

Možnosti využitia izomeráz a oxidoreduktáz na prípravu *L*-hexóz a ketohexóz

VLADIMÍR MASTIHUBA—MICHAL UHER

Súhrn: Príspevok uvádza poznatky o enzýmových a mikrobiálnych metódach syntézy *L*-hexóz a ketohexóz využiteľných ako nekalorické, alebo nízkoenergetické sladidlá.

Mnohé monosacharidy nachádzajú využitie vo farmácii [1, 2] a v asymetrickej organickej syntéze [3, 4]. Dôvodom hľadania jednoduchej a lacnej syntézy niektorých vzácných hexóz sa stalo patentovanie ich využitia ako nízkoenergetických sladidiel v potravinárstve. Ide najmä o *L*-hexózy, ktoré majú veľmi podobné fyzikálne a senzorické vlastnosti ako ich *D*-analógy, no v ľudskom organizme sa takmer nemetabolizujú [5—7]. V porovnaní s inými umelými sladidlami tieto cukry nemajú vedľajšie pachute, ich sladká chuť nie je taká koncentrovaná a pritom majú vzhľad normálneho cukru, takže napríklad v pekárenských a pečivárenských výrobkoch nie je potrebné dopĺňať objem nahradeného cukru iným materiálom. Výrobky sladené *L*-hexózami, alebo prípravkami, ktoré ich obsahujú, sú odolnejšie proti mikrobiálnemu rozkladu a nepodporujú vznik zubného kazu, ako je to naopak v prípade použitia *D*-glukózy alebo sacharózy. Patentované, alebo publikované bolo takéto využitie *L*-fruktózy, *L*-glukózy, *L*-galaktózy, *L*-tagatózy, *L*-alózy, *L*-gulózy, *L*-altrózy, *L*-idózy, *L*-talózy a *L*-psikózy [5—7], ako aj *D*-talózy, *D*-tagatózy a *D*-alózy [8, 9]. Okrem toho bolo patentované aj využitie vzácných cukrov v insekticídnych prípravkoch. Cukor, ktorý neprechádza cez membránu tráviaceho traktu, spôsobuje dehydratáciu organizmu hmyzu a jeho uhynutie [10].

Shallenberger a kol. [11] porovnávali sladivosť *D*- a *L*-monosacharidov s rôznym počtom uhlíkov. Na porovnávanie sladivosti použili pri panelovom teste

Ing. Vladimír Mastihuba, doc. Ing. Michal Uher, CSc., Katedra organickej chémie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

10% roztoky a pri stanovení pomeru sladivosti porovnávali dvojice jednotlivých sacharidov Bergovou metódou [12]. Výsledky testu sú zhrnuté v tab. 1.

Tabuľka 1
Table 1

Sacharid ¹	<i>D</i> -rad ²	<i>L</i> -rad ³
Arabinóza ⁴	5,2	5,6
Xylóza ⁵	4,6	4,4
Glukóza ⁶	5,4	6,0
Ramnóza ⁷	4,6	6,5
Manóza ⁸	4,9	5,0
Galaktóza ⁹	5,6	6,0
Fruktóza ¹⁰	veľmi sladká ¹¹	veľmi sladká ¹¹

¹Saccharide; ²*D*-series; ³*L*-series; ⁴Arabinose; ⁵Xylose; ⁶Glucose; ⁷Rhamnose; ⁸Mannose; ⁹Galactose; ¹⁰Fructose; ¹¹Very sweet.

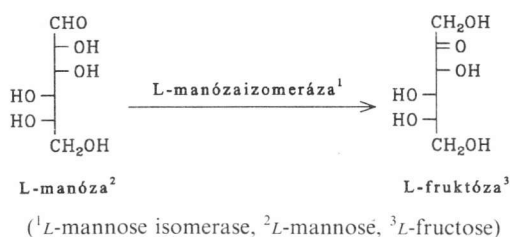
Klasické spôsoby prípravy hexóz sa zakladajú na predlžovaní uhlíkového reťazca príslušných pentóz Sowden-Fischerovou, nitrometánovu alebo diazometánovou metódou, na redukciu laktónov aldónových alebo aldurónových kyselín, alebo na epimerácii, resp. izomerácii iných hexóz [7, 13, 14]. Alternatívou k týmto najpoužívanejším postupom by mohla byť enzymatická, resp. mikrobiálna syntéza s využitím znalostí o metabolizme sacharidov v prírode.

Na produkciu monosacharidov možno použiť veľkú škálu enzýmov rôzneho pôvodu i účinku [15, 16]. Na syntézu nemodifikovaných hexóz pre potravinárske účely sú však najvhodnejšie enzýmy z triedy izomeráz a oxidoreduktáz, ktoré sa už využívajú pre tonážnu výrobu *D*-fruktózy a *L*-sorbózy, buď vo forme izolovaných enzýmov, buď celých mikrobiálnych buniek [17].

Nevýhodou použitia izomeráz na prípravu ketóz je ušľachovanie rovnováhy reakcie s nízkou koncentráciou produktu, čo z praktického hľadiska znamená, že treba posúvať túto rovnováhu napr. komplexáciou ketózy s borátmi [18], alebo produkt separovať po ukončení syntézy. Rovnováha sa však ustáľuje pomerne rýchlo a pri izomerácii možno použiť oveľa vyššie počiatočné koncentrácie substrátu, ako v prípade použitia oxidoreduktáz.

Fyziologickou úlohou izomeráz, využívaných na prípravu vzácnych cukrov, je syntéza ketóz, ktoré sa potom fosforylujú kinázami a ďalej zapájajú do niektorej z metabolických dráh monosacharidov. Syntéza týchto izomeráz je indukateľný proces, čo sa využíva napríklad pri príprave *L*-fruktózy z *L*-manózy izomerázou z *Klebsiella pneumoniae*, ktorej syntéza bola indukovaná rastom organizmu na médiu obsahujúcom *L*-ramnózu [19, 20].

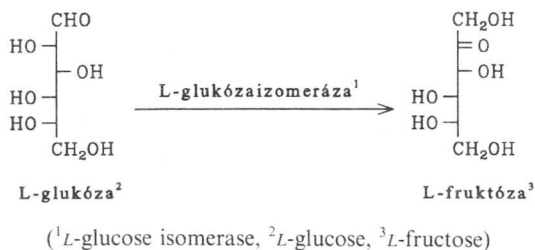
Schéma 1



Horwath a Colonna [21] patentovali prípravu *L*-fruktózy tým istým enzýmom, ale z ekonomických dôvodov (vysoká cena *L*-ramnózy) uprednostňujú mutáciu produkčného mikroorganizmu fyzikálnymi alebo chemickými spôsobmi. Okrem *Klebsiella aerogenes* dobrými producentmi enzýmov izomerujúcich *L*-manózu sú mutanty baktérií *Escherichia coli* a *Lactobacillus plantarum* [21]. Kvasinky *Candida utilis* vyrastené na médiu obsahujúcom *D*-xylózu produkujú xylózaizomerázu schopnú izomerovať *D*- a *L*-xylózu. Je známe, že *D*-xylózaizomerázy intenzívne izomerujú aj *D*-glukózu, preto sa analogicky robili pokusy o izomeráciu *L*-glukózy celými bunkami aj izolovaným enzýmom z uvedeného kvasinkového kmeňa [18].

L-Glukóza, resp. *L*-manóza sa v týchto prípadoch získavali izoláciou zo zmesi po syntéze z *L*-arabínózy. Patentovaná však bola aj priama aplikácia buniek *Klebsiella aerogenes* na túto zmes bez predchádzajúcej separácie *L*-manózy [21].

Schéma 2

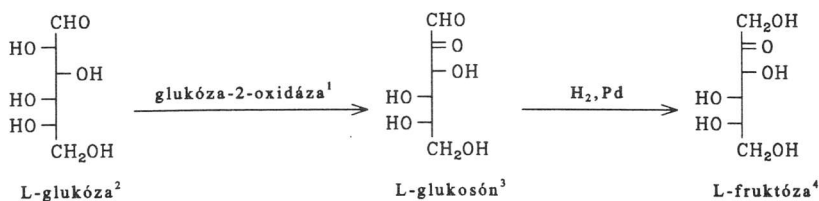


Ak sa na syntézu monosacharidov použijú oxidoreduktázy, produktom sú väčšinou takisto ketózy, s výnimkou reakcií katalyzovaných oxidázami. Východiskovým materiálom sú buď aldózy, buď príslušné polyhydroxyalkoholy, ktoré sa pripravujú chemickou redukciou iných hexóz. Najväčší záujem je opäť o prípravu *L*-fruktózy, ktorá má spomedzi uvedených hexóz najvyššie sladivé účinky.

Kombináciou enzýmovej a chemickej cesty pri príprave *L*-fruktózy je oxidácia *L*-glukózy na *L*-glukosón, pomerne málo špecifickou glukóza-2-oxidázou, produkovanou vláknitými hubami rodov *Polyporus*, *Aspergillus*, *Oudemansiella*

atď., následovnou katalytickou redukciou osónu na ketózu. Oxidácia prebiehala kvantitatívne, pričom sa vznikajúci peroxid vodíka rozkladal prídavkom katalázy do reakčného prostredia [22].

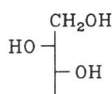
Schéma 3



(¹glucose-2-oxidase, ²L-glucose, ³L-glucosone, ⁴L-fructose)

V roku 1956 Shaw [23] pri štúdiu tvorby adaptívnych polyoldehydrogenáz baktériami z kmeňa *Pseudomonas* zistil, že tieto baktérie produkujú *D*-iditoldehydrogenázu, indukovateľnú prítomnosťou galaktitolu v rastovom médiu. Tento enzým je schopný oxidovať polyoly s *D*-treo konfiguráciou hydroxylových skupín vedľa primárnej hydroxylovej skupiny.

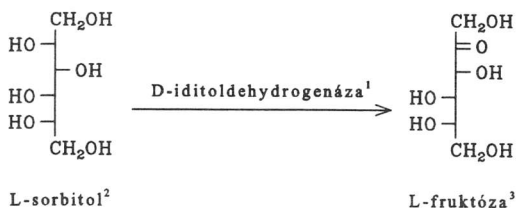
Schéma 4



D-treo¹

Na základe tohto poznatku Horwath a Colonna patentovali prípravu *L*-fruktózy oxidáciou *L*-sorbitolu bunkovými extraktmi mutantov *Pseudomonas fluorescens* [24]. *D*-Iditoldehydrogenáza je pomerne nestabilný enzým, schopný oxidovať aj *D*-talitol a *L*-xylitol na *D*-psikózu a *L*-xylulózu.

Schéma 5

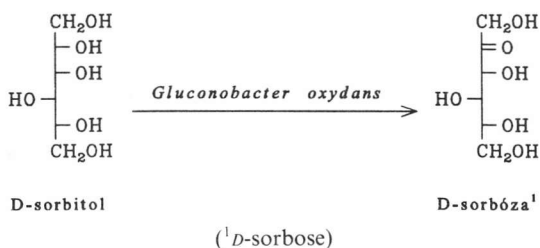


(¹*D*-iditol dehydrogenase, ²*L*-sorbitol, ³*L*-fructose)

Spolu s týmto enzýmom sa indukovala aj tvorba galaktitoldehydrogenázy, ktorá špecificky oxiduje polyoly s *L*-treo konfiguráciou vedľa primárnej alkohollickej skupiny a oxiduje galaktitol na *D*-tagatózu [23].

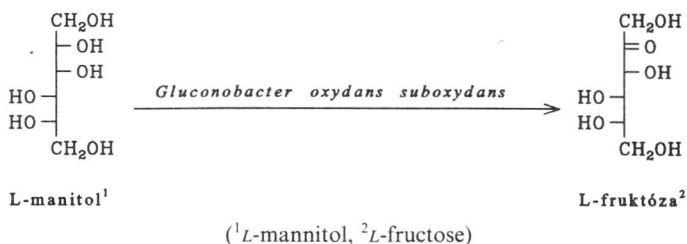
Dhawale a kol. [25, 26] opisujú oxidáciu *D*-sorbitolu na *D*-sorbózu a *L*-manitolu na *L*-fruktózu pomocou *Gluconobacter oxydans* vo výťažkoch nad 60 %.

Schéma 6



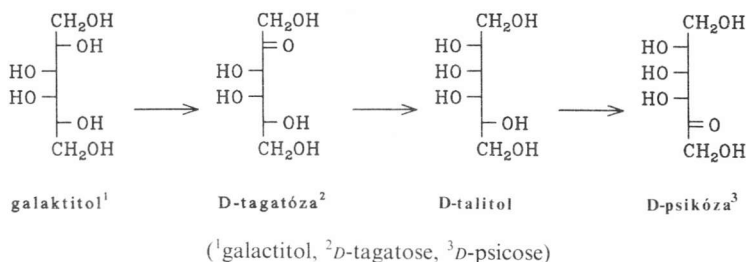
Arena a Bruckner zasa patentovali oxidáciu *L*-manitolu bunkami *Gluconobacter oxydans suboxydans* a *Acetobacter pasteurianus* [27].

Schéma 7



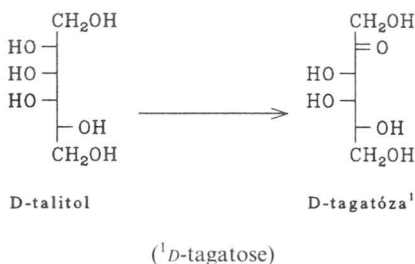
Možným riešením prípravy *D*-tagatózy je oxidácia galaktitolu pôdnymi baktériami vyrastenými na *L*-sorbóze. Izumori a kol. [28, 29] tak s použitím celých buniek *Mycobacterium smegmatis* dosiahli 60% a s *Arthrobacter globiformis* dokonca až 85% výťažky tohto cukru. Zaujímavé je, že indukcia daných enzýmov bola vyvolaná substrátom, ktorý sa sám osebe nemetabolizuje v tej istej dráhe ako galaktitol. Premena galaktitolu sa však nemusí zastaviť pri tvorbe *D*-tagatózy, ale po ďalšej redukcii a dehydrogenácii sa cez talitol môže tvoriť až *D*-psikóza, ako sa to až v 70 % výťažku podarilo pri *Alcaligenes* sp. 701B. Premena tagatózy dosahovala 80 % [30].

Schéma 8



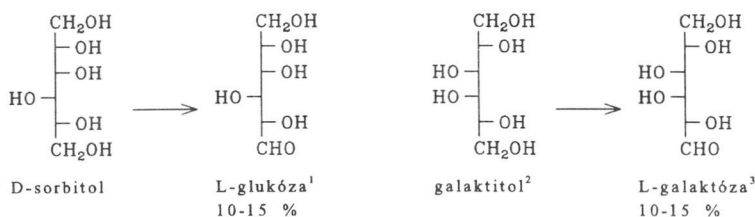
Naproti tomu v prípade použitia *Acetobacter suboxydans* sa talitol oxidoval na D-tagatózu [31].

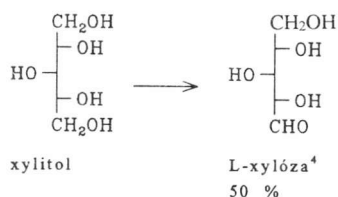
Schéma 9



Galaktózaoxidáza, produkovaná niektorými hubami z rodov *Giberella*, *Dactylium*, *Beltraniella*, *Polyporus* a *Fusarium* [32—36], okrem toho, že oxiduje D-galaktózu na galakto-1,6-dialdehyd, katalyzuje aj oxidáciu niektorých polyolov s rovnakou konfiguráciou hydroxylových skupín. Takto sa pripravila okrem iných aj L-glukóza, L-galaktóza a L-xylóza [37]. Nevýhodou je, že galaktózaoxidáza neoxiduje ani svoje prirodzené substráty kompletne [38] a výťažky uvedených cukrov sú nízke [37].

Schéma 10





(¹L-glucose, ²galactitol, ³L-galactose, ⁴L-xylose)

Záver

V práci sme opísali metódy enzýmovej a mikrobiálnej syntézy vzácnych hexóz so zameraním na syntézy *L*-fruktózy, *L*-galaktózy, *L*-glukózy, *D*-tagatózy a *D*-psikózy. Tieto monosacharidy sú využiteľné predovšetkým ako nízkoenergetické sladidlá v potravinárskej výrobe.

Literatúra

1. NICOLOU, K. C.—DAINES, R. A.—UENISHI, J.—LI, W. S.—PAPAHATJIS, D. P.—CHAKRABORTY, T. K., J. Am. Chem. Soc., 109, 1987, s. 2205
2. MINSTER, D. K.—HECHT, S. H., J. Org. Chem., 43, 1978, s. 3987.
3. GIANNIS, A.—HENK, T., Tetrahedron Lett., 1990, s. 1253.
4. KUNZ, H.—PFRENGLE, W., J. Am. Chem. Soc., 110, 1988, s. 651.
5. SZAREK, W. A.—HAY, G. W.—VYAS, D. M.—ISON, E. R.—HRONOWSKI, L. J. J., Can. J. Chem., 62, 1984, s. 671.
6. LEVIN, G. V., Food. Sci. Technol., 17, 1986, s. 155.
7. USA patent 4,262,032 (1981).
8. USA patent 4,963,382 (1990) [Chem. Abstr., 114, 100204 (1991)].
9. Európska patentová prihláška 257 626 (1988) [Chem. Abstr., 109, 36888 (1988)].
10. Európska patentová prihláška 397 027 (1990) [Chem. Abstr., 114, 242827 (1991)].
11. SHALLENBERGER, R. S.—ACREE, T. E.—LEE, C. Y., Nature, 221, 1969, s. 555.
12. BERG, C. P., Physiol. Rev., 33, 1953, s. 145.
13. SOWDEN, J. C.—FISCHER, H. O. L., J. Am. Chem. Soc., 69, 1947, s. 1963.
14. USA patent 4,371,616 (1983).
15. DRUECKHAMMER, D. G.—HENNEN, W. J.—PEDERSON, R. L.—BARBAS, C. F.—GAUTHERON, C. M.—KRACH, T.—WONG, C. H., Synthesis, 1991, s. 499.
16. TOONE, E. J.—SIMON, E. S.—BEDNARSKI, M. D.—WHITESIDES, G. M., Tetrahedron, 45, 1989, s. 5365.
17. PELECHOVÁ, J.—KULHÁNEK, M.—GRAMANOVÁ, I.—KRAJČÍ, J.—HEŘMÁNKOVÁ, V.—STANĚK, J., Jr., Acta Biotechnol., 9, 1989, s. 211.
18. USA patent 4,463,093 (1984).
19. MAYO, J. W.—ANDERSON, R. L., J. Biol. Chem., 243, 1968, s. 6330.
20. MAYO, J. W.—ANDERSON, R. L., Carbohydr. Res., 8, 1968, s. 344.

21. USA patent 4,492,755 (1985).
22. USA patent 4,440,855 (1984).
23. SHAW, D. R. D., *J. Biol. Chem.*, **64**, 1956, s. 394.
24. USA patent 4,467,033 (1984).
25. DHAWALE, M. R.—KROPINSKI, A. M. B.—HAY, G. W.—SZAREK, W. A., *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 1984, s. 5.
26. DHAWALE, M. R.—SZAREK, W. A.—HAY, G. W.—KROPINSKI, A. M. B., *Carbohydr. Res.*, **155**, 1986, s. 262.
27. USA patent 4,734,366 (1988) [*Chem. Abstr.*, **109**, 21648 (1989)].
28. IZUMORI, K.—TSUZAKI, K., *J. Ferment. Technol.*, **66**, 1988, s. 225.
29. IZUMORI, K.—MIYOSHI, T.—TOKUDA, S.—YAMABE, K., *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1984, s. 1055.
30. IZUMORI, K.—YAMAKITA, M.—TSUMURA, T.—KOBAYASHI, H., *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 1990, s. 26.
31. TOTTON, E. L.—LARDY, H. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1949, s. 3076.
32. AISAKA, K.—UWAJIMA, T.—TERADA, O., *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1984, s. 1425.
33. PEDROSA, F. O.—ZANCAN, G. T., *Exp. Mycol.*, **10**, 1986, s. 126.
34. KOROLEVA, O. V.—RABINOVICH, M. L.—BUGLOVA, T. T.—JAROPOLOV, A. I., *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, **19**, 1983, s. 632.
35. Jap. patent 106,590 (1981) [*Chem. Abstr.*, **96**, 33374 (1982)].
36. AVIGAD, G.—BRETONES, C. A.—AMARAL, D.—HORECKER, B. L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **4**, 1961, s. 474.
37. ROOT, R. L.—DURRWACHTER, J. R.—WONG, C. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 1985, s. 2997.
38. MATSUMURA, S.—KURODA, A.—HIGAKI, N.—HIRUTA, Y.—YOSHIKAWA, S., *Chem. Lett.*, 1988, s. 1747.

Do redakcie došlo: 24. 2. 1992

Possibilities of use of isomerases and oxidoreductases for the preparation of *L*-hexoses and ketohexoses

Summary

The paper reviews information about enzymatic and microbial ways of synthesis of *L*-hexoses and ketohexoses, possibly applicable as alternative non- or low-calorie sweeteners.

Возможности использования изомераз и оксидоредуктаз для подготовки *L*-гексоз и кетогексоз

Резюме

В работе приведены знания о энзиматических и микробиологических методах синтеза *L*-гексоз и кетогексоз, которые можно применять в качестве некалорийных или низкоэнергетических подсластителей.