

# Rychlé stanovení celkových lipidů a uhlovodíků v krmném droždí, vyrobeném z uhlovodíkových substrátů

Ing. MILADA ŠESTÁKOVÁ, Mikrobiologické odd. VÚKPS, Praha

663.14 : 636.087  
543.85 543.854.9

Do redakce došlo 27. 7. 1969

Metody stanovení lipidů v kvasinkách [8] jsou převážně časově náročné a uzančného charakteru. Podle způsobu hydrolyzy analyzovaného materiálu, volby extrakčních činidel, popř. jiných podmínek analýz, se získávají různá množství lipidů různého chemického složení. Pro přesnější stanovení lipidického podílu se vyextrahované lipidy často dále frakcionují na jednotlivé lipidické třídy, např. adsorpční chromatografií [1–5], [7, 9, 10]. Tyto separace lipidů jsou pro svou zdlouhavost nevhodné pro sériová stanovení.

V této práci je popsána rychlá metoda stanovení lipidů v kvasinkách *Candida lipolytica*, kultivovaných na uhlovodíkových substrátech. Při tom se celkové lipidy stanoví mírně modifikovanou metodou podle Hummela [6], lipidická frakce se rozdělí adsorpční chromatografií na silikagelovém sloupci a kontrolní chromatografií na tenké vrstvě silikagelu G. Ověření metody při srovnávacím dělení lipidických extraktů z různých vzorků krmného droždí a modelové lipidické směsi potvrzuje její vhodnost pro analýzy uhlovodíkové frakce v lipidických extraktech z kvasinek a použitelnost v praxi.

## Navržený způsob stanovení lipidů a uhlovodíků v kvasinkách

### Stanovení celkových lipidů

#### Princip metody

Z kyselého hydrolyzátu kvasničné hmoty se vyextrahují lipidické látky směsí organických rozpouštědel. V alikvotním podílu extraktu se určí obsah lipidů zvážením zbytku po odstranění vody (filtrací přes síran sodný) a oddestilování organických rozpouštědel.

#### Pomůcky

100 ml varná baňka se zábrusovou zátkou  
50 ml odměrná baňka  
20 ml pipeta s injekční stříkačkou  
sestupný kuličkový chladič  
filtrační tulipánek se sintrem S<sub>3</sub>  
vroucí vodní lázeň

#### Chemikálie

25% roztok kyseliny chlorovodíkové, p. a.  
chlorid uhličitý, p. a.  
petroléter, p. a. (b. v. 40 až 60 °C), bezvodý  
směs petroléter (b. v. 40 až 60 °C): éter (1:1),  
nasycená vodou,  
vyžíhaný bezvodý síran sodný, p. a.

#### Postup práce

K přesně odváženému homogenizovanému vzorku krmného droždí (asi 2 g kvasničné sušiny) ve 100 ml varné baňce se pipetuje 10 ml 25% HCl a 3,0 ml vody (smytí ulpělého vzorku v horních částech baňky). Po přidavku 3 skleněných kuliček se vzorek hydrolyzuje 10 min mírným varem pod zpětným chladičem. Baňka se potom ochladí (ponořením do vodní lázně) na pokojovou teplotu. Po ochlazení se k hydrolyzátu pipetuje 10 ml CCl<sub>4</sub> a hydrolyzát se vaří 10 min pod zpětným chladičem. Baňka se opět ochladí, sejme se chladič a do hydrolyzátu se pipetuje 70 ml petroléter-éterové směsi. Baňka se ihned uzavře zabroušenou zátkou a baňkou se silně třepe asi 5 min. Po 1 až 2 h stání se ostře rozdělí 2 fáze, horní vrstva se vyčeří. 50 ml horní vrstvy se pipetou převede do 50 ml odměrné baňky (špička pipety musí být asi 3 až 5 mm nad dělicí linií fází). Obsah odměrné baňky se přefiltruje přes vrstvu 2 až 3 cm síranu sodného do zvážené 100 ml varné baňky. Po filtraci se vrstva Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a stonek tulipánu promyje petroléterem. Organická rozpouštědla se na vodní lázni oddestilují a zbytek se dosuší při 105 °C a zváží. Sušený zbytek se váží v 15minutových intervalech, až rozdíl není větší než 0,002 g.

#### Výpočet

Procentový obsah lipidů ve vzorku se vypočítá podle vzorce:

$$\% \text{ lipidů (v kvas. suš.)} = \frac{L \cdot V_R \cdot 100}{V_E \cdot K} = \frac{L \cdot 160}{K}$$

kde

$V_R$  je objem přidaných rozpouštědel v ml (= 80 ml),

$V_E$  — objem odpipetovaného lipidického extraktu v ml (= 50 ml),

$L$  — zjištěná váha lipidů, vyjádřená v g,

$K$  — váha analyzovaného vzorku kvasinek (o 100% suš.), vyjádřená v g.

### Stanovení nezmýdelnitelných látek

#### Princip metody

Lipidy se zmýdelní alkoholickým roztokem louhu a nezmýdelnitelné látky se převedou (extrakcí za chladu) do petroléteru. Po odstranění zbytku vody filtrací přes síran sodný a oddestilování rozpouštědla se nezmýdelnitelné látky zjistí zvážením destilačního zbytku.



**Pomůcky**

vroucí vodní lázeň  
zpětný kuličkový chladič  
100 ml dělicí nálevka  
250 ml dělicí nálevka  
filtrační tulipánek se sintrem S<sub>3</sub>  
100 ml varná baňka

**Chemikálie**

Roztok 0,5 N hydroxidu draselného v 96% etanolu  
bezvodý síran sodný, p. a., čerstvě vyžíhaný  
petroléter, p. a. (b. v. 40–60 °C)  
aceton, p. a.

**Postup práce**

Ke zvážení celkových lipidů ve 100 ml varné baňce (viz stanovení celkových lipidů) se přidá 10 ml roztoku 0,5 N KOH v etanolu a po nasazení chladiče se vzorek zmýdelní jednodinovým varem na vodní lázni. Po ochlazení baňky se její obsah kvantitativně převede nejmenším množstvím vody (asi 10 ml) a petroléterem do 100 ml dělicí nálevky. Po přidavku asi 25 ml petroléteru se nálevkou asi 3 min třepe. Vytřepávání do petroléteru se opakuje třikrát. Petroléterové fáze se po oddělení vrstev postupně převádějí do 250 ml dělicí nálevky. Spojené petroléterové extrakty se zbavují stržených nečistot trojnásobným třepáním se 100 až 150 ml destilované vody. Vyčištěný petroléterový extrakt se přefiltruje přes 2 až 3 cm vrstvu síranu sodného (na tulipánu S<sub>3</sub>) do zvážené 100 ml varné baňky. Petroléter se z baňky oddestiluje na vodní lázni a odparek se dosuší při 105 °C, až váhový úbytek v 15minutových intervalech vážení není větší než 0,002 g.

**Výpočet**

% nezmýdelnitelných látek (v kvas. suš.) =

$$= \frac{N \cdot V_R \cdot 100}{V_E \cdot K} = \frac{N \cdot 160}{K}$$

kde *N* je zjištěná váha nezmýdelnit. látek v g,  
*K* — váha analyzovaného vzorku kvasinek  
(o 100 % suš.) v g.

**Stanovení uhlovodíků****Princip metody**

Nezmýdelnitelný podíl nebo směs lipidů v petroléteru se nanese na start chromatografické kolony. Petroléterem se vyluuje uhlovodíková frakce, zatímco polárnější látky zůstanou adsorbovány na silikagelu. Po oddestilování petroléteru se uhlovodíkový zbytek vysuší a zváží.

**Pomůcky**

Skleněná chromatografická kolona s kohoutem  
(25. 1,6 cm)  
100 ml varná baňka  
buničitá vata  
děrovaný kotouč filtračního papíru (Ø = 1,5 cm)

**Chemikálie**

petroléter, p. a. (b. v. 40–60 °C), bezvodý  
Pitrův širokoporézní silikagel zrnění 60 až 120 μm,  
částečně deaktivovaný 15% přidavkem vody. Příprava: silikagel se suší 24 h při 120 °C, k získanému plně aktivnímu materiálu v baňce se zátkou se přidá 15 % destilované vody. Za občasného protřepávání se uzavřená baňka nechá stát aspoň 24 h pro dosažení koncentrační rovnováhy silikagelu.

**Pracovní postup**

Příprava chromatografického sloupce: do jedné čtvrtiny výšky chromatografické kolony se nalije petroléter a do zúžené části sloupce nad kohoutem se vloží malý smotek buničité vaty. Do 250 ml Erlenmayerovy baňky se zabroušenou zátkou se odváží 15 g silikagelu a po přidavku 30 až 50 ml petroléteru a za občasného protřepávání se baňka nechá stát asi 10 min. Potom se obsah baňky převede do chromatografické kolony a na horní konec silikagelového sloupce se umístí kotouč filtračního papíru. Sloupec se potom promyje celkem asi 20 až 30 ml petroléteru tak, aby nad silikagelem byla neustále slabá vrstva petroléteru.

Vlastní stanovení: Zváženy vzorek nezmýdelnitelných látek nebo celkových lipidů (maximální množství 0,5 g) se převede nejmenším potřebným množstvím petroléteru na start silikagelového sloupce (za současného otevření výpustního kohoutu). Baňka a stěny kolony se opláchnou malým množstvím petroléteru. Po vsáknutí vzorku do sloupce se pod něj postaví zvážená 100 ml varná baňka a silikagel se začne promývat petroléterem. Prvních 10 ml není zapotřebí jímat. Po nastavení kohoutu na rychlost eluce 2 ml/min se do baňky jímá 60 ml petroléterové frakce. Po opláchnutí vývodu kolony se petroléter z baňky na vodní lázni oddestiluje a uhlovodíkový zbytek se dosuší při 105 °C a zváží. Vážení se opakuje v 15minutových intervalech, až rozdíl není větší než 0,002 g.

**Výpočet**

$$\% \text{ uhlovodíku (v kvas. suš.)} = \frac{U \cdot 160}{K}$$

kde

*U* je zjištěná váha uhlovodíkové frakce v g,

*K* — váha analyzovaného vzorku kvasinek (o 100% suš.) v g.

**Experimentální část****Stanovení lipidů, nezmýdelnitelných látek a uhlovodíků v krmném droždí z uhlovodíkových substrátů**

Uvedené metody byly použity pro analýzu různých vzorků krmného droždí, vyrobeného kultivacími kvasinky *Candida lipolytica* na různých frakcích ropy. Celkové lipidy a nezmýdelnitelný podíl těchto vzorků byly rovněž stanoveny dalšími dvěma analytickými postupy, jež se dříve používaly v našich laboratořích [11, 12]. Tyto metody jsou časově náročnější, poskytují méně reprodukovatelné výsledky a neumožňují stanovit uhlovodíky. Frakce



Tabulka 1. Obsah celkových lipidů a nezmýdelnitelných látek (stanovené metodami podle Wilhelmové, Bibové a Hummelové) a uhlovodíků (stanovených chromatograficky) v krmném droždí (vyrobeném na minerálním médiu s různými frakcemi ropy). Výsledky jsou průměry ze 2 stanovení

| Číslo vzorku | metoda podle Wilhelmové (11) |                   | chromatogr. stanovené uhlovodíky % | modifikace (11) podle Bibové (12) |                   | chromatogr. stanovené uhlovodíky % | modifikovaná Hummelova metoda |                   | chromatogr. stanovené uhlovodíky % |
|--------------|------------------------------|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------|------------------------------------|
|              | celkové lipidy %             | nezmýdel. podíl % |                                    | celkové lipidy %                  | nezmýdel. podíl % |                                    | celkové lipidy %              | nezmýdel. podíl % |                                    |
| 1            | 3,14                         | 0,55              | 0,41                               | 14,80                             | 2,77              | 1,32                               | 17,06                         | 3,84              | 1,86                               |
| 2            | 6,82                         | 1,53              | 0,60                               | 14,84                             | 3,38              | 1,14                               | 16,84                         | 4,02              | 1,87                               |
| 3            | 14,41                        | 8,15              | 6,94                               | 19,49                             | 14,71             | 8,88                               | 21,10                         | 15,41             | 9,39                               |
| 4            | 16,95                        | 11,21             | 7,39                               | 22,45                             | 14,87             | 10,57                              | 26,62                         | 16,08             | 14,33                              |

nezmýdelnitelných látek, získané těmito metodami, jsem pro srovnání výsledků dále analyzovala sloupcovou adsorpční chromatografií. Analýzy 4 vzorků krmného droždí, udělané třemi různými metodami, jsou srovnány v tabulce 1.

Z uvedených hodnot vyplývá, že nezmýdelnitelný podíl nemůže charakterizovat obsah uhlovodíků v analyzovaném vzorku. Při porovnávání těchto tří metod stanovení celkových lipidů jde pouze o porovnání účinnosti extrakcí a velikosti manipulačních ztrát, neboť hydrolýza kvasinek, zmýdelňování a chromatografie jsou u všech tří metod shodné. Z toho lze uzavřít, že extrakce v Kutcher-Steudelových extraktorech nezaručuje kvantitativní extrakty lipidů. Rovněž obě předchozí metody jsou časově náročnější, omezené pouze na stanovení nezmýdelnitelného podílu a vyznačují se větší možností manipulačních ztrát.

#### Dělení modelové směsi lipidů a lipidického extraktu z krmného droždí sloupcovou adsorpční chromatografií a na tenké vrstvě silikagelu

##### Materiál a metody

K eluci ze sloupce silikagelu byla použita tato redestilovaná rozpouštědla:

- petroléter (b. v. 40 až 60 °C)
- petroléter s 5 % éteru
- petroléter s 10 % éteru
- petroléter s 25 % éteru
- petroléter s 50 % éteru
- éter s 2 % metanolu
- éter se 4 % kyseliny octové

Lipidické směsi byly eluovány uvedenými rozpouštědly postupně za sebou. Jednotlivé frakce elutů byly jímány v množství po 10 ml do zvážených 50 ml varných baněk a po oddestilování rozpouštědla se sušily do konstantní váhy. Kvalitativní složení jednotlivých frakcí se sledovalo chromatografií na tenké vrstvě silikagelu G (E. Merck, Darmstadt, NSR, tloušťka vrstvy 0,2 mm) na skleněných deskách (20.10 cm). Vzestupné vyvíjení soustavou petroléter (b. v. 40 až 60 °C):éter:kys. octová = 90:10:1 trvá 30 min. Skvrny byly detekovány 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zahřátím desek plamenem plynového hořáku.

Použitá směs lipidů pro dělení na sloupci silikagelu:

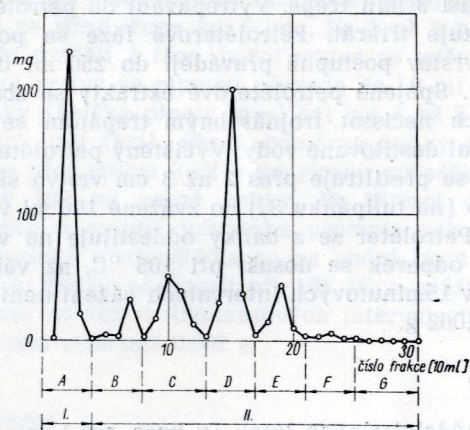
- modelová směs: 0,24 g n-pentadekán, 0,04 g C<sub>10</sub>-cholesterát, 0,06 g metylpalmitát, 0,11 g kys.

palmitová, 0,05 g cholesterol, 0,20 g oktylalkohol, 0,03 g dioleylecitin,

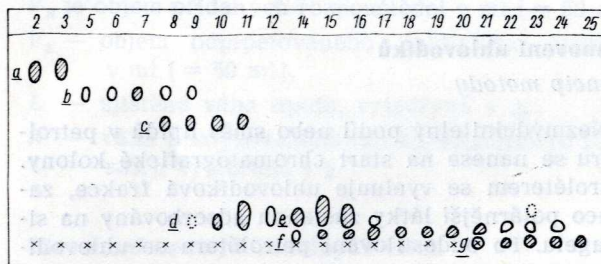
b) lipidický extrakt z kvasinek *C. lipolytica* z kultivace na plynovém oleji, v množství 0,113 g.

##### Výsledky

Eluční schéma modelové směsi lipidů a chromatogram vážitelných eluovaných frakcí na tenké vrstvě je znázorněn na obr. 1 a 2. Eluční schéma lipidického extraktu a tenkovrstevný chromatogram



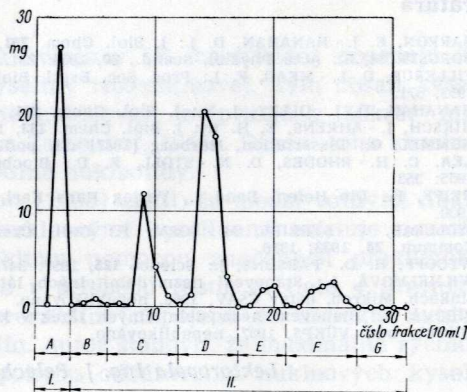
Obr. 1. Eluční schéma modelové směsi lipidů z chromatografického sloupce silikagelu. Frakce jímány po 10 ml elutů. Použitá eluční činidla: a) petroléter, b) petroléter s 5 % éteru, c) petroléter s 10 % éteru, d) petroléter s 25 % éteru, e) petroléter s 50 % éteru, f) éter s 2 % metanolu, g) éter se 4 % kyseliny octové (I — uhlovodíky, II — lipidy).



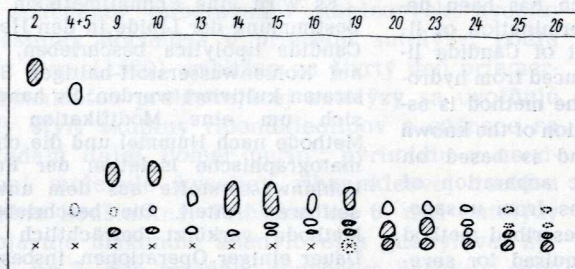
Obr. 2. Tenkovrstevná chromatografie vážitelných eluovaných frakcí modelové směsi lipidů (čísla nahoře odpovídají číslům frakcí ze sloupcové adsorpční chromatografie na obr. 1). Vzestupné vyvíjení soustavou petroléter (b. v. 40–60 °C):éter:kys. octová = 90:10:1. Doba vyvíjení 30 min. Detekce 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zahřátím plamenem plynového hořáku. Skvrny a) n-pentadekán, b) C<sub>10</sub>-cholesterát, c) metylpalmitát, d) kys. palmitová, e) oktylalkohol, f) cholesterol, g) dioleylecitin.\*)



eluovaných frakcí je na obr. 3 a 4. Je zřejmé, že eluce obou lipidických směsí proběhla obdobně a že uhlovodíková frakce (I) se dobře dělí od lipidických látek (II). Lze však předvídat, že v přítomnosti většího množství esterů steroidů by mohly tyto látky částečně přecházet do uhlovodíkové frakce, což lze zcela bezpečně eliminovat předchozím zmydlením lipidů.



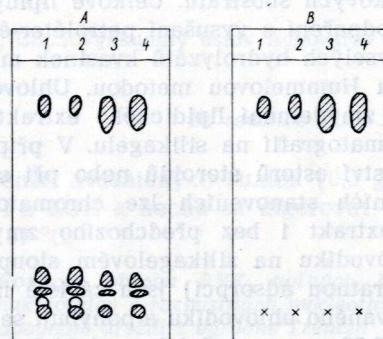
Obr. 3. Eluční schéma lipidického extraktu z krmného droždí vyrobeného z minerálního média s plynovým olejem. Frakce jímány po 10 ml eluátu. Použitá eluční činidla: a) petroléter, b) petroléter s 5 % éteru, c) petroléter s 10 % éteru, d) petroléter s 25 % éteru, e) petroléter s 50 % éteru, f) éter s 2 % metanolu, g) éter se 4 % kys. octové (I — uhlovodíky, II — lipidy).



Obr. 4. Tenkovrstevná chromatografie važitelných eluovaných frakcí (ze sloupce silikagelu, čísla odpovídají frakcím na obr. 3) lipidického extraktu z krmného droždí vyrobeného z minerálního média s plynovým olejem. Vzestupně vyvíjený soustavou petroléter (b. v. 40–60 °C): éter: kys. octová = 90:10:1. Doba vyvíjení 30 min. Detekce 50 %  $H_2SO_4$  a zahřátím plamenem plynového hořáku.\*)

Rozdílnost složení nezmýdelnitelného podílu a uhlovodíkové frakce z chromatografického sloupce je patrna z obrázku 5. Zatímco chromatogram A vykazuje skvrny, příslušející kromě uhlovodíků ještě

dalším látkám (alkoholy, steroidy, aj.), vykazuje chromatogram B (uhlovodíkové frakce) skvrny příslušející pouze uhlovodíkům.



Obr. 5. Tenkovrstevná chromatografie složek nezmýdelnitelného podílu 4 různých vzorků krmného droždí z plynového oleje (A) a stejných vzorků po přečištění na chromatografickém sloupci, tj. čisté uhlovodíkové frakce (B). Na vrstvě silikagelu B bylo vzestupně vyvíjeno 30 min. soustavou petroléter (b. v. 40–60 °C): éter: kys. octová = 90:10:1. Detekce 50 %  $H_2SO_4$  a zahřátím plamenem plynového hořáku.\*)

\* Největší barevná intenzita detekovaných skvrn je vyznačena čárkovaním skvrn. Nejmenší barevná intenzita je vyznačena vtečkovaním obrysů skvrn.

### Ztráty uhlovodíků při chromatografii na sloupci silikagelu

Pro zjištění dokonalosti eluce uhlovodíků petroléterem (nevratná adsorpce) byla na sloupci silikagelu chromatografována různá množství n-pentadekánů. Množství n-pentadekánů aplikovaná na silikagelový sloupec a nalezená množství uhlovodíku v jímáných 60 ml frakcích jsou uvedeny v tabulce 2, kde jsou rovněž uvedeny ztráty v % původního množství uhlovodíku.

Z tabulky 2 je zřejmé, že oddělení uhlovodíku tímto chromatografickým postupem poskytuje uspokojivé výsledky v uvedeném rozmezí koncentrací n-pentadekánů. Průběh eluce uhlovodíku je patrný z tabulky 3, kdy bylo na sloupec silikagelu vneseno 0,5039 g n-pentadekánů a byla stanovena množství eluovaná postupně 10 ml dávkami petroléteru. Většinu n-pentadekánů vyeluovala již 2. dávka, 3. dávka extrakci ukončila. Celkem bylo získáno 0,5037 g n-pentadekánů, což činí 99,95 % původního množství.

Tabulka 2. Ztráty pentadekánů při sloupcové chromatografii na silikagelu

| Číslo frakce | Množství aplikovaného pentadekánů g | Nalezené množství pentadekánů g | Ztráty % |
|--------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------|
| 1            | 0,5039                              | 0,5037                          | 0,1      |
| 2            | 0,4858                              | 0,4813                          | 0,9      |
| 3            | 0,2440                              | 0,2397                          | 1,9      |
| 4            | 0,1229                              | 0,1206                          | 1,9      |
| 5            | 0,0745                              | 0,0708                          | 5,0      |
| 6            | 0,0144                              | 0,0129                          | 10,3     |

Tabulka 3. Průběh chromatografické eluce 0,5039 g n-pentadekánů ze sloupce silikagelu petroléterem

| Číslo frakce | Množství petroléterové frakce ml | Nalezená množství pentadekánů g |
|--------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 1            | 10                               | 0,0000                          |
| 2            | 10                               | 0,4414                          |
| 3            | 10                               | 0,0623                          |
| 4            | 10                               | 0,0000                          |
| 5            | 10                               | 0,0000                          |
| 6            | 10                               | 0,0000                          |



### Závěr

Je popsán rychlý způsob stanovení celkových lipidů a uhlovodíků v krmném droždí vyrobeném z uhlovodíkových substrátů. Celkové lipidy se stanovují po odpaření a vysušení petroléter-éterových extraktů kyselých hydrolyzátů kvasinek mírně modifikovanou Hummelovou metodou. Uhlovodíky se stanoví po zmýdlení lipidického extraktu sloupcovou chromatografií na silikagelu. V případě malého množství esterů steroidů nebo při sériových a orientačních stanoveních lze chromatografovat lipidický extrakt i bez předchozího zmýdlení. Ztráty uhlovodíku na silikagelovém sloupci (způsobené nevratnou adsorpcí) jsou závislé na množství aplikovaného uhlovodíku a pohybují se při vnesení 0,01–0,50 g n-pentadekánu od 10,3 do 0,1 %.

Metoda byla ověřena chromatografickou elucí modelové směsi lipidů a lipidického extraktu z krmného droždí vyrobeného kultivací kvasinky *C. lipolytica* na minerálním mediu s plynovým olejem. Chromatografií na tenké vrstvě silikagelu G bylo

sledováno složení jednotlivých eluovaných frakcí ze sloupce silikagelu a rovněž porovnáno složení nezmýdelnitelných podílů s uhlovodíkovými frakcemi z chromatografických sloupců. Bylo prokázáno, že nezmýdelnitelný podíl nemůže být kritériem obsahu uhlovodíku v kvasinkách získaných z uhlovodíkových substrátů.

### Literatura

- [1] BARRON, E. J. - HANAHAN, D. J.: J. Biol. Chem. **231**, 1958: 493.
- [2] BORGSTRÖM, B.: Acta Physiol. Scand., **30**, 1954: 231.
- [3] FILLERUP, D. L. - MEAD, F. J.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **83**, 1953, 571.
- [4] HANAHAN, D. J. - OLLEY, J. N.: J. Biol. Chem. **231**, 1958: 813.
- [5] HIRSCH, J. - AHRENS, E. H. Jr.: J. Biol. Chem. **233**, 1958: 311.
- [6] HUMMEL, O.: Dissertation, Marburg (1947) cit. podle 8.
- [7] LEA, C. H. - RHODES, D. N. - STOLL, R. D.: Biochem. J. **60**, 1955: 353.
- [8] REIFF, F.: Die Hefen, Band I., Verlag Hans Karl, Nürnberg 1930.
- [9] WOLLRAB, V. - STREIBL, M. - ŠORM, F.: Coll. Czech. Chem. Commun. **28**, 1963: 1316.
- [10] WYCOFF, H. D. - PARSONS, J.: Science **125**, 1957: 347.
- [11] WILHELMOVÁ, L.: Stanovení nezmýdelnitelných látek v kvasinkách. Mikrob. ústav ČSAV, 1966, nepublikováno.
- [12] BÍBOVÁ, E.: Stanovení nezmýdelnitelných látek v kvasinkách. Mikrob. odd. VÚKPS, 1967, nepublikováno.

Lektorovala Ing. J. Pelechová, CSc.