnosť vzhľadom na sacharidický substrát a tvorba vedľajších produktov (predovšetkým organické kyseliny a polyoly), ktoré nepriaznivo vplyvajú na čistotu produktu a sťažujú jeho izoláciu. V druhom prípade sa používa ako základný substrát kyselina fumarová alebo jej soli, ako sú sodná, draselná, amónna alebo vápenatá, ktoré sa pripravujú z lacného a ľahko dostupného zdroja kyseliny maleínovej, resp. jej anhydridu. Inou možnou cestou prípravy kyseliny fumarovej je fermentačný spôsob pomocou vláknitých húb [5].

Z ďalších surovín pre fermentačnú prípravu kyseliny jablčnej bol študovaný etanol, n-parafíny, acetát a propionát [6]. Efektívnosť tejto prípravy z hľadiska priemyselnej aplikácie nie je dostatočne vysoká, preto majú tieto práce iba teoretický význam.

Jedným z problémov fermentačnej prípravy kyseliny L-jablčnej je potlačenie tvorby nežiadúceho vedľajšieho produktu - kyseliny jantárovej, ktorá sa tvorí v priebehu konverzie kyseliny fumarovej. Zistilo sa však, že prídavkom

niektorých steroidných zlúčenín (žlčové kyseliny, kyselina cholová a i.) možno dosiahnuť účinnú inhibíciu jantarátdehydrogenázy, pričom sa zvýši aj aktivita fumarázy [7].

V nasledujúcej časti bude daný stručný prehľad o niektorých druhoch mikroorganizmov schopných tvoriť zvýšené množstvo kyseliny L-jabľčnej.

Bakteriálna príprava

Prvýkrát bola získaná kyselina L-jabľčná vo veľkom množstve z fumaranu použitím buniek *Lactobacillus brevis* [8]. Bol to enzýmový vsádzkový proces, ktorý bol v 70-tych rokoch nahradený výhodnejším kontinuálnym enzýmovým reakčným systémom s imobilizovaným enzýmom [9]. V roku 1976 bola vyvinutá nová technológia prípravy kyseliny L-jabľčnej, ktorá nahradila dovtedy používaný spôsob [7]. Bola založená na imobilizácii buniek s vysokou fumarázovou aktivitou do polymérnych gélových matríc. Takto boli prvýkrát použité v kontinuálnom procese bunky *Brevibacterium ammoniagenes* imobilizované do polyakrylamidového gélu [10]. V roku 1980 bola účinnosť procesu prípravy kyseliny L-jabľčnej zvýšená nahradením konvenčnej polyakrylamidovej metódy ekonomicky výhodnejšou metódou - použitím κ -karagénanu s imobilizovanými bakteriálnymi bunkami *Brevibacterium flavum* [11]. Produkcia kyseliny L-jabľčnej bola až 2,3-krát vyššia ako pri použití imobilizovaných buniek *Brevibacterium flavum* v polyakrylamidovom géli. Tvorba kyseliny jantárovej bola potlačená prídavkom 0,3 % žlčového extraktu, čím sa súčasne zvýšila aktivita fumarázy. Nezreagovaný fumaran bol recyklovaný a v prepočte možno teoreticky takto pripraviť 24,1 ton kyseliny jabľčnej za 1 mesiac s imobilizovanými bunkami *Brevibacterium flavum* v κ -karagénane v 1-litrovej kolóne s prietokom 300 l.h⁻¹ s 1M fumaranom sodným ako substrátom. Ďalšie výskumy boli zamerané na zvýšenie tepelnej a operačnej stability fumarázy prídavkom polyetylénimínu [12], chitózanu a AH-Sepharózy [13] alebo tanínu [14].

V roku 1982 bola popísaná podrobne nová technika imobilizácie mikroorganizmu pomocou γ -žiarenia. Použitý bol produkčný kmeň *Brevibacterium* sp. 3012, pričom tvorba nežiadúcej kyseliny jantárovej bola potlačená prídavkom kyseliny chlovej [15].

Problematika prípravy kyseliny jabľčnej bola študovaná aj pomocou imobilizovaných buniek *Escherichia coli* 85 do κ -karagénanu [16,17]. V roku 1990 bolo toto štúdium doplnené sledovaním procesu prípravy kyseliny jabľčnej z fumarátu draselného v prietokových reaktoroch s imobilizovanými bunkami *E. coli* [18].

Veľmi aktívne boli v patentovej oblasti v rokoch 1984-1989 japonské firmy, najmä fy. Mitsubishi Petrochemical Co. Vo všetkých prípadoch išlo o rôzne konverzie kyseliny fumarovej na kyselinu L-jabľčnú [19] aj v kombinácii s povrchovo aktívnymi látkami [20].

V roku 1989 bola uskutočnená 87,8 %-ná konverzia kyseliny fumarovej na kyselinu L-jablčnú pomocou bakteriálneho kmeňa *Proteus vulgaris* [21].

Kimura a kol. sledovali konverziu maleátu na jablčnan pomocou vláknitej huby *Alcaligenes* sp. T 501, ktorý bol izolovaný z pôdy, s výťažkom 98,4 % [22]. Analýzou zložiek reakčnej zmesi sa zistilo, že maleát bol konvertovaný na jablčnan cez fumarát účinkom enzýmov maleátizomerázy a fumarázy.

Problematickou prípravu kyseliny jablčnej sa zaoberalo aj niekoľko pracovných skupín v Čechách. Bola uskutočnená imobilizácia dvoch kmeňov *Brevibacterium imperiale* a *Brevibacterium* sp., ktoré boli selektívne vybraté [23]. Ako polymérne matrice boli použité polyakrylamid a Ca-alginát, pričom aktivita fumarázy bola 8,6 mmol L-jablčnanu za hodinu na 1 g buniek. V roku 1990 nadviazali na túto prácu Kučerová a Černý, ktorí študovali produkciu kyseliny jablčnej pomocou bakteriálneho kmeňa *Corynebacterium* sp. imobilizovaného v polymérnej matici alginátu vápenatého. Vo vsádzkovom procese vykazovali bunky aj po 700 dňoch 80 %-nú konverziu fumaranu na L-jablčnan. V kontinuálnom režime pri prietoku s retenčným časom 2-3 hodiny možno dosiahnuť 70-75 % konverziu [24].

Japonskí vedci popísali produkciu kyseliny jablčnej pomocou *Brevibacterium ammoniagenes* v prítomnosti rastlinných antioxidantov, ako sú polyfenoly z flavonoidov a taníny [25], prípadne saponínu [26]. Pri konverzii nebola pozorovaná tvorba kyseliny jantárovej. Čínski autori sledovali konverziu fumaranu amónneho na kyselinu L-jablčnú pomocou imobilizovaných buniek *Brevibacterium flavum* v κ -karagénane, pričom bola dosiahnutá konverzia 80 % [27]. Zaujímavá bola práca autorského kolektívu Wu a kol., v ktorej použili imobilizované bunky *Brevibacterium flavum* v κ -karagénane s kyselinou chlobovou na potlačenie tvorby kyseliny jantárovej [28].

Kvasinky

Biotechnologická produkcia kyseliny L-jablčnej z fumaranu pomocou kvasiniek má nespornú výhodu v tom, že transformačná reakcia prebieha v nerastových podmienkach bez účasti metabolickej energie, nárokov na vzdušenie s použitím intaktných buniek, resp. ich frakcií, prípadne izolovaného enzýmu fumarázy. Tento fakt prenáša dôraz na štúdium obsahu fumarázy v kvasinkách. Atraktívnym modelom by mohlo byť napr. pekárenské droždie alebo rôzne typy odpadových kvasiniek.

Doteraz bola podrobne študovaná produkcia kyseliny L-jablčnej bunkami kvasiniek z rodov *Candida* [29,30], *Pichia* [31,32,33]. Najväčšia pozornosť však bola venovaná kvasinkám z rodu *Saccharomyces*.

Začiatkom 80-tych rokov bola testovaná aktivita fumarázy 11-tich kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* konverziou sacharidického substrátu (glukóza) v aeróbných a anaeróbných podmienkach [34]. O štyri roky neskôr bola usku-

točnená rozsiahlejšia selekcia - 51 kmeňov kvasiniek z rodov *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces* a *Schizosaccharomyces* [35].

V roku 1986 bol patentovaný postup prípravy kyseliny L-jablčnej pomocou voľných a imobilizovaných buniek niekoľkých kmeňov kvasiniek *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces vini*, pričom *Candida* bola kultivovaná v médiu s n-alkánmi a kmene *Saccharomyces* v médiu s melasou [36].

V roku 1989 boli optimalizované podmienky konverzie kyseliny fumarovej na kyselinu L-jablčnú pomocou stabilizovaných fumaráz izolovaných z kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces vini* a *Candida lipolytica*. Výsledky práce poukázali napr. na hemoglobín ako na dobrý stabilizátor fumarázy kvasiniek. Optimálne podmienky pre konverziu fumarán - jablčnan pre fumarázu z kvasiniek *Saccharomyces vini* sú pH = 7,9, teplota 20 °C a koncentrácia fumaranu 1,5 - 1,7 M [37].

Začiatkom 90-tych rokov bol klonovaný gén fumarázy zo *Saccharomyces cerevisiae* do expresného vektora a transformované bunky *Saccharomyces cerevisiae* dosahovali veľmi vysoký stupeň konverzie kyselina fumarová - kyselina L-jablčná bez tvorby kyseliny jantárovej ako vedľajšieho produktu [38]. Tento kmeň bol použitý neskôr na štúdium kinetiky biokonverzie voľnými a imobilizovanými bunkami do agarózového gélu.

Urychlenie transportu substrátu, resp. produktu cez membránu buniek možno dosiahnuť prídavkom povrchovoaktívnych látok, ktoré ovplyvňujú permeabilitu membrány. Vplyv týchto látok na aktivitu fumarázy bol sledovaný aj u kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Vysoká fumarázová aktivita bola dosiahnutá použitím 0,2 % kyseliny deoxycholovej a 0,02 % cetylpyridíniumchloridu [39].

Aktivitu fumarázy voľných buniek *Saccharomyces cerevisiae* a buniek imobilizovaných v polyakrylamidovom géli porovnali brazílski autori [40], pričom pre potlačenie tvorby kyseliny jantárovej využili kyselinu malónovú, ktorá inhibuje jantarátdehydrogenázu [41]. Posudzovali aj vplyv niekoľkých ďalších povrchovo aktívnych látok na aktivitu fumarázy vo voľných a imobilizovaných bunkách. Účinným sa ukázal byť najmä detergent Triton X-100 (zvýšenie aktivity až o 60 %). Dosiahnutá bola aktivita 0,94 mmol kyseliny L-jablčnej.h⁻¹.g⁻¹ imobilizovaných buniek, čo je menej než pri použití imobilizovaných buniek *Brevibacterium ammoniagenes* (7,48 mmol kyseliny L-jablčnej.h⁻¹.g⁻¹ buniek opracovaných žľčovým extraktom). V roku 1994 bol použitý na zvýšenie permeability membrány kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* dodecylsírán sodný, čím sa aktivita fumarázy zvýšila až 60-krát (60 mmol kyseliny L-jablčnej.h⁻¹.g⁻¹ imobilizovaných buniek) oproti predchádzajúcim pokusom [42].

Z doteraz zistených poznatkov o produkcii kyseliny jablčnej je možné konštatovať, že kvasinky ako producenti kyseliny L-jablčnej predstavujú zaujímavý a atraktívny model pre priemyselnú aplikáciu (utilizácia rôznych typov odpadových kvasiniek).

Vláknité huby

Podobne ako u baktérií a kvasiniek aj u vláknitých húb nájdeme niekoľko významných producentov kyseliny L-jablčnej. Okrem sacharidických zdrojov sú schopné vláknité huby konvertovať aj niektoré nesacharidické zdroje na kyselinu jablčnú a popísaná bola aj fermentácia využívajúca zmesné kultúry vláknitých húb s baktériami alebo kvasinkami.

Jednou z rozhodujúcich podmienok pre produkciu kyseliny jablčnej vláknitými hubami je neutrálne, resp. mierne kyslé pH fermentačného média, ktoré sa udržiava prídavkom CaCO_3 na začiatku fermentácie. Počas tvorby organických kyselín dochádza postupne k rozkladu CaCO_3 , pričom vznikajú nerozpustné vápenaté soli vznikajúcich organických kyselín a súčasne sa uvoľňuje CO_2 . Nevýhodou tohto procesu je kryštalizácia vápenatých solí priamo v myceliu vláknitých húb. O niekoľko rokov neskôr bol preto nahradený CaCO_3 v tejto technológii uhličitami rozpustnými vo vode, čo umožnilo kontinuáciu celého procesu.

V 70-tych rokoch bola popísaná produkcia kyseliny L-jablčnej pomocou vláknitej huby *Schizophyllum commune*, ktorá utilizuje etanol ako základný substrát [43].

Veľká pozornosť bola venovaná aj vláknitým hubám z rodu *Paecilomyces*, ktoré transformujú nesacharidové substráty ako etanol, acetát a n-parafíny na kyselinu L-jablčnú [7]. V roku 1987 bola porovnaná aktivita fumarázy voľných a do alginátu imobilizovaných buniek *Paecilomyces varioti*. Aktivita bola približne rovnaká. Výťažok kyseliny L-jablčnej bol 73 % maximálneho teoretického výťažku po 3 dňoch. Bolo potvrdené, že pri produkcii kyseliny L-jablčnej sú aktívnejšie spóry než samotné mycelium [44].

Podrobne rozpracovaná je aj problematika produkcie kyseliny L-jablčnej pomocou vláknitých húb rodu *Aspergillus*, najmä druhmi *Aspergillus flavus* [45] a *Aspergillus oryzae* [46]. Kultivácia prebiehala na sacharidových substrátoch.

Ako už bolo v úvode spomenuté, vhodným producentom kyseliny fumarovej je vláknitá huba *Rhizopus arrhizus* [47]. Koncom 70-tych a začiatkom 80-tych rokov bolo publikovaných niekoľko prác, v ktorých autori popísali produkciu kyseliny L-jablčnej z glukózy pomocou zmesnej kultúry. Podstatou tohto procesu je použitie dvoch kmeňov v rámci jednej fermentácie, z ktorých jeden kmeň, (obyčajne vláknitá huba) má schopnosť vytvárať z glukózy kyselinu fumarovú a druhý (kvasinka, resp. baktéria) konvertuje túto kyselinu na kyselinu L-jablčnú. Takýmto spôsobom boli uskutočnené konverzie s využitím *Rhizopus arrhizus* a *Pichia membranaefaciens*, *Rhizopus chinensis* a *Pichia membranaefaciens* [48], *Rhizopus arrhizus* a *Proteus vulgaris* [49] a *Rhizopus arrhizus* a *Paecilomyces varioti* [50]. Výťažky kyseliny L-jablčnej boli 65 - 75 %, pričom vyššie výťažky boli dosiahnuté, keď najskôr prebehla konverzia glukóza - kyselina fumarová pomocou druhu *Rhizopus arrhizus* (30 hodín) a potom bol pridaný druhý mikroorganizmus (asi na 48 hodín).

V závere tejto kapitoly možno konštatovať, že príprava kyseliny L-jablčnej pomocou čistých kultúr vlákнитých húb poskytuje malé výťažky v porovnaní s baktériami a kvasinkami, ale na druhej strane využitie zmesných kultúr na produkciu kyseliny jablčnej sa zdá byť veľmi zaujímavou a perspektívnou metódou.

Moderné spôsoby prípravy kyseliny jablčnej

Podobne ako aj u iných organických kyselín, aj v prípade produkcie kyseliny L-jablčnej boli postupne klasické fermentačné technológie nahradzované modernejšími technológiami, ktoré využívajú imobilizované biokatalyzátory (bunky, enzýmy, a pod.). Z nich čoraz väčší význam nadobúdajú imobilizované bunky, a to najmä preto, že ich použitím sa fermentačný proces stáva ekonomickejším. Bunky v imobilizovanom stave sú chránené proti náhlym zmenám pH, teploty a mikrobiálnej kontaminácii. Medzi ďalšie prednosti imobilizovaných buniek patrí stabilizovanie bunkovej aktivity ako aj možnosť ich opätovného použitia. Bioreaktory s imobilizovanými bunkami obsahujú väčšiu koncentráciu buniek ako klasické fermentory, a preto možno očakávať vyššiu objemovú reakčnú rýchlosť. Vo všeobecnosti imobilizované bunky majú dlhšiu životnosť ako voľné bunky. Moderným trendom v tomto smere je imobilizácia mikrobiálnych buniek do κ -karagénanu, ktorou sa zvyšuje celková aktivita a operačná stabilita fumarázy. Navyše takto fixované bunky možno použiť v kontinuálnom režime fermentačnej prípravy kyseliny L-jablčnej. V súčasnosti sa týmto spôsobom priemyselne vyrába kyselina L-jablčná v Japonsku (fy Tanabe Seiyaku Co. Ltd., Osaka), kde sa používajú imobilizované bunky *Brevibacterium flavum* a konverzia prebieha v prietochnom kolónovom bioreaktore [11,17]. Pozitívny vplyv na rýchlosť konverzie fumaranu na L-jablčnan a na potlačenie tvorby vedľajšieho produktu, kyseliny jantárovej, ktorá sa tvorí v priebehu konverzie imobilizovanými bunkami, má prídavok povrchovo aktívnych prostriedkov (žľcový extrakt, kyselina deoxycholová, kyselina cholová a pod.), ktoré zvyšujú permeabilitu membrány. Oliveira a kol. použili na konverziu fumaranu na L-jablčnan imobilizované bunky *Saccharomyces cerevisiae* do polyakrylamidového gélu, ktoré boli čiastočne permeabilizované účinkom anionického detergentu - dodecylsírany sodného a dosiahol až 60-násobné zvýšenie aktivity oproti aktivite imobilizovaných buniek bez prídavku detergentu [42].

V posledných rokoch sa prejavuje výraznejšia snaha o efektívnejšie zhodnotenie mikrobiálnej hmoty. Cieľom je navrhnuť postupy, ktoré umožnia komplexnejšie využiť obsah mikrobiálnej bunky. Jedným z nich je bunku dezintegrovat' a získať z nej enzýmy, ktoré by sa po purifikácii a následnej imobilizácii na vhodný nosič použili na biokonverziu v kontinuálnom režime. Funkciu v týchto projektoch môže plniť rozmanitá škála mikroorganizmov. Z technologického hľadiska sa však pozornosť sústreďuje najmä na pekárenské

a kŕmne kvasinky, resp. „odpady“ klasických fermentačných technológií, ktorými sú napr. pivovarské kvasinky.

Použitie kyseliny jablčnej

Spotreba kyseliny jablčnej vo svete dosiahla v r. 1995 42000 ton a má trvale stúpajúcu tendenciu [51]. Z hľadiska použitia má kyselina jablčná rozsiahle uplatnenie. V potravinárstve slúži ako acidifikačné činidlo nealkoholických nápojov a prírodných štiav. Okrem toho je zložkou nešumivých a práškových nápojov, v ktorých zabezpečuje požadovanú kyslosť a pH. Za týmto účelom sa pridáva aj do potravín ako napr. do džemov, želatíny, kandizovaného ovocia, dezertov, cukroviniek, ovocných a zeleninových konzerv, do jogurtov, škrobových pudíngov a šalátových nálevov. V spojení s umelými sladidlami stúpla jej spotreba až o 30 %. Schopnosť kyseliny jablčnej tvoriť cheláty so stopovými množstvami kovov sa využíva pri ochrane rastlinných tukov počas spracovania. Estery kyseliny jablčnej slúžia ako prevencia proti prskaniu kuchynských tukov pri príprave jedál. Súčasné štúdie ukazujú, že kyselina jablčná je aj veľmi cenným vínnym acidifikačným činidlom a v niektorých prípadoch je jej použitie až o 30 % výhodnejšie než kyseliny citrónovej [52].

Druhou oblasťou, v ktorej má kyselina L-jablčná čoraz väčšie uplatnenie je farmaceutický priemysel. Pridáva sa do prostriedkov proti kašlu, do preparátov proti hyperanémii a je jedným z komponentov aminoacidových infúzií [53]. Jablčnan vápenatý sa používa ako stabilizátor Ca-laktátových injekcií.

Okrem potravinárstva a farmácie sa využíva kyselina jablčná aj v ďalších priemyselných odvetviach - pri výrobe čistiacich prostriedkov (patrí medzi dobré zmäkčovadlá) alebo ako chemický intermediát organických syntéz (napr. 24,25-dihydroxycholecalciferol). Schopnosť kyseliny jablčnej vytvárať s iónmi kovov komplexy a cheláty sa využíva okrem potravinárstva aj v priemyselných procesoch, kde sa vyžaduje eliminácia alebo kontrola kovových iónov, ktoré katalyzujú rozličné reakcie (napr. oxidácie). Táto vlastnosť sa využíva aj pri odstraňovaní produktov korózie alebo pri elektrolytickom pokovovaní.

Táto práca bola urobená s príspevím grantu G702.

Literatúra

1. MILSOM, P. E.: Organics acids by fermentation, especially citric acid. Food Biotechnology. Vol. 1. 1.ed. Elsevier, Amsterdam 1987. s. 273-305.
2. MATTEY, M.: The production of organic acids. Crit. Rev. Biotechnol., 12, 1992, s. 87-132.
3. BUCK, R. E. - MOTTERN, H. H.: L-malic acid as by-product in apple syrup manufactured by ion exchange. Ind. Eng. Chem., 39, 1947, s. 1087-1090.

4. NG, T. K. - HESSER, R. J. - STIEGLITZ, B. - GRIFFITHS, B. S. - LING, L. B.: Production of tetrahydrofuran-1,4-butanediol by a combined biological and chemical process. *Biotechnol. Bioengng.*, 17, 1986, s. 355-363.
5. KENEALY, W. - ZAADY, E. - STIEGLITZ, B. - GOLDBERG, I.: Biochemical aspects of fumaric acid accumulation by *Rhizopus arrhizus*. *Appl. environ. Microbiol.*, 52 (1), 1986, s. 128-133.
6. TAKAO, S. - TANIDA, M. - KUWABARA, H.: Some conditions for L-malic acid fermentation of acetate and propionate by *Paecilomyces varioti*. *J. Ferment. Technol.*, 56 (4), 1978, s. 334-338.
7. YAMAMOTO, K.: Continuous production of L-malic acid by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells. *Eur. J. appl. Microbiol.*, 3, 1976, s. 169-183.
8. Pat. US 2972 566. Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. KITAHARA, K.: L-malic acid, biochemical production. 21.2.1961.
9. MESSING, R. A.: Immobilized enzymes for industrial reactors. 1. ed. New York-London, Academic Press 1975. s. 1-10.
10. Pat. US 4 486 532. Tanabe Seiyaku Co, Ltd. (Osaka). CHIBATA, I. - TOSA, T. - SATO, T. - YAMAMOTO, K.: Process for preparing L-malic acid. 4.12.1984.
11. TAKATA, I. - YAMAMOTO, K. - TOSA, T. - CHIBATA, I.: Immobilization of *Brevibacterium flavum* with carrageenan and its application for continuous production of L-malic acid. *Enzyme microb. Technol.*, 2 (1), 1980, s. 30-36.
12. TAKATA, I. - KAYASHIMA, K. - TOSA, T. - CHIBATA, I.: Improvement of stability of fumarase activity of *Brevibacterium flavum* by immobilization with κ -carrageenan and polyethyleneimine. *J. Ferment. Technol.*, 60 (5), 1982, s. 431-437.
13. TAKATA, I. - TOSA, T. - CHIBATA, I.: Effect of growth phase on stability of fumarase activity of *Brevibacterium flavum* cells immobilized with κ -carrageenan. *Agric. biol. Chem.*, 47 (6), 1983, s. 1289-1296.
14. TAKATA, I. - TOSA, T. - CHIBATA, I.: Stability of fumarase activity of *Brevibacterium flavum* immobilized with κ -carrageenan and Chinese gallotannin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19 (2), 1984, s. 85-90.
15. TUNG-FU, L.: Preparation of immobilized microorganism (*Brevibacterium* sp. 3012) by γ -irradiation. *Radiat. Phys. Chem.*, 20 (3), 1982, s. 209-214.
16. ZUYEVA, N. N. - VERYOVKIN, A. N. - SOKOLOVA, E. N. - YAKOVLEVA, V. I.: Synthesis of L-malic acid with the aid carrageenan-immobilized *Escherichia coli* cells. *FECS Conf.*, 5, 1985, s. 41-45.
17. VERYOVKIN, A. N. - ZUEVA, N. N. - YAKOVLEVA, V. I. - SOKOLOVA, E. N.: Enzymatic synthesis of L-malic acid from fumaric acid using immobilized *Escherichia coli* 85 cells. *Priklad. Biochim. Biotechnol.*, 24, 1988, s. 35-41.
18. VERYOVKIN, A. N. - YAKOVLEVA, V. I.: Stability of biocatalysts on the basis of carrageenan-immobilized *Escherichia coli* cells in continuous production of L-malic acid. *Priklad. Biochim. Biotechnol.*, 26, 1990, s. 19-25.
19. Pat. JP 88 130 555. Mitsubishi Petrochem. Co. IMANARI, M. - IWANE, H. - KUSANO, T.: Manufacture of malic acid. 2.6.1988.
20. Pat. JP 88 160 590. Mitsubishi Petrochem. Co. YAMAGATA, H. - SATO, Y. - TERASAWA, M. - YUGAMA, H.: Manufacture of L-malic acid with fumarase-containing bacteria. 14.8.1988.
21. XIE, H. - JIANG, M.: Production of L-malic acid from fumaric acid by *Proteus vulgaris*. *Weishengwuxue Zazhi.*, 9 (4), 1989, s. 21-24.
22. KIMURA, T. - KAWABATA, Y. - SATO, E.: Enzymatic production of L-malate from maleate by *Alcaligenes* sp. *Agric. biol. Chem.*, 50, 1986, s. 89-94.
23. ČERNÝ, J. - ŠKODA, J.: Production of L-malic acid by immobilized bacterial cells of the genus *Brevibacterium*. *Coll. Czechoslov. chem. Commun.*, 51, 1986, s. 1361-1372.
24. KUČEROVÁ, H. - ŠPAČEK, B. - ČERNÝ, J.: Příprava kyseliny L-jablečné pomocí imobilizovaných bakteriálních buněk. *Kvasný prům.*, 36, 1990, s. 101-105.

25. Pat. JP 03 07 587. Seibutsu Kagaku Sangyo. KENKYUSHO Y.K. - KAWANO, T. - TAKA-BAYASHI, M.: Microbial manufacture of L-malic acid. 14.1.1991.
26. Pat. JP 03 07 588. Seibutsu Kagaku Sangyo. KENKYUSHO Y.K. - KAWANO, T. - TAKA-BAYASHI, M.: Manufacture of L-malic acid with fumarase. 14.1.1991.
27. Pat. CN 1 081 206. WANG, X. - HU, Y. - OUYANG, P.: Malic acid production by using immobilized cell. 19.10.1994.
28. Pat. CN 1 081 206. China Pharmaceutical University. WU, W. - TANG, W.: Method for preparing malic acid with immobilized *Brevibacterium*. 26.1.1994.
29. Pat. CS 171990. KRČMÁŘ, S. - SVOZIL, K. - HOMOLOVÁ, K.: Spôsob prípravy kyseliny L-jablčnej. 4.4.1974.
30. YANG, L. W. - ZHONG, L. C.: The immobilized cells of *Candida rugosa* processing fumarase activity. Wei Sheng Wusueh Pao., 20, 1980, s. 296-302.
31. ROSSI, J. - CLEMENTI, F.: L-malic acid production by polyacrylamide gel entrapped *Pichia membranaefaciens*. Biotechnol. Lett., 7 (5), 1985, s. 329-334.
32. KERUCHEN'KO, Y. S. - GLADILIN, K. L.: Isolation and properties of fumarase from the yeast *Pichia membranaefaciens*. Biochimija, 55, 1990, s. 323-328.
33. KERUCHEN'KO, Y. S. - KERUCHEN'KO, I. D. - GLADILIN, K. L.: Formation of malate by yeast of the genus *Pichia*. Priklad. Biochim. Mikrobiol., 31, 1995, s. 143-144.
34. FATICHENTI, F. - FARRIS, G. A. - DEIANA, P. - CECCARELLI, S.: Malic acid production and consumption by selected of *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic and aerobic conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 1984, s. 427-429.
35. SCHWARTZ, H. - RADLER, F.: Formation of L(-)-malate by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 27, 1988, s. 553-560.
36. Pat. SU 1 254 004. KALIS, V. E. - SKORDELIS, O. E.: Production L-malic acid. 30.8.1986.
37. SKORDELIS, O. E. - KALIS, V. E. - VIESTURE, Z. A.: Study of conditions of fumarate conversion to L-malate by yeast fumarase preparations. Priklad. Biochim. Mikrobiol., 25, 1989, s. 498-507.
38. PELEG, Y. - ROKEM, J. S. - GOLDBERG, I. - PINES, O.: Inducible overexpression of the FUM1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: Localization of fumarase and efficient fumaric acid bioconversion to L-malic acid. Appl. environ. Microbiol., 56, 1990, s. 2777-2783.
39. NEUFELD, R. J. - ROKEM, J. S. - PINES, O. - GOLDBERG, I.: L-malic acid formation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* amplified for fumarase. Enzyme Microb. Technol., 13, 1991, s. 991-996.
40. FIGUEIREDO, Z. M. B. - CARVALHO, L. B.: L-malic acid production using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Biochem. Biotechnol., 30, 1991, s. 217-224.
41. GODBOLE, S. S. - KAUL, R.: Immobilization of fumarase by entrapment of rat liver mitochondria in polyacrylamide gel using gamma rays. Biotechnol. Bioengng., 25 (1), 1983, s. 217-224.
42. OLIVEIRA, E. A. - COSTA, A. A. R. - FIGUEIREDO, Z. M.B. - CARVALHO, L. B.: L-malic acid production by entrapped *Saccharomyces cerevisiae* into polyacrylamide gell beads. Appl. Biochem. Biotechnol., 47, 1994, s. 65-72.
43. TACHIBANA, S. - MURAKAMI, T.: Effects of flavins on L-malate fermentation utilizing ethanol by *Schizophyllum commune*. J. Ferment. Technol., 52 (8), 1974, s. 511-516.
44. CAMPBELL, S. M. - TODD, J. R. - ANDERSON, J. G.: Production of L-malic acid by *Paecilomyces varioti*. Biotechnol. Lett., 9 (6), 1987, s. 393-398.
45. PELEG, Y. - RAHAMIM, E. - KESSEL, M. - GOLDBERG, I.: Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. II. Crystals and hair-like processes formed by *A. flavus* in a L-malic acid production medium. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 1988, s. 76-79.
46. ŠPILDA, L. a kol.: Výskum technológie výroby kyseliny jablčnej. [Správa pre kontrolný deň.] Bratislava, Ústav biotechnológie STU 1990. s. 60.
47. GOLDBERG, I. - STIEGLITZ, B.: Improved rate of fumaric acid production by Tweens and vegetable oils in *Rhizopus arrhizus*. Biotechnol. Bioengng., 27, 1985, s. 1067-1069.

48. TAKAO, S. - KONDO, Y. - TANIDA, M.: Conversion of fumaric acid fermentation to L-malic acid fermentation by the association of *Rhizopus arrhizus* and *Pichia membranaefaciens*. Agric. biol. Chem., 42 (9), 1978, s. 1793-1794.
49. TAKAO, S. - HOTTA, K.: L-malic acid fermentation by mixed culture *Rhizopus arrhizus* and *Proteus vulgaris*. Agric. biol. Chem., 41 (6), 1977, s. 945-950.
50. TAKAO, S. - YOKOTA, A. - TANIDA, M.: L-malic acid fermentation by a mixed culture of *Rhizopus arrhizus* and *Paecilomyces varioti*. J. Ferment. Technol., 61 (6), 1983, s. 643-645.
51. FROST & SULLIVAN Inc., New York: European Food Acids Market. 1995.
52. BUECHSENSTEIN, J. - OUGH, C. S.: Comparison of citric, d,l-malic and fumaric acid as wine acidulants. Amer. J. Enol. Viticult., 30 (2), 1979, s. 93.
53. PELEG, Y. - STIEGLITZ, B. - GOLDBERG, I.: Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. I. Biochemical aspects of acid biosynthesis. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 1988, s. 69-75.

Do redakcie došlo 19.9.1996.

Microbial production and use of malic acid

HELENA MIKOVÁ - MICHAL ROSENBERG - ĽUDMILA KRIŠTOFÍKOVÁ

SUMMARY. Actual knowledge on malic acid utilization in food industry, pharmacy, and other industrial spheres is given. The malic acid is used as a food and drink acidulant. It is produced commercially by two processes - either by chemical synthesis via catalytic hydration of maleic or fumaric acid, or by enzymatic conversion of fumaric acid to L-malic acid through the fumarase-containing cells.