

Kontrola fermentačnej výroby kyseliny glutámovej

MARTA JENDRICOVSKÁ – BOHUMÍR SABO

Súhrn. Na sledovanie produkcie kyseliny glutámovej pri fermentačnom spôsobe výroby sme použili titračné, chromatografické a enzýmové metódy a metódu kapilárnej izotachofórey. Diskutujeme o vhodnosti použitia jednotlivých analytických metód. Presnosť merania vyjadrujeme koreláciou s metódou automatického analyzátora aminokyselín, ktorú sme zvolili ako porovnávaciu. Pre rýchlu orientačnú analýzu kyseliny glutámovej vo fermentačnom médiu odporúčame tenkovrstvú chromatografiu. Použiteľnosť komplexometrickej titrácie je obmedzená, pretože stanovuje sumárne všetky aminokyseliny v roztoku a v prípade použitia melasy ako C-zdroja vyžaduje časovo náročnú úpravu vzoriek. Korelačný koeficient pri metóde kapilárnej izotachofórey s automatickým analyzátorom aminokyselín je 0,946 a pri enzýmovej metóde 0,928. Ak sa vyžaduje iba sledovanie produkcie kyseliny glutámovej, je enzýmová metóda najvýhodnejšia.

Kyselina glutámová ako prírodná látka s významnými chuťovými vlastnosťami má v potravinárskom priemysle rozšírené použitie najmä pri zvýrazňovaní chuti vo finálnej úprave potravín. Uplatňuje sa predovšetkým v tých technologických procesoch prípravy potravín, v ktorých sa v dôsledku technologického spracovania znížila pôvodná chuťová hladina. Preto sa medzi najväčších spotrebiteľov glutamanu sodného zaraďuje konzervársky a tukový priemysel. Za posledných tridsať rokov jej spotreba prudko vzrástla a v súčasnosti dosahuje svetová produkcia ročný objem 300 000 ton, pričom sa získava výlučne fermentáciou.

Kontrola fermentačnej výroby kyseliny glutámovej vyžaduje metódy, ktoré poskytujú rýchlu a presnú analytickú informáciu, umožňujúcu sledovať a riadiť fermentáciu i separáciu a purifikáciu finálneho produktu.

V minulosti sa na stanovenie kyseliny glutámovej častejšie využívali metódy chemického stanovenia, založená na farebnosti reakcie s *p*-benzochinónom, hydroxylamínom, Folínovým činidlom a podobne. Novšie práce sta-

Ing. Marta Jendrichovská, Ing. Bohumír Sabo, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

novujú kyselinu glutámovú na princípe vytvorenia komplexu s meďnatými iónmi, ktorý sa meria fotometricky [1] alebo titračne [2]. Nevýhodou je rušivý vplyv iných aminokyselín a časovo náročná úprava vzoriek použitím vymieňačov iónov alebo rôznych zrážacích činidiel. Zloch a kol. [3] odskúšali sedem stanovení tohto typu a všetky posúdili ako neperspektívne. Iba po skončení výskumu sa dá predpokladať aplikácia na známy technologický postup, ktorý produkuje štandardné vzorky, ale aj tam je potrebné porovnanie s objektívnejšou separačnou metódou.

Metódy chromatografickej separácie na tenkých vrstvách (TLC) a papieri sa používajú na orientačné stanovenie produkcie kyseliny glutámovej vo fermentačnom roztoku. Separácia na tenkej vrstve je rýchlejšia a ľahko realizovateľná, poznáme veľa vhodných vyvíjajúcich systémov, detekčných činidiel a sorbentov. Osvedčili sa systémy rôznych pomerov *n*-butanolu, kyseliny octovej a vody. Vyhovujúce sú sorbenty celulózy a silikagélu. Ako detekčné činidlo sa používa roztok ninhydrínu v rôznych modifikáciách [4]. Rýchla a osvedčená separácia elektroforézou má veľa modifikácií – na papieri [5], na polyakrylamidových a sodiumdodecylsulfátových géloch [6] a pod. TLC a elektroforéza poskytujú rýchlu kvalitatívnu informáciu nielen o produkcii kyseliny glutámovej, ale aj o tvorbe nežiadúcich produktov, metabolitov v závislosti od času fermentácie. Vhodné je spojiť tieto separačné metódy s kvantitatívnym vyhodnotením vhodným denzitometrom.

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia má výhody vo špecifickosti, spoľahlivosti a citlivosti. Vzorky však vyžadujú predčistenie na vymieňačoch iónov a derivatizáciu, čo je časovo náročné. Jedna z posledných prác [7] opisuje jednoduchú separáciu kyseliny glutámovej a ostatných aminokyselín izokraticky bez derivatizácie za prítomnosti meďnatých iónov a alkylsulfonátu použitých ako aditíva pre selektivitu a naviazanie látok v roztoku – pred kolónovú úpravu nie je potrebná. Stanovenie kvapalinovou chromatografiou, primerane časovo náročné, môže poskytnúť ďalšiu výhodu súčasného sledovania nárastu metabolitov, ak je to v určitom štádiu výskumu alebo výroby potrebné.

Za jedno z najspoľahlivejších stanovení aminokyselín sa považuje separácia na automatickom analyzátore aminokyselín (AAA). Často slúži ako porovnávacia alebo rozhodujúca metóda. Vývoj v tejto oblasti smeruje k zjednodušovaniu metódy, skráteniu času analýz a modifikácií ninhydrínového činidla. Je teda možné vypracovať rýchlejší program stanovenia kyseliny glutámovej a vzhľadom na to, že fermentačné roztoky obsahujú málo bielkovín, zvoliť aj jednoduchšiu úpravu vzorky.

V posledných rokoch je rozpracovaná a na stanovenie aminokyselín sa odporúča kapilárna izotachoforéza. Jej veľká výhoda spočíva v selektivite, rýchlosti a malej náročnosti na úpravu vzoriek. Uvádza sa možnosť simultánneho stanovenia organických iónov, anorganických solí a vysokomolekulových aj

nízkomolekulových substancí [8]. S úspechom sa používa pri kontrole fermentačného spôsobu výroby lyzínu [9]. Odporúčajú sa systémy, ktoré umožňujú separovať kyselinu glutámovú [10]. Kapilárna izotachoforéza predstavuje rýchle a selektívne stanovenie kyseliny glutámovej na dostupnom tuzemskom zariadení, vhodné aj na kontrolu počas separácie a izolácie v ďalšom štádiu technologického procesu.

Ako výhodné a perspektívne metódy kontroly fermentačných procesov pokladáme enzýmové analýzy a využitie enzýmových elektród. V prípade produkcie kyseliny glutámovej sú známe aplikácie enzýmov glutamátdehydrogenázy, glutamátdekarboxylázy, glutamát oxidázy a glutamínosyntetázy [11]. Enzýmové elektródy majú v porovnaní s konvenčnými enzýmovými stanoveniami výhodu v tom, že sa môžu používať opakovane pre viaceré analýzy a môžu pracovať kontinuálne, čím sa znižujú náklady na použitý enzýmový preparát.

Účinok L-glutamátu je vysoko špecifický – 1000-násobne väčší ako D-glutamátu a veľmi rýchly, menej ako 500 ms. Hranica citlivosti je $3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny glutámovej. Použitie enzýmu glutamátdekarboxylázy je menej vhodné, pretože treba použiť náročnejšie elektrochemické metódy alebo senzory na stanovenie voľného oxidu uhličitého, kyslíka a peroxidu vodíka, ktoré sú produktom enzýmovej reakcie. Presnosť merania senzorov sa často porovnáva s konvenčnými metódami automatického analyzátora aminokyselín alebo plynovou chromatografiou [12, 13]. Regresný koeficient bol 1,04 pre senzor amoniaku a 0,99 pre kyselinu glutámovú.

Na základe doterajších údajov literatúry sme odskúšali vybrané analytické metódy na stanovenie kyseliny glutámovej vo fermentačnom médiu, ktoré sa môžu využiť pri kontrole produkcie kyseliny glutámovej vo výskume i v priemyselnej praxi.

Materiál a metódy

Ako producenta kyseliny glutámovej sme použili kmeň *Corynebacterium glutamicum* CCM 2428 z Československej zbierky mikrorganizmov. Zloženie fermentačných pôd, spôsob a parametre fermentačného procesu uvádza práca Šimkovej a Špitáľnikovej [14].

Vzorky fermentačného média sme upravili 50 % roztokom kyseliny sírovej na pH 1,5, zohriali na vodnom kúpeli na 70 až 75 °C a centrifugovali alebo filtrovali cez papierový filter „modrá páska“. Číry supernatant sme vhodne rie-

dili. Na overenie a štandardizáciu metód sme použili kyselinu glutámovú (Glu) fy Fluka, analytickej čistoty.

Chromatografiu na tenkej vrstve (TLC) sme robili na sorbentoch Silufol UV₂₅₄ alebo Lucefol[®] vo vyvíjacej sústave *n*-butanol: kyselina octová: voda (4 : 1 : 1 alebo 12 : 3 : 5) podľa povahy delenej zmesi. Aminokyseliny sa po postriekaní 0,3 % roztokom ninhydrínu v etanole a po zahriatí 15 min pri 100 °C vyfarbili ako červené škvrny na bielom podklade. Organické kyseliny sa postrekom 0,3 % alkoholického roztoku brómfenolovej modrej detegujú ako žlté škvrny na modrom podklade.

Kompexometrickú mikrometódu, založenú na tvorbe komplexu aminokyselín s meďnatými iónmi, opisuje Gawargious [2] vo svojej práci.

Princíp, pracovný postup a výpočet enzýmovej metódy stanovenia L-Glu je uvedený v návode, ktorý je súčasťou komerčného setu fy Boehringer.

Podmienky stanovenia Glu kapilárnou izotachoforézou boli tieto:

Chemikálie: β -alanín Fy LOBA FEINCHEMIE purum
polyvinylpyrolidón KOCH LIGHT LAB pure
TRIS Boehringer, Mannheim

Prístroj: izotachoforetický analyzátor ZKI 001 čs. výroby (ÚRVJT VVZ
PJT Spišská Nová Ves)

Elektrolyty:

L: $1 \cdot 10^{-2}$ mol \cdot l⁻¹ HCl + β -alanín do pH 3,1
0,05 % polyvinylpyrolidón

T: $5 \cdot 10^{-3}$ mol \cdot l⁻¹ kyselina octová + TRIS do pH 4,1

hnací prúd v predseparačnej kapiláre 250 μ A

hnací prúd v analytickej kapiláre 40 μ A

dávkovanie kohútom 30 μ l

Stanovenie aminokyselín automatickým analyzátorom aminokyselín:

Prístroj: automatický analyzátor aminokyselín typ AAA 1 339 (Mikrotechna, n. p., Praha) nastavený na I. program – hydrolyzáty

Princíp: chromatografia na vymieňačoch iónov

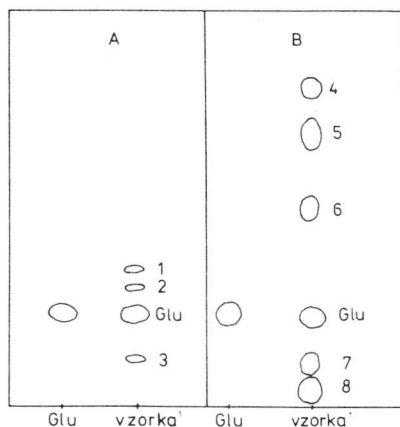
Podmienky: kolóna dĺžky 0,37 m a priemeru 3,7 mm
vymieňač iónov – OSTION LG ANB (Spolek pro chemickou
a hutní výrobu, n. p., Ústí n. Labem)

Ostatné podmienky sú uvedené v návode na obsluhu „Automatický analyzátor aminokyselín AAA 339“, s. 14.

Výsledky a diskusia

Fermentačné pokusy umožnili v praktických podmienkach vypracovať a overiť vhodné metódy stanovenia Glu vo fermentačných roztokoch. Výskyt ďalších aminokyselín a niektorých organických kyselín závisí od producenta a technologických parametrov, ako je zloženie pôdy, pH, teploty a pod. Na rýchle orientačné stanovenie týchto zlúčenín sme použili chromatografiu na tenkej vrstve. Každá vzorka bola detegovaná ninhydrínovým činidlom na prítomnosť aminokyselín aj roztokom brómfenolovej modrej na identifikáciu organických kyselín. Hranica detegovateľnosti aminokyselín bola $0,5 \mu\text{g}$ a organických kyselín $20\text{--}30 \mu\text{g}$. Vo vzorkách s nízkym obsahom Glu je niektorá z organických kyselín prioritná a ostatné tri až štyri sa vyskytujú v menšom množstve. Schéma chromatogramu reprezentačnej vzorky je na obrázku 1. Pomocou štandardov sme identifikovali kyselinou jantárovú (R_F 0,92), α -ketoglutárovú (R_F 0,85), mliečnu (R_F 0,68), pyrolidónkarboxylovú (R_F 0,50), glutamín (R_F 0,18) a Glu (R_F 0,25).

Komplexometrické stanovenie priamou titráciou $0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ síranom meďnatým za vizuálnej indikácie murexidom sme robili v borátovom pufri pH 9,0. Vzorky z fermentácie po filtrácii vhodne riedené a zneutralizované hydroxidom sodným boli dostatočne transparentné, vhodné na titráciu, ak sa



Obr. 1. Chromatogram kyseliny glutámovej vo fermentačnom roztoku. A – detekcia ninhydrínom, B – detekcia brómfenolovou modrou. 1–3 – aminokyseliny. 4–8 – organické kyseliny. Glu – kyselina glutámová.

Fig. 1. Example of Glu separation on TLC in fermentation solution. A – detection by ninhydrine. B – detection by Bromphenol Blue. – 1–3 – amino-acids, 4–8 – organic acids: Glu – glutamic acid. (¹Sample.)

Tabuľka 1. Aminokyseliny vo fermentačných roztokoch kyseliny glutámovej
Table 1. Amino-acids in fermentation solution of glutamic acid

Aminokyseliny ¹ [g · l ⁻¹]	24 [h]	68 [h]	72 [h]
N ₁	–	0,43	0,56
Gly	0,11	0,13	0,17
Ala	–	0,41	0,45
Ile	–	0,16	0,13
Leu	–	0,28	0,26
Lys	–	0,25	0,27
N ₂	–	0,58	0,55
Glu	5,3	11,02	11,70

24, 68, 72 – doba fermentácie (hod.)²L

N₁, N₂ – aminokyseliny neidentifikované

Tab. No. 1. Aminoacids in fermentation solution of glutamic acid

1 – aminoacids (g/l)

2 – fermentation time (h)

N₁, N₂ – not identified aminoacids

Tabuľka 2. Porovnanie metód stanovenia kyseliny glutámovej analyzátorom aminokyselín
(AAA) a komplexometricky v 24. a 72. hodine fermentácie

Table 2. Comparison of glutamic acid determination methods by amino-acids analyser (AAA)
and by complexometry at the 24th and 72nd h of fermentation

n	Glu [g · l ⁻¹] v 24 . h		Glu [g · l ⁻¹] v 72 . h	
	AAA	komplexo- metricky ¹	AAA	komplexo- metricky ¹
1	5,64	5,67	8,58	11,66
2	5,28	5,75	8,21	12,00
3	6,00	5,80	9,02	11,81
4	5,55	5,90	8,61	11,69
5	5,58	5,72	8,43	11,75
$\bar{x}_{A,B}$	5,57	5,77	8,57	11,78
$s_{A,B}$	0,31	0,30	0,13	
$s_{r(A,B)} [\%]$	5,6	1,6	3,5	1,1
$t_{\text{vypoč.}}$	1,25		19,64	
$t_{0,05}$	2,306		2,306	

$\bar{x}_{A,B}$ – aritmetický priemer; Arithmetic mean.

$s_{A,B}$ – smerodajná odchýlka; Standard deviation.

$s_{r(A,B)}$ – relatívna smerodajná odchýlka; Relative standard deviation.

n – počet stanovení obidvoma metódami na jednej vzorke; Number of determination by both methods with one sample.

t – hodnota Studentovho kritéria (významnosť rozdielu na hladine $\alpha = 0.05$). Value of Student's criterion (importance of difference in level $\alpha = 0.05$).

Glu – kyselina glutamová; Glutamic acid.

¹Complexometrically.

ako substrát použila glukóza. Nevýhodou tejto metódy je sumárne stanovenie všetkých aminokyselín prítomných v roztoku. Z chromatogramu vidieť, že ďalšie aminokyseliny sa tvoria postupne s časom fermentácie, čo bolo aj kvantitatívne overené stanovením niektorých vzoriek na automatickom analyzáto-re aminokyselín (tab. 1). Suma aminokyselín predstavuje v posledných odbe-roch kladnú chybu 25–30 %. Štatistické vyhodnotenie významnosti rozdielu obidvoch metód uvádza tabuľka 2, kde vidieť, že v poslednom odbere (72. h) fermentácie je rozdiel štatisticky významný. Ide o sústavnú proporcionálnu chybu.

Vzorky, kde sme ako substrát používali melasu, boli tmavé netransparentné roztoky, ktoré bolo treba upravovať cez vymieňače iónov. Najvýhodnejší bol Dowex 1 v acetátovom cykle a elúcia 0,3 mol . l⁻¹ octanom sodným. V koncentrácii 15–30 mg Glu na 3 g vlhkého ionexu bola výťažnosť 92–100 %. Nevyhnutnosť použitia časovo náročnej úpravy vzorky a sústavná proporciál-na chyba znevýhodňuje túto metódu. Možno ju však úspešne uplatniť napr. pri purifikácii substance, kde analyzované vzorky bývajú transparentné a majú jednoduchšie zloženie ako fermentačné média.

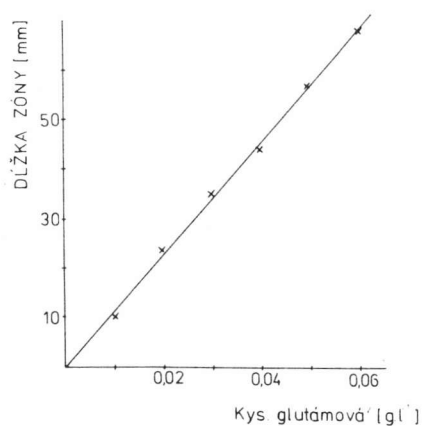
Enzýmové stanovenie L-Glu komerčným testom predstavuje modernú se-lektívnu metódu, časovo a prístrojovo nenáročnú. Výsledkom enzýmovej re-akcie glutamátdehydrogenázy, diaforázy a tetrazoliovej soli je červený forma-zánový produkt, ktorého absorbanciu sme merali pri 492 nm na Spekle 11. Enzýmovým testom sme stanovili 15 vzoriek. Niektoré sme stanovili súčasne aj automatickým analyzátorom aminokyselín. Korelačný koeficient mal hod-notu 0,982 (tab. 3).

Tabuľka 3. Porovnanie výsledkov stanovenia kyseliny glutámovej enzýmovou metódou a izo-tachoforézou s analyzátorom aminokyselín (AAA)

Table 3. Comparison of results of glutamic acid determination by enzymatic method and iso-tachopheresis with amino-acids analyser (AAA)

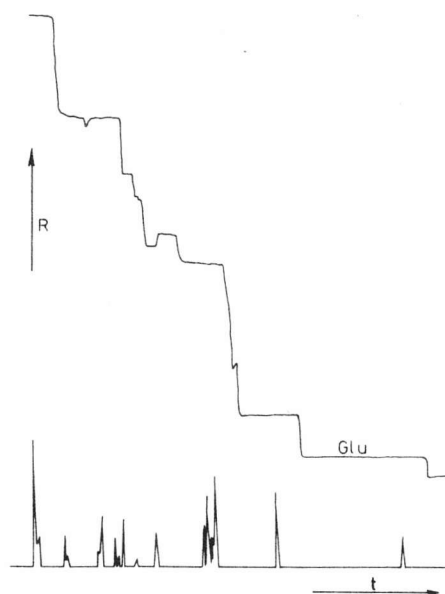
Vzorka ¹	Kyselina glutámová ² [g . l ⁻¹]		
	enzymaticky ³	AAA	izotachoforézou ⁴
1	5,27	5,37	6,21
2	6,40	5,90	6,72
3	8,64	8,92	8,70
4	6,27	7,08	7,18
5	5,84	6,26	6,52
6	6,15	6,64	7,54
Korelačný koeficient ⁵	0,928	–	0,946

¹Sample; ²Glutamic acid; ³By enzymatic method; ⁴By isotachopheresis; ⁵Correlation coefficient.



Obr. 2. Kalibračná čiara kyseliny glutámovej z izotachofórézy.

Fig. 2. Calibration curve of glutamic acid of isotachopheresis. (1st Zone length; 2nd Glutamic acid.)



Obr. 3. Izotachoforetický záznam kyseliny glutámovej vo fermentačnom roztoku. Glu – kyselina glutámová.

Fig. 3. Isotachopheresis record of glutamic acid in fermentation solution. Glu – glutamic acid.

Pri optimalizácii technologického procesu je však dôležité sledovať aj produkciu metabolitov, a preto je výhodné použiť analytické separačné metódy, ako je kvapalinová chromatografia alebo kapilárna izotachoforéza. Pri stanovení izotachoforézou sme použili elektródový systém všeobecne vhodný pre organické kyseliny, v ktorom možno podľa povahy vzorky stanoviť popri Glu aj ďalšie organické kyseliny. Kalibračná čiara je na obrázku 2. Rovnica lineárnej regresnej závislosti je vyjadrená vzťahom $y = -0,6 + 1138x$ a relatívna chyba stanovenia je 2,15 %. Príklad izotachoforeogramu reálnej vzorky je na obrázku 3. Úprava vzoriek vyžaduje iba riedenie čírych supernatantov po filtrácii. Čas analýzy je 35 min. Izotachoforéza spája požiadavky selektivity aj rýchlosti. Korelačný koeficient s automatickým analyzátorom aminokyselín je 0,946 (tab. 3).

Ako z uvedených výsledkov vyplýva, na kontrolu fermentačnej výroby kyseliny glutámovej možno využiť niekoľko analytických metód. Výber a aplikácia konkrétnej metódy bude závisieť od zloženia fermentačného média, technológie výroby i požiadaviek na rozsah informácie. Na kvalitatívnu analýzu odporúčame chromatografiu na tenkej vrstve a na kvantitatívne stanovenie kapilárnu izotachoforézu. Analyzátor aminokyselín slúži ako porovnávacia metóda. Enzymové stanovenie je najvýhodnejšie ak sa sleduje iba produkcia kyseliny glutámovej.

Cieľom práce bolo ukázať, aké metódy stanovenia kyseliny glutámovej sa v súčasnosti používajú na kontrolu fermentačných procesov. Doterajšie poznatky sú základom pre ďalšie experimentálne práce, ktorých úlohou bude optimalizácia fermentačnej výroby kyseliny glutámovej.

Literatúra

1. ROSHAL, E. – DELINA, N., *Chim. – Farm.*, 14, 1980, s. 110.
2. GAWARGIOUS, Y. A., *Microchim. Acta*, 31, 1974, s. 1003.
3. ZLOCH, Z., Stanovení obsahu kyseliny glutámové v potravinách. (Výskumná správa), Plzeň, Hygienický ústav lékařské fakulty KU 1985.
4. KRIVIS, A. F., *Microchem. J.*, 23, 1971, s. 391.
5. HÄYMAN, A. R. – GRAY, D. O., *J. Chromatogr.*, 370, 1986, s. 194.
6. SKREEKRISHNA, K. – JONES, Ch., *Anal. Biochem.*, 103, 1980, s. 55.
7. LEVIN, S. – GROSSKE, E., *J. Chromatogr.*, 384, 1987, s. 249.
8. REIJENGA, J. C. – VERHEGGEN, T. P., *J. Chromatogr.*, 267, 1983, s. 75.
9. PODNIKOVÁ NORMA: PNY 21-66-86, L-Lyzín technický, Biotika, n. p., Slovenská Ľupča.
10. EVERAERTS, E., *Isotachopheresis*. New York, Scientific Publ. 1977, s. 311.
11. KARUBE, I. – SUZUKI, S., *Prog. Ind. Microbiol.*, 24, 1986, s. 81.

12. YAMAUCHI, H. – KUSAKABE, H., 3rd Eur. Congr. Biotechnol., 1984, 1, s. 705.
13. HIKUMA, M. – YASUDA, T., N. Y. Acad. Sci., 396, 1981, s. 307.
14. ŠIMKOVÁ, M. – ŠPITÁLNÍKOVÁ, L., Bull. PV, 27(7), 1988 (v tlači).

Do redakcie došlo 20. 10. 1988

Контроль ферментативного производства глутаминовой кислоты

Резюме

В работе авторы применили для исследования продукции глутаминовой кислоты при ферментативном способе производства титровальный, хроматографический, энзиматический метод и метод капиллярного изотахофореза. Авторы дискутируют о пригодности использования отдельных аналитических методов. Точность измерения выражена корреляцией с эталонным методом – методом автоматического анализатора аминокислот. Для срочного ориентировочного анализа глутаминовой кислоты в ферментативной среде авторы рекомендуют тонкослойную хроматографию. Применение комплексометрического титрования ограниченное, определяет только сумму всех аминокислот в растворе и в случае применения мелассы в качестве источника углерода требует многовременную обработку проб. Корреляционный коэффициент метода капиллярного изотахофореза с автоматическим анализатором аминокислот 0,946 и у энзиматического метода 0,928. Если требуется только наблюдение за продукцией глутаминовой кислоты самым подходящим является энзиматический метод.

Control of fermentation production of glutamic acid

Summary

To control the production of glutamic acid by fermentation following methods were used: titration, chromatography, enzymatic methods and capillary isotachopheresis. Suitability of particular analytical methods is discussed. Exactness of measurement is expressed by correlation with the method of automatic amino-acids analyser, which was chosen as a reference. For glutamic acid analysis in fermentation medium a thin layer chromatography is recommended. Complexometric titration use is limited as for it determines all amino-acids in a solution, and in the case if molasses as a C-source, the method requires time-consuming sample preparation. Coefficient of correlation for capillary isotachopheresis method with automatic amino-acids analyser was 0.946 and enzymatic method 0.928. If only determination of glutamic acid production is required, the most suitable is the enzymatic method.