

# Aplikace plynové chromatografie při analýze produktů buněčného metabolismu

576.8.095.3  
543.544.2

Ing. JAN PÁCA, CSc., VŠCHT, katedra kvasné chemie a technologie, Praha,

Ing. PETR UNGER, Ing. ZDENA VOZŇÁKOVÁ, CSc., VŠCHT, katedra instrumentální analýzy, Praha

## 1. ÚVOD

Při kultivaci prokaryotických i eukaryotických buněk se kromě růstu a dělení buněk tvoří i vedlejší extracelulární metabolické produkty. Tvorba koncových produktů buněčného metabolismu závisí na druhu mikroorganismu, jeho enzymovém vybavení a kromě genetických změn převážně na kultivačních podmínkách, a to na limitaci živinami, pH média, osmotických vlivech atd. Protože většina používaných mikroorganismů patří mezi fakultativní druhy ve vztahu ke kyslíku, je nutno uvažovat i tento faktor.

U bakteriálních buněk je např. proces aerobní respirace značně ovlivněn limitací kyslíkem [1–3], represivním účinkem glukózy [4, 5] a limitací živinami [6, 7], které ovlivňují rovnováhu mezi katabolickými a anabolickými procesy. Neuvažujeme-li vliv podmínek prostředí na zastoupení různých metabolických drah v počáteční fázi metabolismu cukrů, lze předpokládat, že hlavní vliv na druhy koncových produktů metabolismu má způsob štěpení pyruvátu. U chemoorganotrofních bakterií jsou koncovými produkty metabolismu kromě plynů etanol, butanol, 2-propanol, 2,3-butandiol, kyselina mravenčí, octová, propionová, máselná, mléčná, jantarová, aceton, trimetylglykol a acetoin [9, 10].

Také u kvasinek závisí způsob štěpení pyruvátu na přítomnosti či nepřítomnosti kyslíku, na pH média a dalších faktorech. Produkty metabolismu jsou za anaerobních podmínek etanol [11], glycerol [12], v alkalickém prostředí vznikají současně etanol, kyselina octová a glycerol [13] a v nepřítomnosti N-ždroje se tvoří pyruvát a glycerol [14]. Za aerobních podmínek je pyruvát v oxidativních drahách převáděn na dikarboxylové kyseliny, které jsou dále využívány v anabolismu. Metabolické produkty plísň jsou mnohem rozmanitější než u kvasinek. Vzhledem k zaměření této práce proto uvádíme pouze několik druhů, a to organické kyseliny, alkoholy a jejich estery [15], hydroxykyseliny [16, 17], nenasycené a nasycené mastné kyseliny volné nebo ve formě glyceridů [18].

Některých z uvedených produktů buněčného metabolismu se používá i jako zdroje uhlíku a energie pro růst bakteriálních a kvasničných buněk. Jsou to hlavně nižší alkoholy [19–25] a kyselina octová [19, 26 až 28].

Pro nalezení vhodných podmínek kultivačního procesu a jeho řízení je proto třeba mít k dispozici vhodné analytické metody pro stanovení uvedených produktů, event. substrátů. Většinu uvedených látek lze s výhodou analyzovat plynovou chromatografií, která umožňuje rychlé a ve většině případů i dostatečně přesné stanovení. Výhodou plynové chromatografie je možnost vzájemného rozdělení nejen sledovaných látek, ale i jejich separace od ostatních složek přítomných v kultivačním médiu [29, 30].

Ke stanovení etanolu a těkavých mastných kyselin plynovou chromatografií lze použít řady zakotvených fází jako polyetylglykoladipátu, OV silikonu nebo adsorbentů polymerního charakteru typu Chromosorb 101, Porapak Q aj. [31–33]. Volba náplně chromatografické kolony závisí i na ostatních látkách přítomných

v analyzovaných vzorcích. Rozhodující je rovněž, zda se stanovení provádí přímo ve vodných roztocích nebo v nevodném prostředí po extrakci vhodným rozpouštědlem.

Tento článek se zabývá metodikou stanovení etanolu a těkavých mastných kyselin se dvěma až pěti uhlíky v molekule. Na rozdíl od jiných metod [34] se stanovení provádí ve vodném prostředí kultivačního média.

## 2. METODIKA

### 2.1 Přístroje a zařízení

Analýzy standardních směsí i vzorků odebraných v průběhu kultivace byly provedeny na plynovém chromatografu CHROM 41 (Laboratorní přístroje, Praha).

Kultivace byly prováděny ve věžovém více stupňovém fermentoru složeném z pěti stupňů [35]. Čtyři spodní stupně byly reakční, horní stupeň sloužil k odvádění média a destrukci pěny. Jednotlivé stupně byly odděleny perforovanými přepážkami a všechny stupně byly opatřeny mechanickým mícháním. Použitým mikroorganismem byla *Candida utilis* č. 136 ze Sbírkky katedry kvasné chemie a technologie VŠCHT, Praha. Zdrojem uhlíku a energie pro růst buněk byl syntetický etanol. Podmínky kultivace jsou uvedeny v jiné práci [36].

### 2.2 Chemikálie

Standardní směsi etanolu, kyseliny octové, propionové, i-máselné, i-valerové a valerové, popřípadě acetaldehydu byly připraveny z čistých složek navažováním a ředěním. Vzorky pro analýzu se odebíraly z ustálených stavů kontinuálních kultur [36].

### 2.3 Podmínky chromatografické analýzy

K separaci etanolu a těkavých mastných kyselin se použila skleněná kolona délky 240 cm o vnitřním průměru 3 mm, plněná Chromosorbem WAW (0,125 až 0,160  $\mu$ m) a s 10 % Hallcomidu M 18 a 1 %  $H_3PO_4$ . Oba konce kolony byly opatřeny ucpávkami z křemenné vaty, preparované 5% vodným roztokem  $H_3PO_4$ . Touto preparací ucpávek se dosáhlo větší symetričnosti elučních křivek než při použití ucpávek bez  $H_3PO_4$ . Vzhledem k tomu, že v ucpávce na vstupu do kolony se zachycovaly netěkavé složky vzorku, anorganické soli, byla ucpávka vždy jednou denně vyměněna.

Po naplnění se kolona stabilizovala takto: nejdříve se vyhřála po dobu 4 hodin na teplotu 80 °C při průtoku dusíku 30 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup>. Potom se teplota programově zvyšovala rychlostí 10 °C  $\cdot$  min<sup>-1</sup> na 145 °C a stabilizovala 8 hodin.

Vlastní analýzy se prováděly při teplotě kolony 132 °C, teplotě nástřiku 170 °C a průtoku nosného plynu dusíku 40 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup> na plamenovém ionizačním detektoru.

Nástřik se prováděl přímo na kolonu.

### 2.4 Úprava vzorků

K uvolnění těkavých mastných kyselin přítomných ve vzorku ve formě solí a k odstranění rozpuštěných organických látek přítomných v kultivačním médiu se vzor-



ky upravovaly takto: do kónické zkumavky se pipetovalo 5 ml dobře promíchaného vzorku, ke vzorku se přidal 1 ml 25% kyseliny metafosforečné a po stání 30 min se vzorek odstředil. Čirý roztok se potom dávkoval přímo do chromatografu.

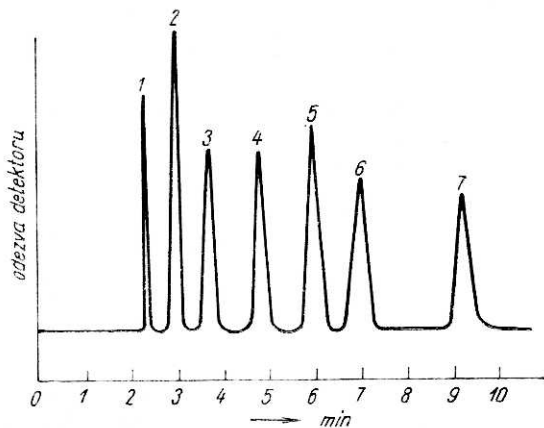
## 2.5 Pracovní postup

Vždy před započítím práce se kolona vypreparovala 10 nástřiky 1  $\mu$ l vodným roztokem směsi kyseliny octové a propionové v 1%  $H_3PO_4$  o koncentraci každé kyseliny 1 g.l<sup>-1</sup>. Během analýzy se před každým nástřikem vzorku nebo standardního roztoku kyselin prováděl nástřik 0,5  $\mu$ l uvedené směsi kyselin octové a propionové. Objem vzorků a standardů byl vždy 0,5  $\mu$ l.

Ke kvantitativnímu vyhodnocení analýz se použilo metody absolutní kalibrace z ploch elučních křivek. K tomu se připravily standardní směsi o různém obsahu etanolu, kyseliny octové a propionové ve vodě s odpovídajícím přísadkem 25% kyseliny metafosforečné.

## 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Na zvolené náplni Hallcomidu M 18 s 1%  $H_3PO_4$  se za daných podmínek dostatečně separuje etanol i těkavé mastné kyseliny, jak je zřejmé z obr. 1.



Obr. 1. Typický chromatogram na Chromosorbu W AW s 10% Hallcomidu M-18 a 1%  $H_3PO_4$

1 — etanol, 2 — kyselina octová, 3 — kyselina propionová, 4 — kyselina izomásečná, 5 — kyselina n-másečná, 6 — kyselina izovalerová, 7 — kyselina n-valerová.

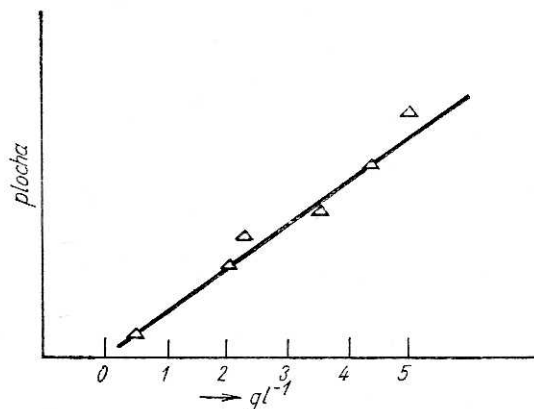
Vzhledem k tomu, že acetaldehyd jako jeden z produktů buněčného metabolismu by mohl být v analyzovaných roztocích přítomen, sledovala se rovněž možnost separace acetaldehydu od jmenovaných látek. Za podmínek analýzy je na dané koloně relativní retenční čas acetaldehydu vztahený na etanol 0,75, tzn. stanovení neruší.

V reálných vzorcích byly identifikovány vedle etanolu pouze kyselina octová a propionová. Acetaldehyd je nestabilním produktem, lze proto předpokládat, že při daném způsobu kultivace, tj. při relativně vysokém parciálním tlaku kyslíku ( $2,94 \cdot 10^{-2}$  MPa), přiváděném do prvního stupně fermentoru se acetaldehyd oxiduje na kyselinu octovou.

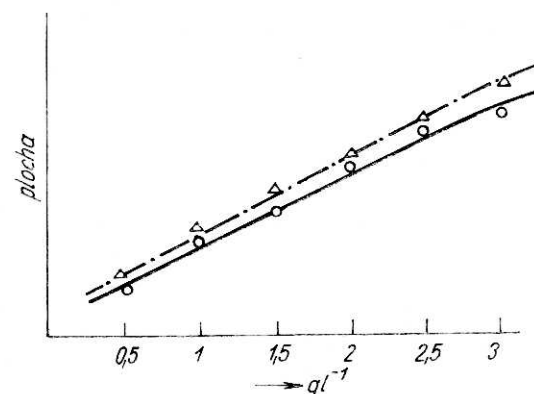
Kvantitativní stanovení etanolu nečiní potíže.

K dosažení správných a reprodukovatelných výsledků i pro těkavé kyseliny je však nutno dodržet určitý postup, vypracovaný na základě analýz standardních směsí. Pro danou náplň kolony a analyzovaný systém bylo zjištěno, že k získání reprodukovatelných výsledků je nutné před dávkováním vzorků i standardů vždy vypreparovat kolonu opakovanými nástřiky směsi 1%

$H_3PO_4$  a kyselin, které jsou přítomny ve vzorcích. Tato preparace slouží k nasycení aktivních center náplně kolony příslušnými kyselinami [37]. Tím se vyloučí obsazování zmíněných center kyselinami obsaženými ve vzorcích a výsledky se nezkreslují.



Obr. 2. Koncentrační závislost pro etanol, plocha píku versus koncentrace



Obr. 3. Koncentrační závislost pro kyseliny, plocha píku versus koncentrace:

○ — kyselina octová, Δ — kyselina propionová.

Tabulka 1. Výsledky stanovení standardních směsí etanolu, kyseliny octové a propionové. Uvedené hodnoty jsou průměrnými hodnotami z 10 stanovení.

| Standardní vzorek   | Standardní koncentrace<br>g/l <sup>-1</sup> | Stanovená koncentrace<br>g/l <sup>-1</sup> | Standardní relativní odchylka v % |
|---------------------|---|--|-----------------------------------|
| Etanol              | 10,1  | 10,5                                       | 2,5                               |
|                     | 21,4  | 21,1                                       | 2,8                               |
|                     | 31,5  | 32,3                                       | 3,2                               |
| Kyselina octová     | 0,603                                       | 0,624                                      | 4,2                               |
|                     | 1,230                                       | 1,280                                      | 4,5                               |
|                     | 2,843                                       | 2,750                                      | 5,3                               |
| Kyselina propionová | 0,432                                       | 0,461                                      | 5,1                               |
|                     | 0,763                                       | 0,810                                      | 4,9                               |
|                     | 2,536                                       | 2,594                                      | 5,5                               |

Reprodukovatelnost stanovení je rovněž ovlivněna velikostí a způsobem nástřiku. Při vyšších nástřicích nebo vyšších koncentracích kyselin se eluční křivky deformují a tím vznikají chyby při kvantitativním vyhodnocení. Optimální nástřik pro ověřovaný rozsah koncentrací byl 0,5  $\mu$ l. Lepší reprodukovatelnosti se dosáhlo volbou nástřiku přímo do kolony oproti nástřiku do prostoru nástřikové komory. V nástřikové komoře přichází



vzorek do styku s kovem [nerozavějícím], na němž může probíhat za zvýšené teploty rozklad, popřípadě sorpce kyselin.

Popsaná metodika byla prověřena v oboru koncentrací etanolu 0,100 až 5,000 g.l<sup>-1</sup>, kyselin 0,500 až 3,00 g.l<sup>-1</sup>. Detektor vykazoval pro etanol lineární odezvu v širokém rozmezí sledovaných koncentrací [obr. 2], kalibrační křivky pro stanovení kyseliny octové a propionové nejsou v celém rozsahu lineární, jak je zřejmé z obr. 3.

Pro zmíněný obor koncentrací byla určena relativní směrodatná odchylka z 10 paralelních měření. Výsledky jsou shrnuty v tab. 1.

Na základě dosažených výsledků je zřejmé, že vypracovaná metoda je z hlediska přesnosti i reprodukovatelnosti vhodná pro analytickou kontrolu kultivačního procesu. Obsah etanolu a těkavých mastných kyselin C<sub>2</sub> až C<sub>5</sub> lze sledovat v oboru koncentrací, odpovídajících poměrům v uvedeném typu věžového fermentoru, který je schopen zpracovávat vysoké koncentrace etanolu i dostatečně využít kyslík ze vzduchu a kromě toho i kyselinu octovou jako C-zdroj k tvorbě biomasy.

Proti metodám, které vyžadují přehánění vodní párou [38, 39], popřípadě extrakci sledovaných látek do nevodného prostředí [40] před vlastním stanovením, dovoluje uvedený postup rychlé a přímé stanovení těkavých mastných kyselin ve vodném prostředí.

#### Literatura

- [1] EHRLICH, H. L. - SEGEL, I. H.: J. Bacteriol., **77**, 1959, s. 110
- [2] TRUDINGER, P. A.: Biochem. J., **78**, 1961, s. 673
- [3] WIMPENNY, J. W. T.: Biochem. J. **100**, 1963, s. 59P
- [4] OKINAKA, R. T. - DOBROGOSZ, W. J.: Bacteriol., **93**, 1967, s. 1644
- [5] COLE, H. - WIMPENNY, J. W. T. - HUGHES, D. E.: Biochem. J., **100**, 1966, s. 81P
- [6] GRAY, C. T. - WIMPENNY, J. W. T. - MOSSMAN, M. R.: Biochim. Biophys. Acta, **117**, 1966, s. 33
- [7] DOELLE, H. W.: Bacterial Metabolism, Academic Press, New York, 1969, s. 199
- [8] STAINER, R. Y. - DOUDOROFF, M. ADELBERG, E. A.: The Microbial World, 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1965
- [9] WOOD, W. A.: The Bacteria (Gunsalus, I. C. - Stainer, R. Y. Eds.), Vol. 2, Academic Press, New York, 1961, s. 59
- [10] WARD, P. F. V. - CRAMPTON, D. W. T.: Proc. Roy. Soc., Series B, **172**, 1969, s. 65
- [11] GANCEDO, C. - GANCEDO, J. M. SOLS, A.: Enz. J. Biochem., **5**, 1966, s. 165
- [12] SOLS, A. GANCEDO, C. - DELAFUENTE, G.: The Yeasts (Rose, A. H. - Harrison, J. S. Eds.), Vol. 2, Academic Press, London, 1971, s. 271
- [13] NEUBERG, C. - KOBEL, M.: Biochem. Z. **219**, 1930, s. 490
- [14] BIRKINSHAW, J. H. - MORGAN, E. N.: Biochem. J., **47**, 1950, s. 55
- [15] STODOLA, F. H. - FRIEDKIN, M. - MOYER, A. J. - COCHILL, R. D.: J. Biol. Chem., **161**, 1945, s. 739
- [16] SJÖLÄNGER, J. R. - FOLKERS, K. - ADELBERG, E. A. - TATUM, E. L.: J. Amer. Chem. Soc., **76**, 1954, s. 1085
- [17] BIRKINSHAW, J. H.: The Fungi (Ainsworth, G. C. - Sussman, A. S. Eds.), Vol. 1, Academic Press, New York, 1965, s. 179
- [18] TERUI, G. - SUGIMOTO, M.: J. Ferment. Technol., **47**, 1969, s. 382
- [19] OGATA, K. - NISHIZAWA, H. - OHSUGI, M. - TOCHIKURA, T.: J. Ferment. Technol., **48**, 1970, s. 389
- [20] OGATA, K. - NISHIZAWA, H. - OHSUGI, M. - TOCHIKURA, T.: J. Ferment. Technol., **48**, 1970, s. 470
- [21] AKIBA, T. - UEYMA, H. - SEKI, M. FUKIMBARA, T.: J. Ferment. Technol., **48**, 1970, s. 323
- [22] AKIBA, T. - FUKIMBARA, T.: J. Ferment. Technol., **51**, 1973, s. 134
- [23] MUROOKA, Y. - HARADA, T.: Agr. Biol. Chem., **31**, 1967, s. 1035
- [24] GOTO, S. - KITAI, A. - OZAKI, A.: J. Ferment. Technol., **51**, 1973, s. 582
- [25] PAYNE, W. J.: Ann. Rev. Microbiol., 1970, s. 17
- [26] CAMA, F. J. - EDWARDS, V. H.: J. Ferment. Technol., **48**, 1970, s. 787
- [27] KO, R. Y. C. - EDWARDS, V. H.: Biotechnol. Bioeng., **17**, 1975, s. 965
- [28] JAIN, N. C. CRAVEY, R. H.: J. Chromatog. Sci., **10**, 1972, s. 257
- [29] JAIN, N. C. CRAVEY, R. H.: J. Chromatog. Sci., **10**, 1972, s. 263
- [30] KAPLANOVÁ, B. - JANÁK, J.: Microchim. Acta, 1966, s. 113
- [31] ROGOSA, M. - LOVE, L.: Appl. Microbiol., **16**, 1968, s. 285
- [32] SMOLKOVÁ, E. - FELTL, L. - PACÁKOVÁ, V. - ŠEVČÍK, J.: Plynová chromatografie II., SPN, Praha, 1975
- [33] SESTÁKOVÁ, M.: Kvas. prům., **21**, 1975, č. 11, s. 252
- [34] PÁCA, J. - GRÉGR, V.: Biotechnol. Bioeng., **18**, 1976, s. 1075
- [35] PÁCA, J. - GRÉGR, V.: Biotechnol. Bioeng., **19**, 1977, s. 539
- [36] WHITE, W. R. - LEENHEER, J. A.: J. Chromatog. Sci., **13**, 1975, s. 387
- [37] MAHAVEDAN, V. - ZIEVE, L.: J. Lipid Res., **10**, 1969, s. 338
- [38] PERRY, T. L. - DIAMOND, S. - MOK, C. HANSEN, S. - BULLES, B. MELANCON, S. B.: Clin Chem. Acta, **29**, 1970, s. 369
- [39] REMESY, C. - DEMIGNE, C.: Biochem. J., **141**, 1974, s. 85

**Páca J., Unger P., Vozňáková Z.: Aplikace plynové chromatografie při analýze produktů buněčného metabolismu.** Kvas. prům. **24**, 1978, č. 9, s. 208—211.

Je popsána metoda pro stanovení etanolu a těkavých mastných kyselin umožňující přímé stanovení těchto látek ve vodném prostředí kultivačního média. Analýzy se prováděly na plynovém chromatografu Chrom 41, k separaci se použilo náplně Chromosorb WAW s Hallcomidem M18 a 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Výsledky ukázaly, že vypracovaná metoda je vzhledem k přesnosti a reprodukovatelnosti stanovení vhodná pro analytickou kontrolu kultivačního procesu.

**Паца, Я., Унгер, П., Вознякова, З.: Применение газовой хроматографии при анализе продуктов клеточного метаболизма.** Квас. прум. **24**, 1978, № 9, стр. 208—211.

Описан метод для определения этанола и летучих жирных кислот, дающий возможность прямого установления этих веществ в водной фазе культуральной среды. Анализы проводились на газовом хроматографе Chrom 41 для сепарации была применена насадка Chromosorb WAW, Hallcomid M 18 и 1%-ная H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Результаты показали, что разработанный метод ввиду точности и воспроизводимости определения подходит для целей аналитического контроля процесса культивирования.

**Páca J., Unger P., Vozňáková Z.: Application of Gas Chromatography for Analysis of Cell Metabolic Products.** Kvas. prům. **24**, 1978, No. 9, pp. 208—211.

A method for the estimation of ethanol and volatile fatty acids by gas chromatography by direct treatment of cultivation broth is described. The measurements were made on a gas chromatograph Chrom 41. The packing material was Hallcomid M-18 with 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> on Chromosorb WAW. With the experimental conditions found in this study the method described gave reproducible and accurate results for the analytical control of cell cultivation.

**Páca J., Unger F., Vozňáková Z.: Applikation der Gaschromatographie bei der Analyse der Produkte des Zell-Metabolismus.** Kvas. prům. **24**, 1978, No. 9, S. 208—211.

In dem Artikel wird eine Methode zur Bestimmung des Äthanol und der flüchtigen Fettsäuren beschrieben, die die direkte Bestimmung dieser Substanzen im Wassermilieu des Kultivationsmediums ermöglicht. Die Analysen wurden auf dem Chromatographen Chrom 41 durchgeführt; zur Separation wurde die Füllung Chromosorb WAW mit Hallcomid M18 und 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> angewendet. Die Ergebnisse zeigten, daß die vorgeschlagene Methode mit Hinsicht zur Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für die analytische Kontrolle des Kultivationsprozesses geeignet ist.