

# Kvantitatívne stanovenie obsahu kyseliny kójovej vo fermentačných tekutinách húb metódou difúzie v agarových platniach a spektrofotometricky

663.1 663.11 579

Ing. JOZEF DOBIAS, CSc., Ing. JÚLIUS BRŤKO, CSc., člen korespondent SAV a ČSAV PAVEL NEMEC, Ústav experimentálnej endokrinológie, Centrum fyziologických vied, Slovenská akadémia vied, Bratislava

**Kľúčová s'lova:** kyseliny kójová, mikroorganizmus, fermentace, difúze, agar, spektrofotometr, Folinovo činidlo.

Kyselina kójová sa produkuje mnohými druhmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium* na vhodných kultivačných pôdach [Korzybski et al. 1967; Zelinka, 1960; Miller, 1961]. Kvantitatívne stanovenie kyseliny kójovej v roztokoch sa môže urobiť buď spektrofotometricky meraním červeného sfarbenia s  $\text{FeCl}_2$  a  $\text{FeCl}_3$ , titráciou slabými roztokmi  $\text{NaOH}$  a  $\text{KOH}$  alebo gravimetricky tak, že sa kyselina kójová vyzráža ako meďnatá soľ [Bielik, 1956]. Iná titračná metóda je založená na kvantitatívnom rozklade kyseliny kójovej alkalickým roztokom jódu [Birkinshaw a Raistrick, 1931]. V našej práci popisujeme metódu kvantitatívneho stanovenia kyseliny kójovej metódou difúzie v agarovej platni. Jav difúzie v agarovej platni je kvantitatívne determinovaný Fickovými zákonmi a jeho praktické využitie sa podrobne popisuje Kavanaghom [1963] v monografii o analytických metódach v mikrobiológii. Pri spektrofotometrickom stanovení sa využila farebná reakcia kyseliny kójovej s  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  (červené zafarbenie) a Folinovým skúmadlom (modré zafarbenie).

## MATERIÁL A METÓDY

**Mikroorganizmy.** *Aspergillus tamarii*, zbierkové číslo 107 pochádza zo Zbierky mikroorganizmov katedry botaniky, Prírodovedeckej fakulty Univerzity Karlovej v Prahe. *Penicillium* sp. číslo V-29 je zo Zbierky mikroorganizmov Ústavu molekulárnej biológie SAV.

**Kultivácia mikroorganizmov.** Kultivácia sa robila v Petriho miskách na Sabouraudovom agare [Imuna, n. p., Šaříšské Michaľany].

**Použitie zlúčeniny.** Kyselina kójová sa izolovala z huby *Aspergillus tamarii* podľa metódy popísanej Dobiasom et al. [1977].  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  p. a. [Lachema n. p. Brno] a Folin-Ciocalteuovo skúmadlo [Stahl, 1969].

**Metóda stanovenia difúziou v agarových platniach.** Štandardné platne pre stanovenie sa pripravila nasledovným spôsobom. Do Petriho misky o priemere 9 cm sa pridá 2 ml 0,05 M  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  a 18 ml 2% horúceho agarového roztoku, zmes sa dobre premieša a agarový gél sa nechá stuhnúť pri laboratórnej teplote. Na takto pripravené agarové platne sa umiestnia kovové cylindriky s priemerom 6 mm a výškou 10 mm, do ktorých sa naplní roztok kyseliny kójovej o známej koncentrácii, alebo fermentačná tekutina po kultivácii húb. Pri kvalitatívnom teste produkcie kyseliny kójovej sa na agarovú platňu umiestnia agarové bločky vyrezané z agarovej pôdy

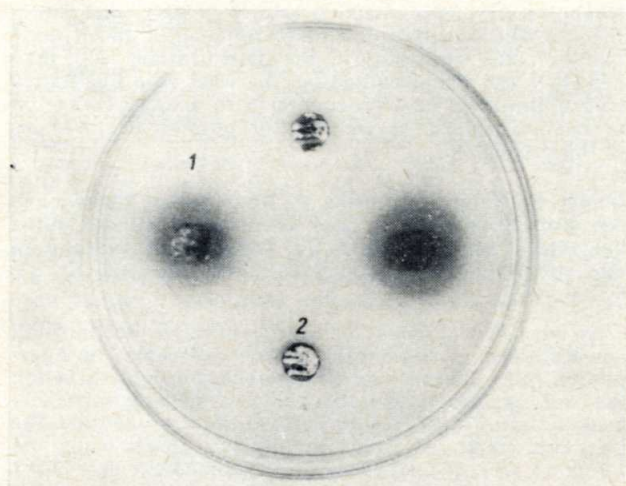
v Petriho miske, na ktorej rástol skúmaný druh huby. Agarové platne sa naplnenými cylindrikmi alebo agarovými bločkami sa vložia do termostatu pri 25 °C. Počas tejto doby kyselina kójová difunduje z cylindrikov a agarových bločkov do agarovej platni, reaguje s  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  a vytvára okolo nich červeno sfarbené zóny. Veľkosť priemeru zón sa odčítava po 17 hodinách difúzie a urobí sa graf závislosti veľkosti zón od mólovej koncentrácie kyseliny kójovej. Pri kvalitatívnom teste produkcie kyseliny kójovej v agarových bločkoch je táto farebná zóna zrejme už po dvoch hodinách difúzie.

**Spektrofotometrická metóda stanovenia.** Zo základného roztoku 0,01 M kyseliny kójovej sa riedením s destilovanou vodou pripravila séria rôznych koncentrácií. Z každej koncentrácie sa zobral 1 ml roztoku pre oba spôsoby stanovenia. Pri použití farebnej reakcie s  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  sa do 1 ml roztoku kyseliny kójovej pridalo 0,1 ml 0,05 M  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  a po 20 minútach sa odčítala absorbančia pri 500 nm [Spekol, Carl Zeiss Jena, NDR]. V druhom prípade k 1 ml roztoku kyseliny kójovej sa pridalo 5 ml 0,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 1 ml Folinovho skúmadla a po 20 minútach sa odčítala absorbančia pri 660 nm. Z nameraných hodnôt sa urobila grafická závislosť absorbiancie na mólovej koncentrácii kyseliny kójovej v štandardných roztokoch.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kvalitatívna detekcia z agarových bločkov je prezentovaná na obrázku 1, kde okolo bločkov s číslom 1 sa vytvorila zóna červenohnedého sfarbenia. Je to dôkaz, že *A. tamarii* produkuje kyselinu kójovú, naopak *Penicillium* sp. V-29 kyselinu kójovú nevytvára. Podobne sfarbené zóny sa vytvorili aj okolo cylindrikov, ktoré boli naplnené rôznymi koncentraciami kyseliny kójovej. Veľkosť zón je lineárne závislá od koncentrácie kyseliny kójovej v intervale koncentrácie 0,0125 až 0,1 mol.l<sup>-1</sup> [obr. 2]. Uvedená závislosť bola dokázaná aj pri štatistickom spracovaní výsledkov pomocou koeficientu korelácie na hladine významnosti  $p = 0,01$  [Reisenauer, 1970]. Takisto sa dosiahli lineárne závislosti absorbiancie od koncentrácie kyseliny kójovej pri oboch spôsoboch spektrofotometrického stanovenia [obr. 3]. Pri daných podmienkach spektrofotometrického stanovenia sú obe metódy rovnako citlivé [11,1 µg kyseliny kójovej]. Rozdiel však sa ukáže pri výpočte mólovej extinkčnej koeficiencie  $\epsilon$ , pričom sa berie do úvahy koncentrácia kyseliny

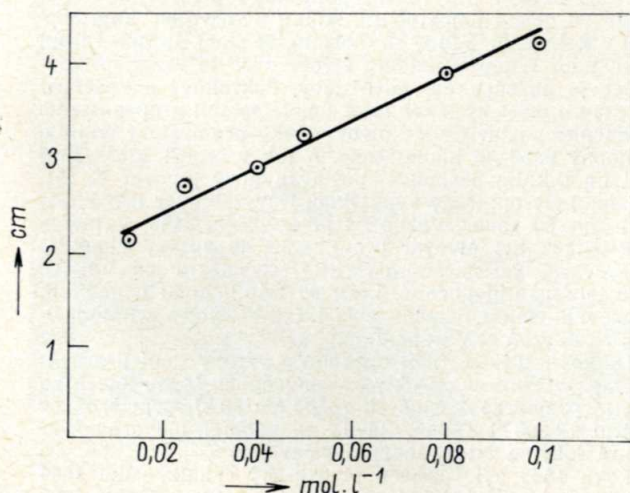




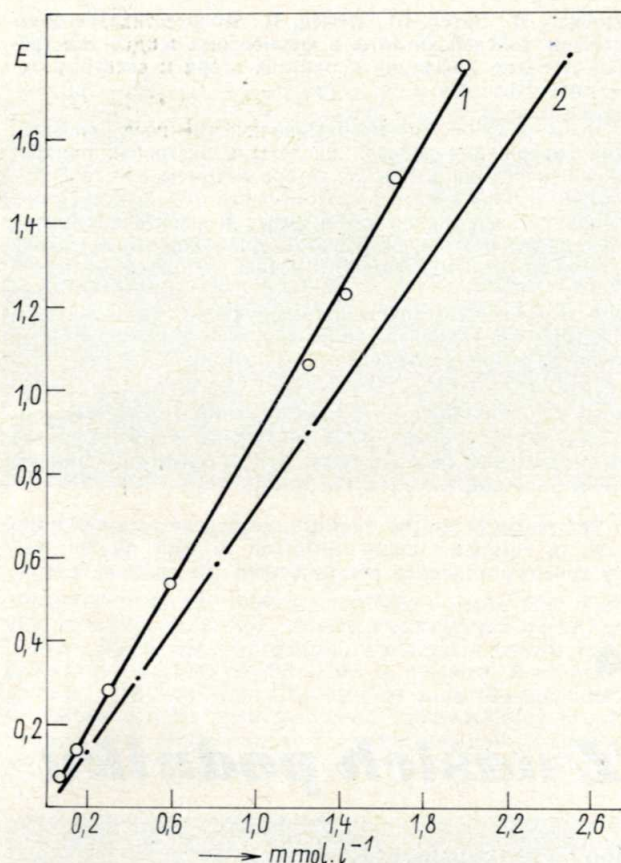
Obr. 1. Detekcia produkcie kyseliny kójovej na agarovej platni

1 — *A. tamarii*, 2 — *Penicillium* sp. V-29

liny kójovej v reakčnej zmesi. Pri použití  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  dostávame hodnotu  $\varepsilon = 9,5 \cdot 10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$  a pri použití Folinovho skúmadla  $\varepsilon = 4,7 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Pri tomto hodnotení je metóda spektrofotometrického stanovenia kyseliny kójovej s použitím Folinovho skúmadla citlivejšia, a dá sa zvýšiť ešte tým, že sa zmenší objem reakčnej zmesi. Pri stanovení obsahu kyseliny kójovej vo fermentačných tekutinách nami popísanými metódami treba však brať do úvahy možnosti prítomnosti iných fenolových zlúčenín, ktoré reagujú s použitými činidlami. V tomto prípade účinok interferujúcich metabolitov je možné vylúčiť tým spôsobom, že kyselina kójová sa kvantitatívne vyzráža s roztokom  $\text{CuSO}_4$  a vo filtráte sa stanoví prítomnosť fenolových zlúčenín. Popísané metódy stanovenia kyseliny kójovej boli vypracované pri štúdiu jej produkcie a príprave jej biologicky aktívnych derivátov (Dobias et al. 1977, Dobias et al., 1980). V posledných rokoch znovu prichádza do úvahy jej použitie ako antioxidantu, látky s ochranným účinkom proti UF žiareniu a stabilizátor potravín. Jej výhoda oproti syntetickým látkam s podobnými vlastnosťami je v tom, že sa ľahko rozkladá pôdnou mikroflórou. Pri laboratórnych pokusoch s *A. tamarii* sme pozorovali, že táto huba po určitom čase sama rozkladá vyprodukovanú kyselinu kójovú. Použitie činidla  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  a Folinovo skúmadlo) pri kvantitatívnom stanovení kyseliny kójovej sa doteraz v literatúre nepopisujú.



Obr. 2. Kvantitatívne stanovenie kyseliny kójovej difúziou v agarových platniach (viď. Materiál a metódy)



Obr. 3. Spektrofotometrické stanovenie kyseliny kójovej  
1 — pri použití  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , 2 — pri použití Folinovho skúmadla (viď. Materiál a metódy)

#### Literatúra

- [1] BIELIK, A.: Kojic acid. *Advances in Carbohydrate Chem.* **11**, 1956, 145—183.
- [2] BIRKINSHAW, J. H., RAISTRICK, H., 1931: VIII. The estimation of kojic acid. *Trans. Roy. Soc. London*, B 220, 139.
- [3] DOBIAS, J., NEMEC, P., BRŤKO, J.: The inhibitory effect of kojic acid and its two derivatives on the development of *Drosophila melanogaster*. *Biológia (Bratislava)*, **32**, 1977, 417—421.
- [4] DOBIAS, J., BALANOVÁ, J., NEMEC, P.: Effect of kojic acid phenylsazone on *Trypanosoma cruzi*. *Biológia (Bratislava)*, **35**, 1980, 203—207.
- [5] KAVANAGH, F. (Ed.): *Analytical Microbiology*, Academic Press, New York, London 1963.
- [6] KORZYBSKI, T., KOWSZYK-GINDIFER, Z., KURYLOWICZ, W.: *Antibiotics*, PWN — Warszawa 1967.
- [7] MILLER, M. W.: *The Pfizer handbook of microbial metabolites*. Mc Graw - Hill Book Company, Inc., New York — Toronto — London 1961, p. 408.
- [8] RAISENAUER, R.: *Metódy matematickej statistiky*. Praha, 1970, SNL.
- [9] STAHL, E. (Ed.): *Thin — layer chromatography*. Springer Verlag Berlin 1969.
- [10] ZELINKA, L.: *Bakteriálne a plesňové fermentácie*. Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied. Bratislava 1960, 306—315.

**Dobias, J. Brtko, J., Nemeč, P.: Kvantitatívne stanovenie obsahu kyseliny kójovej vo fermentačných tekutinách húb metódou difúzie v agarových platniach a spektrofotometricky. Kvas. prům. 31, 1985, č. 11, s. 260—262.**

Vypracovali sa metódy na kvantitatívne stanovenie obsahu kyseliny kójovej v roztokoch pomocou difúzie v agarových platniach a spektrofotometricky. Pri spektrofotometrickom stanovení sa využíva reakcia s  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  a Folinovým skúmadlom. Citlivosť spektrofotometrického stanovenia je  $7,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a pri platňovej metóde  $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Platňovú metódu stanovenia je možné použiť aj na kvalitatívny test produkcie kyseliny kójovej u veľkého súboru mikroorganizmov ako aj pri štúdiu fyziológie producentov.



Добиас, Й., Бртко, Ю., Немец, П.: Количественное определение койевой кислоты в ферментных жидкостях грибов методом диффузии в плитках агара и спектрофотометрии. Квас. прум. 31, 1985, № 11, стр. 260—262.

Были разработаны методы количественного определения содержания койевой кислоты в растворах при помощи диффузии в плитках агара и путем спектрофотометрии. При спектрофотометрическом определении используется реакция с  $\text{Fe}_2/\text{SO}_4/3$  и реактива фоллина. Чувствительность спектрофотометрического определения является  $7,8 \cdot 10^{-5}$  мол.л $^{-1}$  и при методе с плитками  $2 \cdot 10^{-2}$  мол. л $^{-1}$ . Применение плиток возможно и для количественного исследования продукции койевой кислоты для большого количества микроорганизмов также как и при изучении физиологии продуцентов.

**Dobias, J. - Brtko, J. - Nemec, P.: Quantitative Determination of Kojic Acid in Fermentation Broth of Fungi Using Diffusion in Agar Plates and by Spectrophotometry.** Kvas. prům. 31, 1985, No. 11, pp. 260—262.

The methods for the quantitative determination of kojic acid in solutions using diffusion in agar plates and by spectrophotometry are described. The method of spec-

trofotometry uses reaction with  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  and Folin reagent. The sensitivity of this determination is  $7.8 \cdot 10^{-5}$  mol.l $^{-1}$ . The sensitivity of the plate method is  $2 \cdot 10^{-2}$  mol.l $^{-1}$ . The plate method can be used as a qualitative test of the kojic acid production with a large collection of microorganisms as well as for physiological studies of the producers.

**Dobias, J. - Brtko, J. - Nemec, P.: Quantitative Bestimmung des Kojisäuregehalts in den Fermentationsflüssigkeiten von Pilzen mittels Methode der Diffusion in Agarplatten und spektrophotometrisch.** Kvas. prům. 31, 1985, Nr. 11, S. 260—262.

Es wurden Methoden für die quantitative Bestimmung der Kojisäure in Lösungen mittels Diffusion in Agarplatten und mittels Spektrophotometrie ausgearbeitet. Bei der spektrophotometrischen Bestimmung wird die Reaktion mit  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  und Folin-Reagens ausgenutzt. Die Empfindlichkeit der photometrischen Bestimmung ist  $7,8 \cdot 10^{-5}$  mol.l $^{-1}$  und bei der Plattenmethode  $2 \cdot 10^{-2}$  mol.l $^{-1}$ . Die Plattenmethode kann auch für den qualitativen Test der Produktion der Kojisäure bei großen Mikroorganismengruppen sowie auch bei dem Studium der Physiologie der Produzenten angewandt werden.