

Využitie kapilárnej izotachofórey na stanovenie organických kyselín vo fermentačných roztokoch kyseliny glutámovej

MARTA JENDRICHOVSKÁ – BOHUMÍR SABO

Súhrn. Vypracovali sme metódu stanovenia organických kyselín a ďalších metabolitov vo fermentačných roztokoch kyseliny glutámovej. Uvádzame vhodné elektrolytové systémy a podmienky stanovenia kyseliny mliečnej, jantárovej, pyrolidónkarboxylovej, α -ketoglutárovej, glutámovej i *N*-acetylglutamínu. Pre jednotlivé látky sme zistili smerodajné odchýlky v rozmedzí 1,3 – 3,8 %. Metódu odporúčame pri riadení a optimalizácii fermentačnej výroby kyseliny glutámovej a v navrhovanej modifikácii aj pre následné technologické operácie – izoláciu a purifikáciu produktov.

Kyselina glutámová zaujíma dôležité miesto medzi potravinárskymi ochucovadlami, ale používa sa aj v humánnej medicíne a textilnom priemysle. Aplikáčnou formou bývajú najčastejšie jej soli – sodná, draselná a iné. V súčasnosti sa vyrába výlučne fermentačnou cestou. Izotachofóza ako separačná metóda stanovenia organických kyselín v priebehu fermentačných procesov sa v posledných rokoch čoraz častejšie využíva na riadenie a kontrolu technologického procesu [1-3].

Za optimálnych podmienok sa 50 – 60 % sacharidického materiálu spotrebuje na produkciu kyseliny glutámovej. V opačnom prípade sa zvyšuje produkcia iných metabolitov. Najčastejšie sa uvádza prítomnosť kyseliny mliečnej, jantárovej, α -ketoglutárovej, alanínu, *N*-acetylglutamínu, glutamínu a kyseliny pyrolidónkarboxylovej [4].

Kvalitatívnym rozborom fermentačných roztokov vzhľadom na obsah organických kyselín, ako aj výberom vhodnej metódy stanovenia kyseliny glutámovej sme sa zaoberali v našej predchádzajúcej práci [5]. V tomto článku uvádzame metódu stanovenia organických kyselín a kyseliny glutámovej izo-

tachoforézou súčasne v jednej vzorke a overili sme jej aplikáciu v kontrole fermentačných pokusov. Metóda umožňuje sledovať priebeh fermentácie i smer a veľkosť odchýlky od požadovaného priebehu.

Materiál a metódy

Analyzovali sme fermentačné roztoky kyseliny glutámovej pripravené spôsobom opísaným v práci Šimkovej a Špitáľnikovej [6]. Vzorky sme upravovali vhodným riedením 200 – 300 krát po filtrácii. Experimentálnu prácu sme zamerali na vypracovanie metódy stanovenia metabolitov na modelových zmesiach a následne sme túto metódu aplikovali na reálne fermentačné vzorky.

Podmienky stanovenia: Pracovali sme na izotachoforetickom analyzátore so spájanými kolónami ZKI-001 čs. výroby (ÚR VJT Spišská Nová Ves). Elektrolytové systémy a podmienky separácie uvádza tabuľka 1. Všetky použité chemikálie aj štandardy boli analyticky čisté. Elektrolytový systém II sme kúpili v ÚR VJT Košice. Na riedenie sme používali redestilovanú vodu.

Výsledky a diskusia

Modelové zmesi sme pripravili z metabolitov, ktoré sa najčastejšie vyskytovali v našich fermentačných roztokoch. Bola to kyselina mliečna, jantárová, α -ketoglutárová, pyrolidónkarboxylová a *N*-acetylglutamín. Základný kalibračný roztok obsahoval 0,5 g z každej kyseliny na liter. Riedením sme získali kalibračné roztoky v rozsahu koncentrácií 0,01 až 0,06 g.l⁻¹. Dobrá separácia všetkých zložiek vyžaduje kyslé pH vodiaceho elektrolytu. Z odskúšaných elektrolytových systémov vyhovovali dva (tab. 1). Izotachoforetický záznam štandardných kyselín z analytickej kolóny je na obrázku 1. Závislosti výšky vlny od koncentrácie boli pri všetkých kyselinách lineárne. Parametre kalibračných čiar vypočítané zo štyroch meraní metódou lineárnej regresie uvádza tabuľka 2. Kvalitatívnou informáciou je hodnota R_{SH} – pomer výšky zóny daného iónu k výške zóny zakončujúceho elektrolytu (tab. 3).

Vypracovanú metódu sme aplikovali na fermentačné vzorky. Identifikáciu zón jednotlivých kyselín sme porovnávali so zistenými hodnotami R_{SH} , kvantifikáciu z kalibračných čiar (tab. 4). V našich fermentačných roztokoch sa z nežiadúcich kyselín najčastejšie vyskytovala kyselina mliečna a *N*-acetylglu-

Tabuľka 1. Elektrolytové systémy a podmienky separácie
Table 1. Electrolyte systems and separation conditions

Elektrolyt ¹		Elektrolytový systém ²	
		I	II
vodiaci ³	Vodiaci ión ⁴ c [mol.l ⁻¹] protiión ⁵ c [mol.l ⁻¹] aditívum ⁶ c [%] pH	Cl ⁻ 10 ⁻² β -alanín ¹⁰ 1,5.10 ⁻² PVP 0,1 3,10	Cl ⁻ 10 ⁻² ε -aminokapronát ¹² 2,2.10 ⁻¹⁰ MHEC 0,1 4,25
zakoňujúci ⁷	Zakoňujúci ión ⁸ c [mol.l ⁻¹] protiión ⁵ pH	Acetát ¹¹ 5.10 ⁻³ TRIS 4,2	Kapronát ¹³ 5.10 ⁻³ HISTIDÍN ¹⁴ 4-5
	I ₁ [μ A] I ₂ [μ A] p [mm.s ⁻¹] dávkovanie ⁹ [μ l]	200 40 1 30	200 40 1 30

I₁, I₂ – hnacie prúdy v predseparačnej a analytickej kapiláre;

Driving currents in preseparator and analytical capillaries.

p – posun papiera; Chart speed.

PVP – polyvinylpyrolidón; Polyvinylpyrrolidone.

MHEC – metylhydroxyetylcelulóza; Methyl hydroxyethyl cellulose.

TRIS – tris-hydroxymetylamínometán; tris hydroxymethyl aminomethane.

¹Electrolyte; ²Electrolyte system; ³Leading; ⁴Leading ion; ⁵Counterion; ⁶Additive; ⁷Terminating;

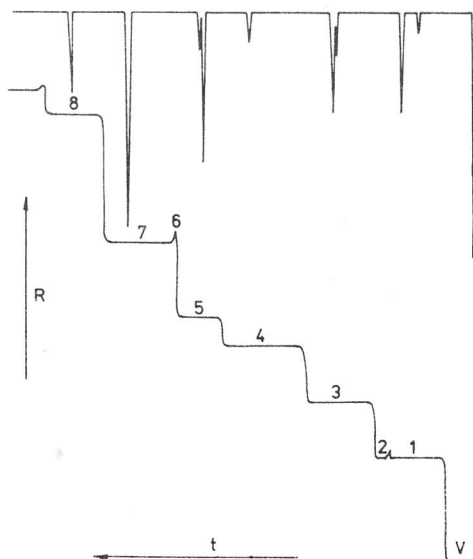
⁸Terminating ion; ⁹Dose; ¹⁰ β -Alanine; ¹¹Acetate; ¹² ε -Aminocapronate; ¹³Capronate; ¹⁴Histidine.

tamín. Čas analýzy v I. elektrolytovom systéme je 32 min. V II. elektrolytovom systéme sa nedokonale delí kyselina pyrolidónkarboxylová od mliečnej (tab. 3). Vo fermentačných roztokoch sa však vyskytovala zriedka a v nevýznamnom množstve. Výhodou tohto systému je komerčná dostupnosť a čas analýzy je kratší – 24 min. Separáciu kyselín v reálnej fermentačnej vzorke vidieť na obrázku 2.

Relatívne smerodajné odchýlky pre jednotlivé kyseliny sa dali v oboch elektrolytových systémoch porovnať. Výsledné hodnoty vypočítané z piatich meraní boli v rozsahu 1,3 až 3,8 %.

Pri hľadaní optimálnych parametrov (vhodný substrát, zloženie fermentačnej pôdy, pH a pod.) v závislosti od produkcie, má z technologického hľadiska širšia informácia o prítomných metabolitoch veľký význam. Umožňuje cie-

lene zasahovať do fermentačného procesu v zmysle potlačenia metabolických dráh v prospech produkcie kyseliny glutámovej.



Obr. 1. Izotachoforeogram štandardných kyselín. Elektrolytový systém I., koncentrácia 0,02 g.l⁻¹. Kyseliny: 1 = α -ketoglutárová; 2,6 = nečistoty; 3 = pyrolidónkarboxylová; 4 = mliečna; 5 = N-acetylglutamín; 7 = jantárová; 8 = glutamová; V = Cl⁻; Z = kaprónová.
Fig. 1. Isotachophoreogram of standard acids. Electrolyte system I, concentration 0.02 g l⁻¹.
Acids: 1 - α -ketoglutaric, 2,6 - impurities, 3 - pyrolidonecarboxylic, 4 - lactic, 5 - N-acetylglutamine, 7 - succinic, 8 - glutamic, V - Cl⁻, Z - caproic.

Izotachoforéza je vhodnou analytickou metódou aj pre následné technologické operácie, ako je izolácia a purifikácia. Spravidla sa pri nich sleduje iba obsah kyseliny glutámovej. Na tieto analýzy je výhodné použiť pri práci s izotachoforetickým analyzátorom so spájanými kolónami iba predseparačnú kolónu, pretože presnosť stanovenia je dostatočná a čas analýzy je iba 15 min. V rozsahu koncentrácie 0,1 až 0,3 g.l⁻¹ sme zistili lineárnu závislosť ($y = 1,9 + 155x$) s relatívnou chybou stanovenia 2,20 %. Prakticky sa tento spôsob stanovenia použil v eluátoch pri vývoji izolačných postupov na získanie kyseliny glutámovej a jej solí [7].

Metóda v tejto úprave je vhodná aj na stanovenie substancií – solí kyseliny glutámovej – napr. do normy.

Tabuľka 2. Parametre kalibračných čiar $y = a + bx$
Table 2. Parameters of calibration curves $y = a + bx$

Kyselina ¹	Parameter ²	Elektrolytový systém ³	
		I	II
mliečna ⁴	<i>a</i>	-0.14	2.21
	<i>b</i>	1880	1370
	<i>r</i>	0.9977	0.9953
jantárová ⁵	<i>a</i>	1.11	0.12
	<i>b</i>	1334	1237
	<i>r</i>	0.9993	0.9994
pyrolidónkarboxylová ⁶	<i>a</i>	0.37	–
	<i>b</i>	1313	–
	<i>r</i>	0.9988	–
α -ketoglutárová ⁷	<i>a</i>	0.70	-0.78
	<i>b</i>	1241	1063
	<i>r</i>	0.9975	0.9980
glutámová ⁸	<i>a</i>	0.15	0.47
	<i>b</i>	1134	980
	<i>r</i>	0.9982	0.9982
<i>N</i> -acetylglutamín ⁹	<i>a</i>	-0.53	-0.60
	<i>b</i>	938	722
	<i>r</i>	0.9936	0.9985

Merané v analytickej kolóne; Measured on analytical column.

a – posunutie – shift [mm], *b* – smernica – slope [mm/g.l⁻¹].

r – korelačný koeficient – correlation coefficient.

¹Acid; ²Parameter; ³Electrolyte system; ⁴Lactic; ⁵Succinic; ⁶Pyrolidoncarboxylic; ⁷ α -Ketoglutaric;

⁸Glutamic; ⁹*N*-Acetylglutamine.

Tabuľka 3. Hodnoty R_{SH} v elektrolytových systémoch I a II
Table 3. The R_{SH} values in electrolyte systems I and II

Kyselina ¹	R_{SH}	
	elektrolytový systém I ²	elektrolytový systém II ³
mliečna ⁴	0.46	0.36
jantárová ⁵	0.68	0.42
pyrolidónkarboxylová ⁶	0.33	0.38
α -ketoglutárová ⁷	0.21	0.23
glutámová ⁸	0.95	0.68
<i>N</i> -acetylglutamín ⁹	0.53	0.58

¹Acid; ²Electrolyte system I; ³Electrolyte system II; ⁴Lactic; ⁵Succinic; ⁶Pyrolidoncarboxylic; ⁷ α -Ketoglutaric; ⁸Glutamic; ⁹*N*-Acetylglutamine.

Tabuľka 4. Organické kyseliny vo fermentačných roztokoch
Table 4. Organic acids in fermentation solutions

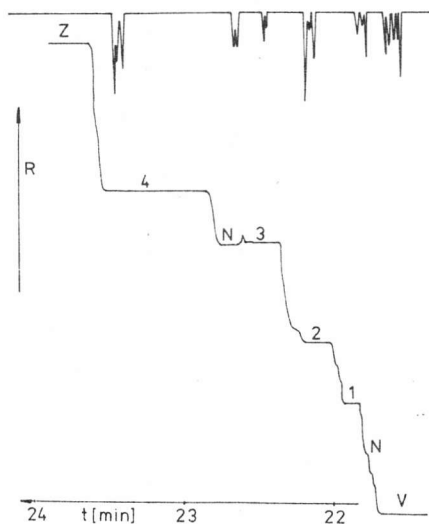
Fermen- tácia ¹	Čas ² [h]	KM [g.l ⁻¹]	α -KG [g.l ⁻¹]	N-AcGln [g.l ⁻¹]	PKX [g.l ⁻¹]	KJ [g.l ⁻¹]	Glu [g.l ⁻¹]
1	20	1,47	0,66	2,08	–	–	3,84
	30	1,84	1,50	4,76	–	–	8,80
	40	1,50	1,74	5,62	0,58	–	10,82
	45	2,52	2,81	5,95	1,13	–	11,87
2	30	3,31	1,22	–	–	0,82	3,82
	40	5,11	1,80	–	–	1,95	4,86
	45	5,50	1,72	–	–	3,60	5,89
	50	5,35	1,61	–	–	3,90	6,78
3	20	15,83	–	2,65	–	–	–
	30	15,46	–	2,51	–	–	–
	40	16,45	–	7,38	–	–	0,45
	48	14,69	–	9,42	–	–	0,52
4	20	–	–	–	–	–	0,86
	30	–	–	2,03	–	–	2,05
	40	1,45	–	2,51	–	–	2,32
	45	2,42	–	3,25	–	–	3,07

Kyseliny – Acids: KM – mliečna; Lactic. α -KG – α -ketoglutárová; α -Ketoglutaric. N-AcGln – N-acetylglutamín; N-Acetylglutamine. PKX – pyrolidónkarboxylová; Pyrolidoncarboxylic. KJ – jantárová; Succinic. Glu – glutámová; Glutamic.

¹Fermentation; ²Time.

Izotachoforetickou analýzou v oblasti vyšších hodnôt pH vodiaceho elektrolytu možno stanoviť aj ďalšie aminokyseliny, ak by sa vo frementačných roztokoch vyskytovali vo významnom množstve [8].

Jednoduchá úprava vzorky, rýchlosť analýzy a schopnosť stanovovať aj katióny dáva tejto separačnej metóde široké možnosti uplatnenia v kontrole fermentačných technológií.



Obr. 2. Izotachoforeogram vzorky z fermentácie. Elektrolytový systém II., riedenie:

1 ml v 250 ml. Kyseliny: 1 = α -ketoglutárová, 2 = mliečna; 3 = N-acetylglutamín;

4 = glutamová; N = nečistoty z elektrolytov; V = Cl^- ; Z = kaprónová; t = čas; R = odpor.

Fig. 2. Isotachopherogram of a fermentation sample. Electrolyte system II. Dilution:

1 ml in 250 ml. Acids: 1 - α -ketoglutaric, 2 - lactic, 3 - N-acetylglutamine, 4 - glutamic,

N - impurities from the electrolytes, V - Cl^- , Z - caproic; t - time, R - resistance.

Literatúra

1. POLONSKÝ, J. - HORVÁTHOVÁ, A. - PÁNIK, M., J. Chromatogr. 390, 1987, s. 141.
2. PRŮŠA, K. - SMEJKAL, O., Kvasný Prům., 29, 1983, č. 1, s. 7.
3. BUBELÍNIOVÁ, E. - KOVÁČ, M., Bull. Potrav. Výsk., 26 (6), 1987, č. 3-4, s. 275.
4. YAMADA, K. a kol.: The Microbial Production of Amino Acids. New York, Halsted Press 1972.
5. JENDRICHOVSKÁ, M. - SABO, B., Bull. Potrav. Výsk., 1989 (v tlači).
6. ŠIMKOVÁ, M. - ŠPITÁLNÍKOVÁ, L., Bull. Potrav. Výsk., 1988 (v tlači).
7. ŠIMÓNIOVÁ, D.: Vývoj izolačných postupov pre získavanie kyseliny glutamínovej a jej soli. Výskumná správa. Bratislava, VÚ LIKO 1989.
8. EVARAERTS, F.: Isotachopheresis, New York, Applied Science Publishers 1977, 314 s.

Do redakcie došlo 29. 6. 1989

Использование капиллярного изотахофореза для определения органических кислот в ферментативных растворах глутаминовой кислоты

Резюме

Авторы разработали метод определения органических кислот и дальших метаболитов в ферментативных растворах глутаминовой кислоты. Приводят подходящие электролитические системы и условия определения молочной, янтарной, пирролидон-карбоксильной альфа-кетоглутаровой, глутаминовой кислот и *N*-ацетилглутамина. Для отдельных веществ авторы получили стандартное отклонение в диапазоне с 1,3 до 3,8 %. Авторы рекомендуют этот метод для контроля и оптимализирования ферментативного производства глутаминовой кислоты и в предлагающей модификации и для технологических операций изоляции и очистки продуктов.

Utilization of capillary isotachopheresis for the determination of organic acids in fermentation solutions of glutamic acid

Summary

A method has been worked out for the determination of organic acids and other metabolites in fermentation solutions of glutamic acid. Electrolyte systems and conditions suitable for the determination of lactic, succinic, pyrrolidonecarboxylic, α -ketoglutaric, glutamic acids and of *N*-acetylglutamine are given. For the particular compounds, standard deviations ranging between 1.3 and 3.8 % were determined. The method is recommended for directing and optimalization of fermentation production of glutamic acid and, in the suggested modification, also for the subsequent technological operations of isolation and purification of the products.