

leniem содержания сорбиновой кислоты в винах. Квас. прум., 36, 1990, № 4, стр. 99—101.

Byl разработан быстродействующий и простой метод HPLC определения содержания сорбиновой кислоты в винах. Время определения 2—3 минуты. Для изолирования сорбиновой кислоты из матрицы можно выгодно применить колонки отечественного производства. Метод подходит для исследования содержания сорбиновой кислоты в уровнях 0,1 мг. л⁻¹ и он применим не только для вина, а также и для других изделий промышленности напитков.

Špinar, B. - Kellner, V. - Čulík, J.: Sorbic Acid Determination in Wines Using HPLC. Kvas. prŭm., 36, 1990, No. 4, pp 99—101.

A rapid and simple HPLC method for the determination of sorbic acid in wines was developed. The time

of the determination is from 2 to 3 minutes. The isolation of sorbic acid from matrix can be performed in the column of a domestic provenience. The method is suitable for the detection of sorbic acid above 0,1 mg. l⁻¹ and it can be used not only with wines but with other beverages as well.

Špinar, B. - Kellner, V. - Čulík, J.: HPLC-Bestimmung des Sorbins-Säuregehalts in Weinen. Kvas. prŭm., 36, 1990, Nr. 4, S. 99—101.

Es wurde eine schnelle und einfache HPLC-Methode der Bestimmung des Sorbinsäuregehalts in Wein entwickelt. Die Bestimmungsdauer beträgt 2 bis 3 Minuten. Zur Isolation der Sorbinsäure aus der Matrix können mit Vorteil Kolonnen inländischer Provenienz angewandt werden. Die Methode ist für die Ermittlung des Sorbinsäuregehalts im Niveau über 0,1 mg. l⁻¹ geeignet und kann nicht nur bei Wein, sondern auch bei anderen Erzeugnissen der Getränkeindustrie appliziert werden.

Příprava kyseliny L-jablečné pomocí imobilizovaných bakteriálních buněk

Ing. HANA KUČEROVÁ, Ing. BOHUMIL ŠPAČEK, CSc., Konzervárny a lihovary, státní podnik vědeckotechnických a obchodních služeb,

Ing. JAROSLAV ČERNÝ, CSc., Ústav organické chemie a biochemie ČSAV.

Klíčová slova: Kyselina L-jablečná, kyselina fumarová, imobilizace buněk, alginát, kontinuální příprava kyseliny L-jablečné.

1. ÚVOD

Imobilizace biokatalyzátorů — enzymů, organel, mikrobiálních a rostlinných buněk a jiných biologických systémů — je v současné době předmětem celosvětové pozornosti. Imobilizované biokatalyzátory uskutečňují biochemické reakce za mnohem stabilnějších podmínek než jejich volné formy a celý proces je mnohem výhodnější z hlediska ekonomických ukazatelů. S rozvojem technik imobilizací celých buněk v 70. letech se objevila řada studií o možném využití imobilizovaných buněk pro přípravu organických kyselin [1].

V poslední době stoupá poptávka po kyselině L-jablečné vzhledem k jejímu využití v potravinářství (např. ochucovadlo v nealkoholických nápojích, cukrovinkách, ovocných a zeleninových konzervách), farmaceutickém průmyslu, medicíně, zpracování kovů, výrobě čistících prostředků atd. Organickou syntézou vzniká směs D-formy a L-formy; L-izomer se získává např. izolací z přírodních šťáv nebo rozdělením směsi izomerů. Žádný z uvedených způsobů však není technologicky příliš efektivní. Bylo proto vyvinuto značné úsilí k vypracování ekonomicky výhodné přípravy kyseliny L-jablečné pomocí buněk mikroorganismů. Jako surovina pro fermentační přípravu byl studován ethanol [2], n-parafin [3] a acetat [4]. Tyto práce mají však pouze teoretický význam, protože jejich efektivnost není pro eventuelní průmyslovou aplikaci dostatečně vysoká.

Zatím jedinou ekonomicky výhodnou přípravou je využití enzymové transformace kyseliny fumarové [5]. Na tomto principu je založen doposud jediný průmyslově využitý postup k přípravě kyseliny L-jablečné, který vyvinula japonská firma Tanabe Seiyaku Co., Ltd. V kontinuálním procesu bylo zpočátku používáno buněk *Brevibacterium ammoniagenes*, imobilizovaných v polyakrylamidovém gelu [5], v současné době byla účinnost procesu zvýšena zavedením nového kmene *Brevibacterium flavum* a použitím α -carrageenanu jako nosné matrice [6]. Produktivita imobilizovaných buněk dosahuje za optimálních podmínek 42 kg kyseliny L-jablečné za hodinu v koloně o objemu 1 000 l.

Příprava kyseliny L-jablečné enzymovou transformací kyseliny fumarové byla studována v Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV. Byl ověřen nejen postup japonských autorů, ale i další možnosti, které by mohly přispět k řešení problematiky. Byly nalezeny bakteriální kmeny s vysokou schopností konverze fumarátu na L-

malát a byly určeny optimální podmínky pro jejich využití [1]. Tyto základní poznatky byly předány do Výzkumného ústavu koncernu Konzervárny a lihovary, jehož úkolem bylo vypracovat nový pracovní postup, umožňující ekonomicky přijatelnou přípravu kyseliny L-jablečné imobilizovanými mikrobiálními buňkami, využitými v kontinuálním procesu.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 Mikroorganismus a médium

Z řady mikroorganismů byl vybrán pro vysokou transformační aktivitu přeměny fumarátu na L-malát, pro vysokou stabilitu a možnost různých zásahů do procesu imobilizace bez ovlivnění aktivity přírodní izolát, určený v Čs. sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně jako *Corynebacterium species*.

Kultivace se prováděly v kompletním médiu (KM) o složení: živný bujón č. 1 (8 g), kyselý hydrolyzát kaseinu (5 g), kvasničný autolyzát (10 g), pitná voda (k doplnění na 1000 ml), pH 7,0 (úprava NaOH). Dále se používalo médium o složení: kyselý hydrolyzát arašidové mouky (250 ml), kvasničný autolyzát (5 g), pitná voda (k doplnění na 1000 ml), pH 7,0 (úprava NaOH). Obě média byla sterilována při 120 °C 30 minut.

Kmen byl udržován na agaru KM a pasážován po 30 dnech, dlouhodobě byl uložen v 15% vodném roztoku glycerolu při -20 °C.

2.2 Kultivace

100 ml Erlenmayerovy baňky s 10 ml média byly očkované kmenem vyrostlým na šikmém agaru. Po 24 hodinách kultivace na rotační třepačce (frekvence otáček 190 min⁻¹) při 37 °C byly zaočkovány 1 ml tohoto inkulu 500 ml varné baňky se 100 ml média. Tyto baňky byly opět inkubovány na rotační třepačce při 37 °C po dobu 24 až 30 hodin.

Fermentor o celkovém plnicím obsahu 75 l (Bioengineering, Švýcarsko) byl plněn 35 l média a očkován 0,7 l inkulu, narostlého v 500 ml baňkách za 24 hodin. Kultivace probíhala 30 až 52 hodin při 37 °C, vzdušnění 8,5 l/min a frekvenci otáček míchadla 400 za minutu. Počáteční pH 7,0 nebylo během fermentace regulováno.

2.3 Příprava imobilizátu

Bakteriální buňky byly imobilizovány po zkoncentrování z růstového média metodou zachycení v polymerní matici alginátu vápenatého [7, 8].

Alginátový imobilizát byl připravován ze směsi: alginát sodný (LF 10/60) 2 %, buněčná pasta bakteriálních buněk (20 % sušiny) 15 %, destilovaná voda 83 %. Viskózní roztok alginátu sodného byl zhotoven z potřebného množství alginátu a asi 2/3 potřebného množství vody. Buňky získané odstředěním z kultivačního média při frekvenci 3000 otáček za minutu po dobu 15 minut byly po promytí fyziologickým roztokem rozmíchány ve zbylém množství vody a přidány k roztoku alginátu. Tato suspenze byla po dokonalém promíchání kapána kapilárami do 1 % roztoku chloridu vápenatého. Vytvořené kuličky o průměru asi 4 mm byly v roztoku ponechány 3 hodiny za stálého míchání za účelem vytvrzení (1 g alginátu naváže 0,065 g iontů Ca^{2+}). V některých případech, aby se zvýšila pevnost a stabilita imobilizátu, byly částice sušeny při teplotě 30 °C po dobu 16 až 20 hodin. Po usušení byl imobilizát máčen 30 minut v roztoku chloridu vápenatého ($c = 0,5 \text{ mol/l}$) nebo v roztoku síranu hlinitého ($c = 0,1 \text{ mol/l}$). Sušený i nesušený imobilizát byl promýván fyziologickým roztokem a pak aktivován v roztoku fumarátu sodného ($c = 1 \text{ mol/l}$) s přidavkem detergentu, buď stáním při laboratorní teplotě nebo inkubací při 37 °C na třepačce po dobu 8 až 20 hodin. Po promytí fyziologickým roztokem byl imobilizát připraven k použití, popř. byl uschován v roztoku fumarátu sodného ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) při 5 °C.

2.4 Analytické metody

2.4.1 Stanovení dikarboxylových kyselin

Za předpokladu minimální tvorby vedlejších produktů lze tvorbu kyseliny L-jablečné sledovat na úbytku kyseliny fumarové. Kyselina fumarová byla stanovena UV spektroskopii při 250 nm v acetátovém tlumivém roztoku (pH 8,0) [9]. Přesné složení produkční směsi dikarboxylových kyselin bylo určeno kapalinovou chromatografií za použití náplně kolony Ostion LGKS 0800 (katex H+).

2.4.2 Stanovení transformační aktivity intaktních buněk

Transformační aktivita intaktních buněk byla určena následujícím způsobem: do 100 ml Erlenmayerovy baňky bylo k přesné navážce buněčné pasty bakteriálních buněk (asi 0,5 g) přidáno 10 ml fumarátu sodného ($c = 1 \text{ mol/l}$) s 0,02 % CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) a po dokonalém rozmíchání byla suspenze inkubována při 37 °C na rotační třepačce po dobu 2 hodin. Poté byly buňky ihned odděleny centrifugací (při frekvenci otáček 3000 za minutu, 15 minut) a v supernatantu bylo stanoveno množství kyseliny L-jablečné. Aktivita buněk je vyjádřena množstvím kyseliny L-jablečné vytvořené 1 g buněčné pasty bakteriálních buněk za 1 hodinu v jednotkovém objemu substrátu.

2.4.3 Stanovení transformační aktivity imobilizovaných buněk

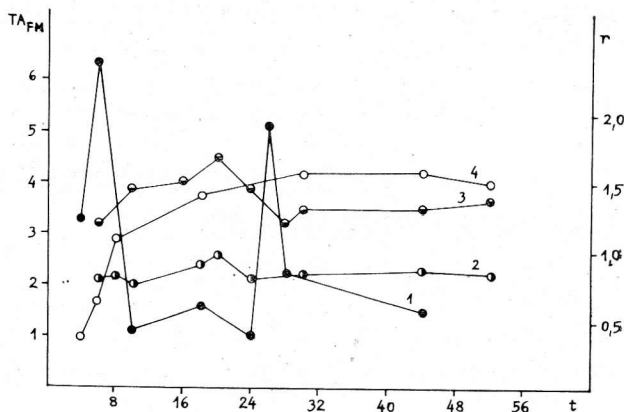
Aktivita imobilizovaných buněk byla v dlouhodobých pokusech vyjadřována stupněm konverze kyseliny fumarové na kyselinu L-jablečnou za určitý časový úsek, popř. byla vyjádřena stejným způsobem jako u intaktních buněk. Stanovení bylo provedeno takto: imobilizát s přesně definovaným množstvím buněk byl inkubován v určitém množství roztoku fumarátu sodného ($c = 1 \text{ mol/l}$) při 37 °C na třepačce po určitou dobu. Poté byl odebrán vzorek substrátu na stanovení dikarboxylových kyselin.

Množství buněk v imobilizátu bylo stanoveno po rozpuštění gelové matrice v 3 % roztoku citronanu sodného za stálého míchání při 30 °C. Uvolněné bakterie byly zkoncentrovány centrifugací a dokonale promyty fyziologickým roztokem. Po další centrifugaci bylo jejich množství určeno gravimetricky (sušení 3 hodiny při 105 °C). Pomocí kalibrační křivky byla provedena korekce na množství buněčné pasty bakteriálních buněk.

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Vliv růstové fáze mikroorganismu na transformační aktivitu přeměny fumarátu v L-malát a fumarátu v sukcinát

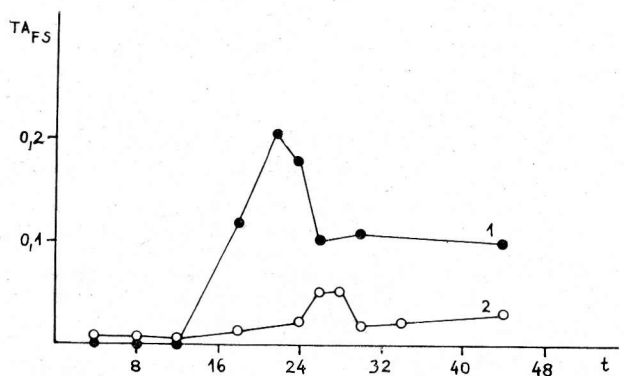
Transformační aktivita přeměny fumarátu v L-malát se mění v závislosti na stáří buněk. Bylo tedy nutno určit, v které fázi růstu buněk je nejvýhodnější připravit imobilizát. Závislost sledovaná od počátku logaritmické fáze až do fáze poklesu vykazuje u intaktních buněk výrazná maxima kolem 6. a 26. kultivační hodiny, u imobilizovaných buněk bylo zvýšení aktivity zaznamenáno pouze kolem 20. hodiny kultivace, jinak se hodnoty aktivity udržovaly na konstantní hladině (obr. 1). To by



Obr. 1. Závislost transformační aktivity přeměny fumarátu v L-malát na fyziologickém stáří buněk
 T_{AFM} — transformační aktivita přeměny fumarátu v L-malát (mmol/g.h), r — nárůst buněk (g buněčné pasty bakteriálních buněk/100 ml média), t — fyziologické stáří buněk (h), 1 — T_{AFM} pro intaktní buňky, 2 — T_{AFM} pro imobilizované buňky aktivované CTAB, 3 — T_{AFM} pro imobilizované buňky aktivované Fel tauri, 4 — nárůst buněk

znamenalo, že kolísání transformační aktivity intaktních buněk lze přičíst spíše změnám susceptibilitu buněčné stěny a tím i změnám difúzní bariéry pro substrát než změnám ve výši hladiny fumarasy.

Protože v reakční směsi nevzniká pouze L-malát ale i sukcinát, byla studována též závislost tvorby sukcinátu na fyziologickém stáří buněk (obr. 2). Výraznější trans-



Obr. 2. Závislost transformační aktivity přeměny fumarátu v sukcinát na fyziologickém stáří buněk
 T_{AFS} je transformační aktivita přeměny fumarátu v sukcinát (mmol/g.h), t — fyziologické stáří buněk (h), 1 — intaktní buňky 2 — imobilizované buňky

formační aktivita přeměny fumarátu v sukcinát byla zaznamenána mezi 20. až 24. hodinou kultivace, u imobilizovaných buněk je množství sukcinátu podstatně nižší.

Tabulka 1. Vliv močoviny a zvýšené teploty na transformaci fumarátu v L-malát u intaktních buněk *Corynebacterium species* v různých fázích růstu

Externí faktory ^b	Zbytková transformační aktivita (%) ^a				
	Růstová fáze (h)				
	10	22	32	42	52
teplota (60 °C, 60 minut)	3	9	15	19	12
močovina (2 mol/l, 37 °C 30, minut)	32	68	82	86	75

a) transformační aktivita nezpracovaných bakteriálních buněk představuje 100 %

b) buněčná suspenze ve fyziologickém roztoku (0,1 g buněčné pasty bakteriálních buněk vloženo do 0,9 ml) vystavena účinkům zvýšené teploty nebo k ní byla přidána močovina.

Ke zjištění míry stability enzymu byly intaktní buňky v různých fázích růstu vystaveny účinkům močoviny a zvýšené teploty a byla detekována zbytková transformační aktivita.

Z výsledků (tab. 1) je zřejmá vyšší stabilita intaktních buněk ve stacionární fázi růstu.

Po zhodnocení všech výsledků se jeví jako nejvýhodnější imobilizovat bakteriální buňky, získané v první fázi stacionární fáze (asi za 30 hodin). Buňky jsou již dostatečně narostlé a mají dostatečně vysokou a stabilní transformační aktivitu. Další kultivace, kdy se již nezvyšuje objem biomasy, by při průmyslové aplikaci nebyla výhodná.

3.2 Aktivace buněk

Jestliže je tvorba žádoucího produktu katalyzována pouze jedním enzymem imobilizované buňky, lze produkci zvýšit tzv. aktivací, tj. využitím různých postupů od chemických až po fyzikální (zpracování detergentem, tepelný šok, použití různých chemických sloučenin) [10].

Nevýhodou v této práci studovaného systému je tvorba vedlejšího produktu sukcinátu. Proto bylo nutno hledat podmínky, jak aktivovat buňky pro vysokou tvorbu L-malátu a zároveň snížit tvorbu sukcinátu na minimum. Jelikož bakteriální sukcinátdehydrogenasa (EC 1.3.9.91), která je za tvorbu sukcinátu odpovědná, je lokalizována v buněčné membráně [11] a fumarasa (EC 4.2.12) v buněčném cytosolu [1], je nejvýhodnější zpracování imobilizovaného systému detergentem. Dojde přitom k částečnému narušení bakteriální stěny a tím snížení aktivity sukcinátdehydrogenasy, zároveň se zvýší propustnost bakteriální stěny pro substrát.

Z řady detergentů byl zpočátku vybrán jako nejvhodnější CTAB (cetyltrimethylamonium bromid), ovšem při převádění pokusů do většího měřítka se ukázalo snížení aktivity sukcinátdehydrogenasy nedostatečné, a proto byl v dalších pokusech používán k aktivaci imobilizátu přípravek Fel tauri (sušená hovězí žluč v prášku), rozpuštěný v roztoku fumarátu sodného (c = 1 mol/l). Byly stanoveny optimální podmínky aktivace tímto přípravkem, především koncentrace, doba působení, teplota a

Tabulka 2. Tvorba kyseliny L-jablečné a kyseliny jantarové v závislosti na koncentraci Fel tauri a způsobu aktivace (doba aktivace 20 hodin)

Koncentrace Fel tauri v roztoku fumarátu sodného (c = 1 mol/l) %	Tvorba kyseliny L-jablečné za 24 h (mol/l)		Tvorba kyseliny jantarové za 24 h (mol/l)	
	stání při laboratorní teplotě	třepačka při 37 °C	stání při laboratorní teplotě	třepačka při 37 °C
0,2	0,752	0,803	0,077	0,028
0,4	0,796	0,838	0,038	0,002
0,6	0,803	0,851	stopy	0

způsob použití. Z výsledků uvedených v tabulce 2 a 3 vyplývá, že se zvyšováním koncentrace Fel tauri se snižuje tvorba kyseliny jantarové a zvyšuje tvorba kyseliny L-jablečné. Jako dostatečný se ukázal čas 16 hodin na třepačce při 37 °C a při koncentraci 0,6 % Fel tauri v roztoku fumarátu sodného (c = 1 mol/l). Stáním imobilizátu při laboratorní teplotě nebylo potlačení tvorby sukcinátu dostatečné. Vyšší koncentrace Fel tauri nebo

Tabulka 3. Tvorba kyseliny L-jablečné a kyseliny jantarové v závislosti na době aktivace (koncentrace Fel tauri 0,6 %, třepačka při 37 °C)

Doba aktivace	Tvorba kyseliny L-jablečné za 24 h (mol/l)	Tvorba kyseliny jantarové za 24 h (mol/l)
8	0,807	0,012
12	0,826	0,009
16	0,835	0
18	0,816	0
20	0,786	0

delší doba aktivace vedly k většímu narušení imobilizovaného systému a k vyplavování buněk z alginátové matrice.

3.3 Zvýšení stability imobilizovaných buněk

Snaha získat imobilizované buňky se zvýšenou stabilitou vedla řadu autorů ke zkoumání různých způsobů stabilizace biokatalyzátorů, a to především kovalentním prokřížením polyfunkčními činidly [12, 13, 14, 15]. Dalším zajímavým postupem je stabilizace alginátových imobilizátů jejich částečným vysušením a následným limitovaným nabobtnáním v roztoku stabilizačního činidla [16].

Stabilní biokatalyzátory jsou základní podmínkou pro průmyslové využití, proto se hledal vhodný způsob stabilizace. Byl testován účinek různých koncentrací glutaraldehydu, glyoxalátu, polyethyleniminu, taninu a jodistanu v odlišných časových intervalech, a to jak u intaktních buněk, tak u imobilizátů. Všechny výsledky jsou podrobně popsány v kandidátské dizertační práci [1].

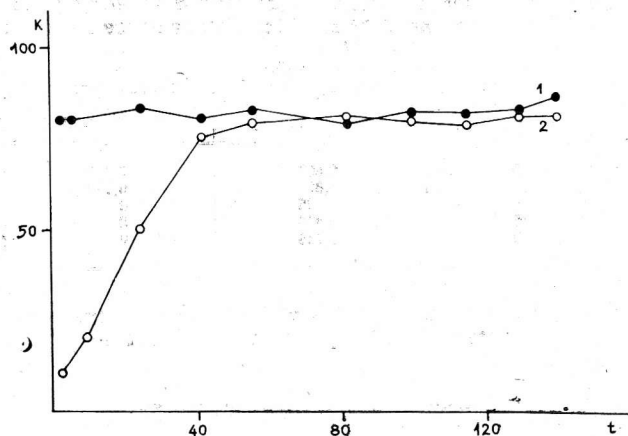
Žádný z testovaných postupů kovalentní modifikace imobilizátů však nevedl k dostatečnému zvýšení operační stability při zachování vysoké hladiny tvorby L-malátu. Téměř všechna činidla se projevila jako inhibitory aktivity fumarasy, pouze při použití taninu byla aktivita zachována na vysoké úrovni. Proto byly založeny dlouhodobé pokusy na testování stability imobilizátu modifikovaného taninem. V 1. pokuse byl tanin v množství 0,1 % přidán do roztoku chloridu vápenatého (CaCl₂) na vytvrzování, ve 2. pokuse byl tanin přidán přímo do suspenze buněk a alginátu. V obou případech byla prokázána zvýšená tvorba sukcinátu. Je pravděpodobné, že přírůstek taninu, hydrofilní sloučeniny s množstvím hydroxylových skupin, zvyšuje stabilitu bakteriální stěny a tím i stabilitu sukcinátdehydrogenasy. Konverze fumarátu v L-malát se drží v 1. pokuse na vysoké hladině 80 % za 24 hodin i po 680 dnech využívání imobilizátu, ve 2. pokuse se zjistil mírný pokles konverze od 500. dne využívání.

Jako nejvhodnější stabilizace systému imobilizovaných buněk se ukázalo parciální vysušení při 30 °C po dobu 16 až 20 hodin (objem imobilizátu klesne asi na 5 %) a následné nabobtnání v roztoku chloridu vápenatého (CaCl₂) (c = 0,5 mol/l) nebo síranu hlinitého (Al₂(SO₄)₃) (c = 0,1 mol/l) po dobu 30 minut. Další zvětšení objemu imobilizátu nastane během aktivace, ale pouze na třetinu původního objemu, a ten zůstává zachován po celou dobu využívání biokatalyzátoru.

3.4 Stanovení operační stability imobilizátu

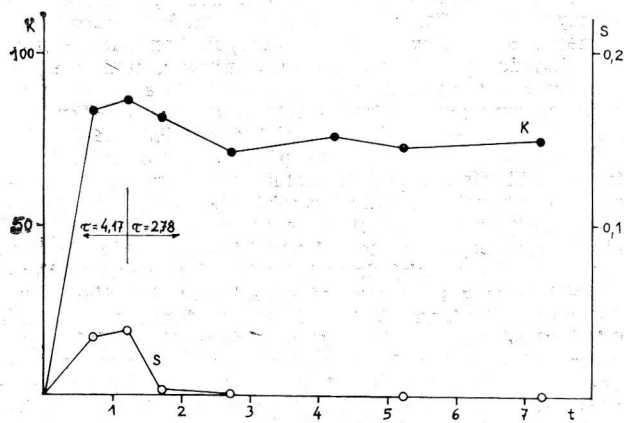
Vybrané systémy byly testovány na stabilitu ve vsádkovém uspořádání za konstantní teploty a frekvence třepání. Současně byla sledována tvorba vedlejšího produktu sukcinátu. Z naměřených výsledků, uvedených na obr. 3 a 4 vyplývá několik skutečností. Tvorba L-malátu imobilizátem neaktivovaným detergentem byla zpočátku

velmi nízká, teprve po 40 dnech stálého kontaktu se substrátem, kdy se naruší buněčné stěny, se blíží hodnotám u detergentem aktivovaných buněk. Parciálně vysušené a následně aktivované imobilizáty s CTAB vykazují stejně vysokou tvorbu produktu jako imobilizáty nesusušené, ovšem produkce sukcinátu je mnohem vyšší a zatímco u nevysušených imobilizátů poměrně rychle klesá, u sušených si udržuje vyšší hladinu dlouhou dobu. Proto je u sušených biokatalyzátorů nutná aktivace s Fel tauri, kdy se úplně potlačí tvorba sukcinátu.



Obr. 3. Vliv aktivace imobilizátu na stupeň konverze fumarátu na L-malát
K je konverze (%), t — čas (dny), 1 — imobilizát aktivovaný CTAB, 2 — neaktivovaný imobilizát

Všechny uvedené typy imobilizátů vykazovaly vysokou tvorbu L-malátu po dlouhou dobu. Například v pokusech uvedených na obr. 4 dosáhla konverze fumarátu



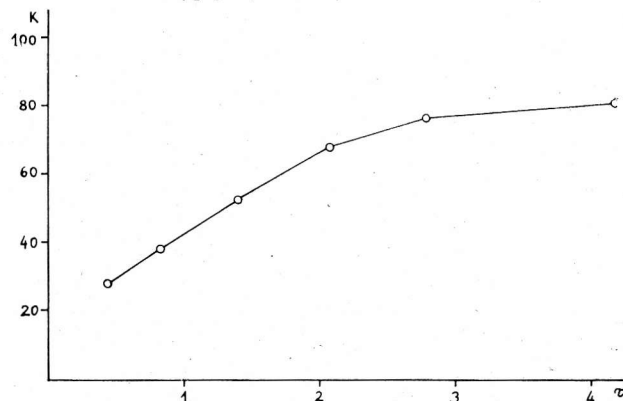
Obr. 4. Vliv sušení imobilizátu na transformační aktivitu imobilizovaných buněk
K je konverze fumarátu na L-malát (%), S — množství sukcinátu (mol/l), 1 — K pro imobilizát nesusušený, 2 — K pro imobilizát sušený, 3 — S pro imobilizát nesusušený, 4 — S pro imobilizát sušený

na L-malát maximálních hodnot 82 % (reakční rovnováha) i po 700 dnech využívání.

3.5 Kontinuální příprava kyseliny L-jablečné

Cílem výzkumu je vypracování podkladů pro zavedení průmyslové výroby kyseliny L-jablečné. Proto se přikročilo po vyřešení přípravy stabilního imobilizátu s vysokou transformační aktivitou přeměny fumarátu v L-malát k testování imobilizátu v kontinuálním kolonovém uspořádání. Pokusy byly prováděny ve skleněných kolonách o objemu 25 ml a 1 l opatřených temperačním pláštěm, který umožnil udržovat teplotu v systému na hodnotě 37 °C. Substrát roztoku fumarátu sodného ($c = 1 \text{ mol/l}$) byl přiváděn shora peristaltickým čerpadlem. Kolona byla plněna imobilizátem ze 4/5 a ačkoliv vrstva imobilizátu u litrové kolony dosahovala do výšky asi 45 cm,

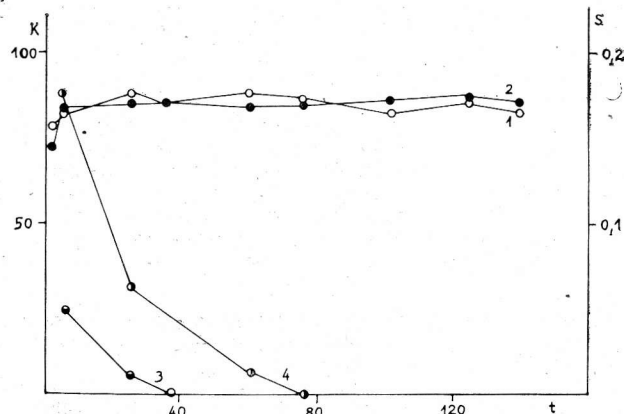
nebylo nutno ji rozdělit síťovými patry. Počáteční sesednutí vrstvy o 1 cm se ukázalo jako konečné, a tedy nedocházelo ke zvyšování tlaku ve vrstvě a tím ke snižování průtoku. Volný prostor nad imobilizátem byl ponechán pro dostatečné prohřátí substrátu a jeho rozdělení po celé ploše průřezu. Jako rozhodující se, kromě typu imobilizátu (nejvhodnější sušený, aktivovaný Fel tauri), ukázala pro vysokou produkci L-malátu rychlost průtoku substrátu kolonou [vyjádřená tzv. retenčním časem — dobou zdržení substrátu v koloně]. Z výsledků na obr. 5 vyplývá, že tvorba L-malátu stoupá s kle-



Obr. 5. Závislost stupně konverze fumarátu na L-malát na retenčním čase
K je konverze (%), τ — retenční čas (h)

sajícím průtokem (rostoucím retenčním časem). Ovšem od určitého průtoku (asi 3 hodiny retenční čas) je zvyšování konverze nedostatečné, a proto by bylo neekonomické značně prodlužovat retenční časy s výsledkem malého zvýšení konverze. Přitom nezkonvertovaný fumarát lze z produkčního média snadno vysrážet koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a vrátit zpět do výroby, takže ke ztrátám substrátu nedochází. Pokud se udržuje proces na hranici reakční rovnováhy (konverze 82 %), dochází ke zvýšené tvorbě sukcinátu, jehož oddělení z produkční směsi při izolaci kyseliny L-jablečné je velmi obtížné (obr. 6).

Na základě v této práci dosažených výsledků lze konstatovat, že optimální doba zdržení substrátu v koloně je 2 až 3 hodiny, přitom konverze fumarátu na L-malát je 70 až 75 % a sukcinát se tvoří pouze ve stopových množstvích. Při použití kolony 1000 l, průtoku 500 l roztoku fumarátu sodného ($c = 1 \text{ mol/l}$) za 1 hodinu by při konverzi 70 % bylo produkováno 46,9 kg kyseliny L-jablečné za hodinu.



Obr. 6. Vliv průtoku substrátu na tvorbu sukcinátu
K je konverze fumarátu na L-malát (%), S — množství sukcinátu (mol/l), τ — retenční čas (h)

Další důležitou otázkou zůstává stabilita alginátového systému imobilizovaných buněk během jejich kontinuálního využívání po delší časovou periodu, neboť měření byla prováděna v maximálním časovém úseku 5 dní, což

nemohlo tuto otázku zodpovědět. Cílem dalších výzkumů bude určit operační stabilitu daného biokatalyzátoru v kontinuálním procesu.

4. ZÁVĚR

Cílem předkládané práce bylo získání poznatků na jejich základě by mohl být vypracován technologický postup kontinuální výroby kyseliny L-jablečné. Experimentální výsledky lze shrnout do těchto bodů:

1. Pro přípravu biokatalyzátoru s dostatečně vysokou operační stabilitou a vysokou transformační aktivitou přeměny fumarátu v L-malát je výhodné použití kmene *Corynebacterium species* ze stacionární fáze růstu.

2. Vyšší produkci L-malátu a snížení tvorby vedlejšího produktu sukcinátu lze ovlivnit použitím přípravku Fel tauri. Aktivace se provádí inkubací imobilizátu v roztoku fumarátu sodného ($c = 1 \text{ mol/l}$) obsahujícího 0,6 % přípravku Fel tauri při 37 °C po dobu 16 hodin.

3. Za účelem zvýšení stability a pevnosti imobilizátu je výhodné jeho sušení při 30 °C po dobu 16 až 20 hodin a následné nabobtnání v roztoku chloridu vápenatého nebo siranu hlinitého.

4. Takto připravené imobilizáty lze používat k přípravě kyseliny L-jablečné vsádkovým způsobem, kdy i po 700 dnech se dosahuje 80 % konverze fumarátu na L-malát za 24 hodin, nebo k přípravě způsobem kontinuálním.

5. V kontinuálním uspořádání lze při průtoku, který odpovídá retenčnímu času 2 až 3 hodiny, dosáhnout konverze 70 až 75 %. Otázka stability tohoto systému je předmětem dalšího výzkumu.

Literatura

- [1] ČERNÝ J.: Možnosti přípravy L-jablečné kyseliny pomocí imobilizovaných bakteriálních buněk, Kandidátská dizertační práce, ÚOCHB ČSAV, Praha 1986
- [2] TACHIBANA S., MURAKAMI T.: J. Ferment. Technol. **52**, 1974, s. 353
- [3] SATO S., NAKAHARA T., MINODA Y.: Agric. Biol. Chem. **41**, 1974, s. 967
- [4] TAKAO S., TANIDA M., KUWABARA H.: J. Ferment. Technol. **56**, 1978, s. 334
- [5] YAMAMOTO K., TOSA T., YAMASHITA K., CHIBATA I.: Eur. J. Appl. Microbiol. **3**, 1976, s. 169
- [6] TAKATA I., YAMAMOTO K., TOSA T., CHIBATA I.: Eur. J. Appl. Microbiol. **7**, 1979, s. 161
- [7] KIERSTAN M., BUCKE C.: Biotechnol. Bioeng. **19**, 1977, s. 387
- [8] CHEETHAM P. S. J.: Enzyme Microb. Technol. **1**, 1979, s. 183
- [9] KULT K., KUŽILEK V., VRBSKÝ J., Sborník VŠCHT Praha H 22 (1988) Analytická chemie
- [10] MORIKAWA Y., KARUBE I., SUZUKI S.: Biotechnol. Bioeng. **22**, 1980, s. 1015
- [11] AMARASINGHAM C. R., RAVIS B. D.: J. Biol. Chem. **240**, 1965, s. 3664
- [12] BIRNBAUM S., PEDLETON R., MOSBACH K.: Biotechnol. Lett. **3**, 1981, s. 393
- [13] VELIKY I. A., WILLIAMS R. E.: Biotechnol. Lett. **3**, 1981, s. 275
- [14] KUN W. Y., POLACK J. A.: Biotechnol. Bioeng. **25**, 1983, s. 1995
- [15] TAKATA I., TOSA T., CHIBATA, I.: Microb. Biotechnol. **19**, 1984, s. 85
- [16] KLEIN J., WAGNER F.: Ger. Offen. **2**, 1980, s. 835

Lektorovala prof. Ing. G. Basařová, DrSc.

Kučerová, H. - Špaček, B. - Černý, J.: Příprava kyseliny L-jablečné pomocí imobilizovaných bakteriálních buněk. Kvas. prům., **36**, 1990, č. 4, s. 101—105.

Byly hledány optimální podmínky přípravy biokatalyzátoru pro výrobu kyseliny L-jablečné enzymovou transformací kyseliny fumarové a optimální podmínky jeho využívání. Pro přípravu alginátového imobilizátu s vysokou transformační aktivitou přeměny fumarátu v L-malát a dostatečně vysokou stabilitou je výhodné použití bakteriálního kmene *Corynebacterium species* ze stacionární fáze růstu. Zvýšení produkce L-malátu a snížení tvorby vedlejšího produktu sukcinátu lze ovlivnit tzv.

aktivací pomocí detergentu. Zvýšení stability a pevnosti imobilizátu se dosáhne jeho sušením a následným nabobtnáním v roztoku stabilizačního činidla. Při použití imobilizátu vsádkovým způsobem je možno dosahovat maximální konverze 82 % po dlouhou dobu. Připravený biokatalyzátor lze s výhodou použít i v kontinuálním procesu.

Кучерова, Г. - Шпачек, Б. - Черны, И.: Получение L-яблочной кислоты при помощи иммобилизованных бактериальных клеток. Квас. прум., **36**, 1990, № 4, стр. 101—105.

Искались оптимальные условия получения биокатализатора для производства L-яблочной кислоты ферментным превращением фумаровой кислоты и оптимальные условия его использования. Для приготовления альгинатного иммобилизата с высокой трансформационной активностью превращения фумарата в L-малат и достаточно высокой стабильностью выгодно применить штамм бактерии *Corynebacterium species* из стационарной фазы роста. На повышение выхода L-малата и понижение образования побочного продукта сукцината можно оказать действие т.наз. активированием при помощи детергента. Повышение стабильности и прочности иммобилизата достигается при сушке его с последующим набуханием в растворе стабилизирующего реактива. При использовании иммобилизата насадочным способом можно достигнуть максимальной конверсии 82 % в продолжительное время. Полученный биокатализатор можно выгодно применить и в непрерывном процессе.

Kučerová, H. - Špaček, B. - Černý, J.: Production of L-Malic Acid by Immobilized Bacterial Cells. Kvas. prům., **36**, 1990, No. 4, pp 101—105.

The optimum conditions for a preparation of the biocatalyst and its application in the production of L-malic acid using the enzymic conversion of fumaric acid were studied. For the immobilization in alginate the bacterial strain *Corynebacterium species* from the stationary phase of growth was used. An increase of the L-malate production together with a decrease of the byproduct (succinate) formation can be affected by so called activation using a detergent. An increasing stability of immobilized cells can be achieved by drying followed by swelling in the solution of the stabilizer. Using the batch process the maximum conversion of 82 % can be achieved for a long time. This biocatalyst can be used in the continuous process as well.

Kučerová, H. - Špaček, B. - Černý, J.: Aufbereitung der L-Apfelsäure mittels immobilisierter bakterieller Zellen. Kvas. prům., **36**, 1990, Nr.4, S. 101—105.

Es wurden die optimalen Bedingungen der Produktion des Biokatalysators für die Erzeugung der L-Apfelsäure durch Enzymtransformation der Fumarsäure sowie auch die optimalen Bedingungen seiner Ausnützung gesucht. Für die Aufbereitung des Alginat-Immobilisats mit einer hohen Aktivität der Transformation des Fumarats auf L-Malat und einer ausreichend hohen Stabilität ist es vorteilhaft, den bakteriellen Stamm *Corynebacterium species* aus der stationären Wachstumsphase zu benutzen. Die Erhöhung der L-Malate-Produktion und Senkung der Bildung des Nebenprodukts Sukzinats kann durch die sog. Aktivierung mittels eines Detergents beeinflusst werden. Die Erhöhung der Stabilität und Festigkeit des Immobilisats wird durch seine Trocknung und nachfolgender Quellung in der Lösung des Stabilisierungsmittels erzielt. Bei der Anwendung des Immobilisats im Einsetz-Verfahren kann über eine lange Zeit die Maximalkonversion von 82 % erreicht werden. Der aufbereitete Biokatalysator kann mit Vorteil auch im kontinuierlichen Verfahren angewandt werden.