

Glicerinkoncentráció meghatározása bakteriális táplevesből refraktometriás módszerrel

Glycerol Concentration Determination from Bacterial Media Based on Refractometric Method

Determinarea concentrației glicerolului din mediu bacterian prin metode refractometrice

ORBÁN K. Csongor^{1,3}, ANDRÁS Csaba², ÁBRAHÁM Beáta³, LÁNYI Szabolcs³

¹Bukaresti Műszaki Egyetem, Alkalmazott kémia és Anyagtudományok Kar, RO-060042, Bukarest, Splaiul Independenței 313, tel. 4021-402 96 24, fax 4021-402 39 34, orbancsongor@sapientia.sicilorum.ro

²Sapientia EMTE, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Élelmiszertudományi Tanszék, Csíkszereda, RO-530104, Szabadság tér 1, tel. 40-266-31 71 21, fax 40-266-37 20 99

³Sapientia EMTE, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Biomérnöki Tanszék, Csíkszereda, RO-530104, Szabadság tér 1, tel. 40-266-31 71 21, fax 40-266-37 20 99

ABSTRACT

In industrial fermentation processes the most used main nutrient component is glycerol. For the control of these processes the monitoring of the carbon source is essential. In most cases this is done by an expensive and time-consuming gas chromatographic method. In this study we present a refractometric method for the detection of glycerol concentrations from bacterial media, considering the interference of protein concentrations in the measurements.

ÖSSZEFOGLALÓ

Az ipari fermentációs folyamatoknál a leggyakrabban használt szénforrás a glicerin. Ezen folyamatok irányításához szükséges a glicerinkoncentráció monitorizálása. A legtöbb esetben ezt egy költséges és időigényes gázkromatográfiás módszerrel végzik. Ebben a tanulmányban egy refraktometriás mérésen alapuló módszert dolgoztunk ki a glicerinkoncentráció meghatározására bakteriális táplevesből, figyelembe véve a fehérjekoncentráció interferenciáját a refraktometriás mérésekben.

Kulcsszavak: refraktométer, glicerin, tápleves

1. BEVEZETŐ

A glicerin strukturális összetevője a lipideknek, ezért a természetben bőségesen megtalálható. Többnyire mikrobiális fermentációval vagy kémiai szintézissel állítják elő petrokémiai alapanyagokból. Visszanyerhető a szappangyártásnál a zsírok hidrolízise során keletkező melléktermékből [1]. Néhány Európai országban a glicerin termelés jelentősen megnőtt a biodízel gyártásának köszönhetően, ugyanis a biodízelt növényi olajokból állítják elő transzészterezéssel, amelynek következtében a melléktermék 10% (v/v)-a glicerin [2].

A glicerint széleskörűen alkalmazzák a kozmetikában, festékiparban, élelmiszeriparban, dohányiparban, papírgyártásnál, textil és bőriparban is. Mindezzel együtt nyersanyagként is szolgál különböző kémiai anyagok gyártásánál [1]. A természetben való gyakorisága miatt sok ismert mikroorganizmus tudja egyedüli szén és energiaforrásként hasznosítani a glicerint. Ezeket a mikroorganizmusokat potenciális kandidátusoknak tekintik a biodízelgyártásból származó glicerin biokonverziójára. A glicerin helyettesítheti a hagyományos, szukróz, glükóz és keményítő szénhidrogéneket néhány fermentációs folyamatban [3]. Ezen kívül az egyik legígéretesebb alkalmazása a mikrobiológiai úton történő biokonverziója magas értékű összetevőkké, mint például redukált kémiai anyagok: szukcinát, etanol, xilit, propionát, hidrogén, stb. [4]. Többek közt citromsav és tejsavtermelésre is alkalmas a glicerin, amelyet rendre *Yarrowia lipolytica* és *Escherichia coli* AC-521 törzsek segítségével valósítottak meg fermentációk során [5].

A fermentációs módszerek és eljárások tökéletesítése és optimalizálása érdekében fontos a mikroorganizmusok által elfogyasztott szubsztrát koncentrációjának követése. A legelterjedtebben használt módszerek a glicerín koncentrációjának meghatározására a gáz és folyadékkromatográfiai módszerek [6-10]. Ezek a módszerek, annak ellenére, hogy pontos eredményekkel szolgálnak, anyagilag nehezen elérhetőek, és kivitelezésük is időigényes. Ezzel szemben a piacon található enzimatikus reakciókra alapuló kolorimetriás és fluorometriás módszerek is elterjedtek [11-13], ezek könnyebben elérhetőek, viszont kivitelezésük szintén több időt és pontosságot vesz igénybe.

A refraktometria az anyagok törésmutatójának mérésén alapuló minőségi és mennyiségi analitikai vizsgálati módszer. Ebben a tanulmányban egy refraktometriás módszerrel alapuló glicerínkoncentráció meghatározást mutatunk be bakteriális táplevesből. Az előbbieken felsorolt módszerek nagymértékben lecsökkentik a mintában található más komponensek interferálását. A mi esetünkben, mivel bakteriális táplevesből határozzuk meg a glicerín mennyiségét, a fehérjék, mint mellék- és főtermékek interferálhatnak a refraktometriás mérésekben. Ennek a problémának a megoldására egy függvényt határoztunk meg grafikus módszerrel, amely leírja a glicerín törésmutatóját a glicerín és fehérjekoncentráció függvényében.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A fehérje koncentrációk beállítására Bovine serum albumin-t (BSA) és a glicerínkoncentrációk beállítására pedig 100%-os tisztaságú glicerint használtunk. A fehérjekoncentrációk 0-tól 0.2 mg/ml-ig terjedtek minden glicerínkoncentrációban, amely 1-től 8% (v/v)-ig változott. Az előkészített minták törésmutatójának mérésére egy RFM330 refraktométert (Bellingham & Stanley Ltd.) használtunk. Az adatokat Matlab® R2010b verzió 7.11 szoftverrel dolgoztuk fel. A függvény grafikus meghatározására és a grafikus felület adatokra való illesztésére a Surface Fitting Toolbox (Matlab programcsomagból) segítségével végeztük.

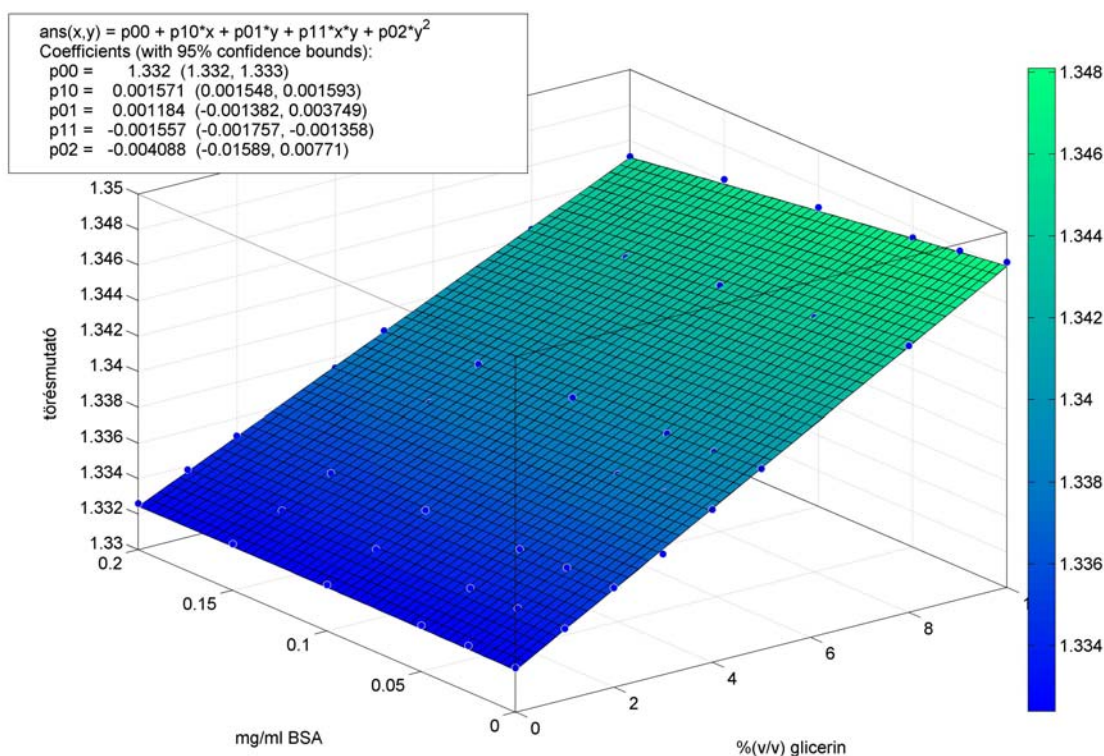
3. EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁS

A leghatékonyabb módszer a glicerín koncentrációjának offline meghatározására az illető minta törésmutatójának a megmérése. Mivel mikrobiológiai táplevesekben egy fermentáció során a fehérje mennyisége megnő, és ez a módszer a fehérje mennyiségi meghatározására is szolgál [14, 15], a két komponens törésmutatója interferálhat. Ennek a kijavítására egy standard glicerín-görbét állítottunk fel fehérjekoncentrációk függvényében. A különböző glicerín és fehérjekoncentrációjú standard minták törésmutatójának méréseit az 1. Táblázat tartalmazza.

1. Táblázat. Glicerín-fehérje standard törésmutatói

mg/ml BSA	0.000	0.025	0.050	0.100	0.150	0.200
% v/v glicerín						
0	1.3325	1.3326	1.3326	1.3326	1.3326	1.3326
1	1.3340	1.3340	1.3340	1.3339	1.3338	1.3338
2	1.3356	1.3356	1.3355	1.3354	1.3352	1.3350
3	1.3368	1.3367	1.3366	1.3364	1.3362	1.3360
4	1.3386	1.3384	1.3383	1.3379	1.3377	1.3374
5	1.3402	1.3400	1.3399	1.3396	1.3392	1.3388
8	1.3450	1.3445	1.3443	1.3438	1.3431	1.3424
10	1.3483	1.3478	1.3474	1.3468	1.3461	1.3451

A Matlab Surface Fitting Toolbox segítségével, egy felületet illesztettünk az adatokra és grafikusán meghatároztuk azt a másodfokú függvényt, amely leírja az összefüggést a törésmutató, és a glicerín-fehérje koncentrációváltozásai között. A 1. ábrán látható a felület illesztése.



1. ábra
Felület illesztés a glicerín-fehérje standard törésmutatóira

A felületet leíró függvény:

$$Ri = 1.332 + 0.00157 * V_{gli} + 0.00118 * V_{pro} - 0.00155 * V_{gli} * V_{pro} - 0.00408 * V_{pro}^2 \quad (1)$$

Az 1. összefüggésből a V_{gli} kifejezhető az alábbi módon:

$$V_{gli} = \frac{Ri - 1.332 + 0.00118 * V_{pro} - 0.00408 * V_{pro}^2}{0.00157 - 0.00155 * V_{pro}} \quad , \text{ ahol} \quad (2)$$

Ri – a minta törésmutatója,

V_{gli} – glicerinkoncentráció (% v/v),

V_{pro} – fehérjekoncentráció (mg/ml).

Egy fermentáció során nem csak a kiinduló anyag, a szubsztrát fogyásának változását kell követnünk, hanem ezzel párhuzamosan a termék képződését, amely általában fehérje. Ellenkező esetekben a fehérje, mint melléktermék van jelen a fermentációs táptalajban. Az összfehérje meghatározása egyszerű kolorimetriás vagy spektrofotometriás mérésekkel elvégezhető. Az összfehérje mennyiséget és a minta törésmutatóját behelyettesítve a 2. egyenletbe, megkapjuk a glicerín koncentrációját mg/ml-ben kifejezve.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk során egy refraktometriás módszert dolgoztunk ki glicerínkoncentráció meghatározására bakteriális táptalajból, figyelembe véve a fehérjekoncentráció változását. Ezáltal kiküszöböltük a mérésekből a fehérje interferálását.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket fejezzük ki a „Sectoral Operational Programme Human Resources Development 2007-2013 of the Romanian Ministry of Labour, Family and Social Protection through the Financial Agreement POSDRU/88/1.5/S/60203.” programnak az anyagiak biztosításáért, valamint a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Biokémia Tanszékének az anyagok biztosításáért és a kísérletek elvégzésének lehetőségéért.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1.] Wang Z. X. Zhuge J., Fang H., Prior B. A., Glycerol production by microbial fermentation: a review, *Biotechnol Adv*, **2001**, 19 (3), 201-23.
- [2.] Gervásio Paulo da Silva Matthias Mack, Jonas Contiero, Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology, *Biotechnol Adv*, **2009**, 27 (1), 30-9.
- [3.] Barbirato F. Chedaille D., Bories A., Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates, *Appl Microbiol Biotechnol*, **1997**, 47, 441-446.
- [4.] Dharmadi Y. Murarka A., Gonzalez R., Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering, *Biotechnol Bioeng*, **2006**, 94, 821-829.
- [5.] Xiaohu Fan Rachel Burton, Yongchang Zhou, Blycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals - Mini Review, *The Open Fuels & Energy Science Journal*, **2010**, 3, 17-22.
- [6.] Paul J. Flakoll Mu Zheng, Susan Vaughan, Myfanwy J. Borel, Determination of stable isotopic enrichment and concentration of glycerol in plasma via gas chromatography–mass spectrometry for the estimation of lipolysis in vivo, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **2000**, 744 (1), 47-54.
- [7.] Wang Lili Qian Jie, Hu Zhongce, Zheng Yuguo, Hu Wei, Determination of dihydroxyacetone and glycerol in fermentation broth by pyrolytic methylation/gas chromatography, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 557 (1-2), 262-266.
- [8.] Christina Plank Eberhard Lorbeer, Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, **1995**, 697 (1-2), 461-468.
- [9.] Akiko Kiyoshima Keiko Kudo, Naoki Nishida, Noriaki Ikeda, HPLC simultaneous determination of glycerol and mannitol in human tissues for forensic analysis, *Forensic Science International*, **2002**, 125 (2-3), 127-133.
- [10.] Ryan A. Frieler Dane J. Mitteness, Mikhail Y. Golovko, Heidi M. Gienger, Thad A. Rosenberger, Quantitative determination of free glycerol and myo-inositol from plasma and tissue by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **2009**, 877 (29), 3667-3672.
- [11.] António O.S.S. Rangel Ildikó V. Tóth, Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection, *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 416 (2), 205-210.
- [12.] Elizabeth Nunes Fernandes Mariele Nair de Campos Moura, José Luis F Costa Lima, Boaventura F Reis, Automatic flow procedure for the determination of glycerol in wine using enzymatic reaction and spectrophotometry, *Microchemical Journal*, **2004**, 77 (2), 107-112.
- [13.] Leslie H. Boobis Ronald J. Maughan, A simple one-step enzymatic fluorometric method for the determination of glycerol in 20 µl of plasma, *Clinica Chimica Acta*, **1983**, 132 (2), 173-179.
- [14.] R. Barers S. Tkaczyk, Refractive Index of Concentrated Protein Solutions, *Nature*, **1954**, 173, 821-822.
- [15.] Jorge Babul Earle Stellwagen, Measurement of protein concentration with interferences optics, *Analytical Biochemistry*, **1969**, 28, 216-221.