

Průkaz volných aminokyselin v technické a rafinované kyselině mléčné

JOSEF DYR, VLADIMÍR KRUMPHANZL, Katedra kvasné chemie a technologie VŠChT v Praze

547.472.3 : 547.466

Kyselina mléčná, vyrobená kvasným způsobem, obsahuje velké množství doprovodných látek, které snížují její jakost.

V předložené práci jsme se zaměřili na kvalitativní průkaz volných aminokyselin, jako případného precursoru sekundárně vznikajících barviv a jedné z příčin pachutí a nepříjemné vůně kyseliny mléčné.

Zdrojem aminokyselin přecházejících do výrobku je jednak *mélasa*, z níž se připravuje zápara a jednak doplňková živina — sladový květ. *Ciferri, Gechele, Mariani a Torraca* (2) dokázali chromatograficky, že v melase jsou přítomny tyto aminokyseliny:

Název	mg/1 g	Název	mg/1 g
alanin	5,64	lysín	0,52
kyselina glutamová	4,99	serín	0,46
tyrosin	4,73	arginin	0,26
isoleucin	3,19	methionin	0,21
leucin	2,79	threonin	0,17
kyselina asparagová	1,91	kyselina γ -aminomáselná	0,16
valin	1,79	fenykalanin	0,11
glycin	1,14		

Z tabulky je patrné, že v melase je nejvíce alaninu, kyseliny glutamové, tyrosinu, isoleucinu a leucinu. Z pozdější práce *Mariani, Ciferri a Torraca* (3, 4) však vyplynulo, že původní zjištěné množství kyseliny γ -aminomáselné neodpovídá skutečnosti a melasa jí obsahuje 2,8 mg/1 g.

Stanovením aminokyselin v našich melasách se zabýval *Vavruch* (5). Dokázal, že v řepné melase jsou tyto aminokyseliny a jejich amidy, v pořadí klesající koncentrace: kyselina glutamová, kyselina γ -aminomáselná, glycin, glutamin, valin, serin, kyselina asparagová, alanin, leucin, isoleucin, asparagin (dokázán jen v některých vzorcích), tyrosin (jen v malém množství), arginin, fenykalanin a lysin.

Sladový květ, používaný jako doplňková živina, je dalším zdrojem aminokyselin. Obsahuje v sušině přibližně 24,4 % dusíkatých látek, 10 % vody, 2 % tuku, 42,2 % bezdusíkatých látek, 14,2 % celulosy a 7,2 % popela. Z rozboru je vidět, že sladového květu se má přidávat co nejméně, aby se za-

bránilo vnášení balastních látek, které by později znesnadňovaly rafinaci surové kyseliny mléčné. Pokud jde o kvalitativní a kvantitativní obsah aminokyselin volných i vázaných ve sladovém květu, jsou poznatky velmi kusé. Je pravděpodobné, že kvalitativně bude jejich obsah v podstatě stejný jako ve sladu. Pro orientaci uvádíme výsledky, které vykazují *Ljungdahl a Sandegren* (6) a dále *Harris* (7), podle nichž byly v pivní mladině zjištěny tyto volné aminokyseliny: kyselina γ -aminomáselná, arginin, asparagin, kyselina asparagová, cystin, kyselina glutamová, prolin, serin, threonin, tryptophan a valin. Protože se však sladový květ přidává pouze v malém množství, je hlavním zdrojem aminokyselin v kyselině mléčné melasa.

U nás se kyselina mléčná isoluje a rafinuje buď kryštalizací mléčnanu vápenatého, nebo extrakcí kyseliny mléčné z jejích vodních roztoků organickými rozpouštědly. Zaměřili jsme se proto na tyto dva rafinační postupy a porovnali jejich účinnost z hlediska odstraňování aminokyselin, přítomných ve výchozí technické kyselině mléčné.

Vzorky kyseliny mléčné bylo nutno před vlastním stanovením aminokyselin vhodně upravit. K tomuto účelu jsme použili modifikované metody kapilární analýsy. Metodu poprvé použil *Goppels-Röder* (8), avšak pro praktické využití při luminiscenčních analýsách ji propracovali *Neugebauer* (9), *Danckworrta a Pfau* (8).

Dosažení souměřitelných výsledků závisí na těchto podmírkách:

1. Na používání správných druhů filtračního papíru. Vhodné papíry pro luminiscenční analýsu jsou např. Schleicher a Schüll čís. 604, 598, 602;
2. na velikosti proužku filtračního papíru
3. na tvaru proužku papíru
4. na množství analysované kapaliny
5. na teplotě
6. na relativní vlhkosti vzduchu

Danckworrta a Eisenbrand (10) doporučují tento postup:

Proužky filtračního papíru 25 × 2 cm se ponoří do 5 ml zkoumané tekutiny, která je v nádobce 5 cm vysoké a 2,5 cm široké. Proužky se zavěsí tak, aby se dotýkaly svým spodním okrajem dna nádoby. Po 24 h se proužky vyjmou a vysuší na vzduchu. Teplota má být udržována v rozmezí 18–20 °C při relativní vlhkosti

vzduchu 70—75 %. Aby se dosáhlo uvedených podmínek, doporučuje se analýsu provádět v uzavřených skříňách.

Rapp [11] a Rojahn [12] používají na kapilární analýsu papírových proužků delších než 50 cm. Aby se papír nevysušoval, provádějí analýsu v uzavřených skleněných válcích s atmosférou nasycenou vodními parami. Při tomto způsobu se získá dokonalejší rozdělení zon jednotlivých látek v analysované kapalině.

Párkányi [13, 14] používal k rozboru potravinářských barviv čtvercové kapilární analýsy. Papír Whatman čís. 4, ze kterého vystříhl čtverec o straně 7—12 cm, ponořil jedním rohem asi 2 mm hluboko do analysovaného roztoku. Při vzlínání vzorku dochází k částečnému rozdělení směsi přítomných barviv.

V dosud uvedených případech bylo kapilární analýzy použito k isolaci a přímé identifikaci povětšině barviv. Pro tento účel metoda plně vyhovuje. Papírová chromatografie, používaná k stejnemu účelu, je vzhledem k době potřebné na vyvýjení chromatogramu zdlouhavá.

My jsme této metody použili pouze k úpravě vzorků, tzn. k isolaci přítomných aminokyselin a ne k jejich identifikaci. Účelem úpravy bylo jednak nahromadit aminokyseliny v potřebném množství pro chromatografické stanovení, jednak částečně z nich odstranit doprovodné balastní látky a přebytek kyseliny mléčné. K nahromadování aminokyselin se obyčejně v laboratorní praxi používá ionexů. Práce je však zdlouhavá a obtížná, zejména při sériových analysách.

Experimentální část a výsledky

Ve vzorcích kyseliny mléčné byla stanovena celková acidita, celkový dusík, popel a volné aminokyseliny. Acidita byla stanovena alkaliacidimet-

ricky, dusík metodou Kjeldahlovou, popel vážkově po vyžíhání při 550 °C, volné aminokyseliny metodou chromatografickou.

K dělení aminokyselin bylo použito jednorozměrné sestupné chromatografie na papíře. Jako rozpouštědlo bylo použito směsi *n*-butanolu — kyseliny octové — vody v poměru 4 : 1 : 5. Ke stanovení se nejlépe osvědčil papír Whatman čís. 1. Detekce byla prováděna postřikem 0,1 % roztokem ninhydrinu v acetonu, vyvolávací doba 10 min. při 100 °C. Protože jsme pracovali jednorozměrnou chromatografií, použili jsme metody opakování vyvýjení (čtyřnásobné). Jednotlivé aminokyseliny analysovaných vzorků kyseliny mléčné byly identifikovány buď srovnáním s paralelně nanesenými standardy nebo tím, že byl sledován vzrůst intenzity skvrn aminokyselin, obsažených v kyselině mléčné, po přidání určitého množství aminokyseliny.

Úprava vzorku kyseliny mléčné metodou kapilární analýzy

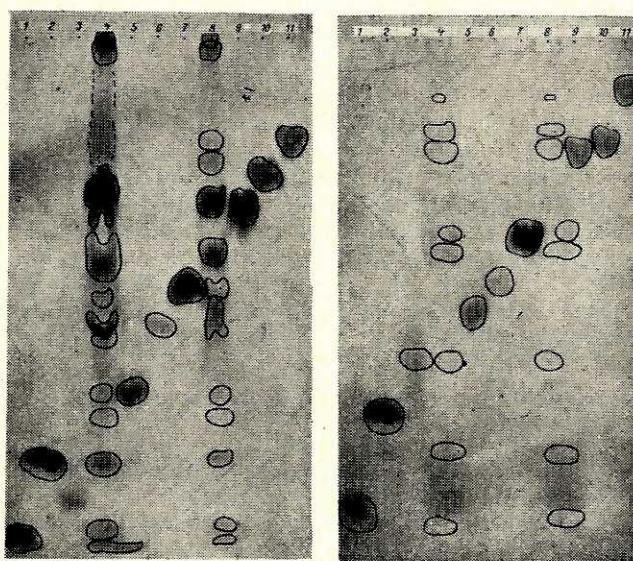
Princip naší metody je tento: Obdélník z chromatografického papíru Whatman čís. 1 o rozměru 25 × 20 cm, se volně zavěsil tak, že spodním okrajem delší strany dosahuje na dno chromatografického žlábků s analysovaným roztokem. Doba vzlínání je 24 h. Potom se papíry vymhou, vysuší v sušárně při 105 °C (doba sušení 4 min). Z vysušených papírů se odstříhne úzký proužek a zona nahromaděných aminokyselin se určí jednak její fluorescenci pod UV světlem, jednak detekcí roztokem ninhydrinu a opětovným vysušením v sušárně při 105 °C. Bylo zjištěno, že směs aminokyselin se nachází v čele nasátého pásu analysovaného vzorku kyseliny mléčné. Proto se čelo odstříhne a získaný proužek papíru — šířky asi 5 mm — se vylouží vodou. Vodný roztok se zahustí ve vakuum a analyzuje popsanou metodou papírové chromatografie.

Při analýze kyseliny mléčné, obsahující velké množství doprovodných látek, je nutné celý isolaciční postup opakovat, aby se dosáhlo dokonalejšího oddělení balastních látek, znesnadňujících chromatografické dělení aminokyselin.

Při poměrně vysoké viskozitě analysovaných vzorků dochází ke špatnému vzlínání a tím také ke stížnému oddělování zon jednotlivých látek. Tento nedostatek jsme se snažili odstranit tím, že jsme pracovali v atmosféře silně nasycené vodními parami. Dělení se zlepší jen částečně. Proto jsme vzorky řediti destilovanou vodou v poměru 1 : 5, čímž se sníží hustota i viskozita a vrstva, obsahující aminokyseliny, se snadněji oddělí od kyseliny mléčné a ostatních doprovodných látek. V souhlase s citovanou literaturou jsme rovněž zjistili, že je nutné udržovat určitý poměr mezi plochou papíru, použitého k analýze a množstvím analysovaného vzorku, protože při velkém přebyteku vzorku se vzlínání zastaví dříve, než je spotřebována veškerá zásoba ve žlábků. Papír je přetížen a nedochází k žádoucímu oddělení. Pro naše účely se osvědčilo používat 25 ml roztoku kyseliny mléčné, zředěné vodou v poměru 1 : 5, na uvedenou plochu chromatografického papíru.

Stanovení aminokyselin v jednotlivých vzorcích kyseliny mléčné

K pokusům byly použity tyto vzorky kyselin: a) technická kyselina mléčná ze závodu A,



Obr. 1. Chromatogram aminokyselin — technická kyselina mléčná A (vlevo)

1 — leucin, 2 — valin, 3 — 0, 4 — vzorek kyseliny mléčné, 5 — tyrosin, 6 — prolín, 7 — alanin, 8 — vzorek kyseliny mléčné, 9 — kyselina glutamová, 10 — glycín, 11 — kyselina asparagová

Obr. 2. Chromatogram aminokyselin — potravinářská kyselina mléčná B (vpravo)

1 — leucin, 2 — valin, 3 — kyselina γ -aminomáselná, 4 — vzorek kyseliny mléčné, 5 — tyrosin, 6 — prolín, 7 — alanin, 8 — vzorek kyseliny mléčné, 9 — kyselina glutamová, 10 — glycín, 11 — kyselina asparagová

- b) potravinářská kyselina mléčná ze závodu B (rok výroby 1956),
 c) potravinářská kyselina mléčná ze závodu C,
 d) potravinářská kyselina mléčná, získaná extrakcí technické kyseliny ze závodu A ethylacetátem.

Složení kyselin je uvedeno v tab. 1 a na přiložených chromatogramech (obr. 1, 2, 3 a 4).

Tabulka 1
Složení vzorků kyseliny mléčné

Vzorek kyseliny mléčné	acidita % váh.	dusík % váh.	popel % váh.	zabarvení
technická A	46,40	1,2600	6,403	tmavě hnědé
potravinářská B	47,81	0,0523	0,010	nažloutlé
potravinářská C	50,21	0,0277	0,1478	nažloutlé
extrahovaná ethylacetátem	57,83	0,2880	0,068	tmavě hnědé

Souhrn

1. Byla vypracována nová metoda na isolaci aminokyselin, přítomných v různých druzích kyseliny mléčné.

2. Chromatograficky byly prokázány tyto aminokyseliny:

V technické kyselině mléčné ze závodu A — kyselina asparagová, glicin, kyselina glutamová, alanin, tyrosin, kyselina γ -aminomáselná, valin, fenylalanin, leucin. Tři skvrny na chromatogramech nebyly identifikovány. Jde pravděpodobně o lysin, threonin a konečně látku, projevující po detekci žlutou skvrnu.

V potravinářské kyselině mléčné ze závodu B — glicin, kyselina glutamová, alanin, kyselina γ -aminomáselná, leucin. Dvě skvrny neidentifikovány. V jednom případě jde opět o žlutou skvrnu.

V potravinářské kyselině mléčné ze závodu C — kyselina asparagová, kyselina glutamová, alanin, kyselina γ -aminomáselná.

V potravinářské kyselině mléčné, získané extrakcí technické kyseliny ze závodu A ethylacetátem — kyselina asparagová, glicin, kyselina glutamová, alanin, kyselina γ -aminomáselná, leucin. Dvě skvrny neidentifikovány, v jednom případě jde rovněž o žlutou skvrnu.

3. Zastoupení jednotlivých aminokyselin v potravinářské kyselině mléčné, extrahované ethylacetátem (vzorek ze závodu B) a ethylacetátem, je až na kyselinu asparagovou stejně. Podle intenzity lze usuzovat, že i z hlediska kvantitativního jejich obsah přibližně stejný. Ve vzorcích je nej-

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ТЕХНИЧЕСКОЙ И РАФИНИРОВАННОЙ МОЛОЧНЫХ КИСЛОТАХ

1. Был разработан новый метод для изоляции аминокислот присутствующих в разных видах молочной кислоты.

2. Хроматографически были определены следующие аминокислоты:

В технической молочной кислоте с завода А: аспарагиновая кислота, глицин, глутаминовая кислота, аланин, γ -аминомасляная кислота, лейцин. Два пятна не были идентифицированы. Одно из пятен было желтое.

предполагать лизин, треонин и вещество проявляющееся желтым пятном.

В пищевой молочной кислоте с завода Б были определены: глицин, глутаминовая кислота, аланин, γ -аминомасляная кислота, лейцин. Два пятна не были идентифицированы. Одно из пятен было желтое.

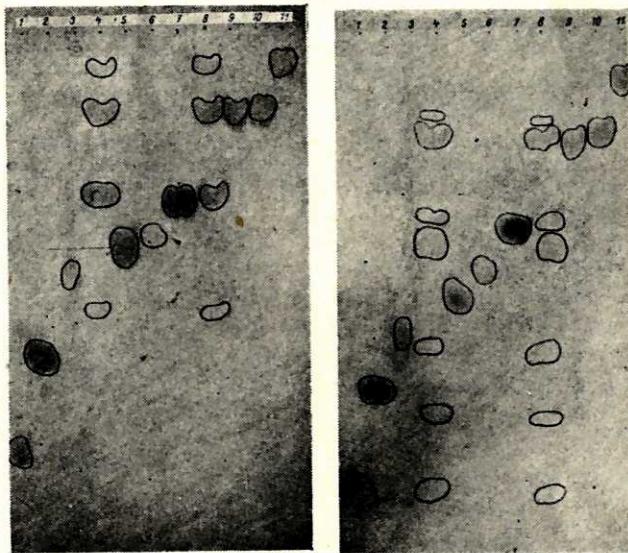
В пищевой молочной кислоте с завода В были: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аланин, γ -аминомасляная кислота.

В пищевой молочной кислоте полученной путем экстракции технической кислоты с завода А этилацетатом были обнаружены: аспарагиновая кислота, глицин, глутаминовая кис-

лота, аланин, γ -аминомасляная кислота, лейцин. Два пятна не были определены. В одном случае пятно было желтое.

3. Доли отдельных аминокислот в пищевой молочной кислоте выэкстрагированной этиловым эфиром (проба с завода Б) или этилацетатом были, за исключением аспарагиновой кислоты, одинаковые. Судя по интенсивности окраски можно предполагать, что и их количественная пропорция приблизительно одинакова. В пробах находится больше всего глутаминовой кислоты и аланина. Все прочие аминокислоты присутствуют лишь в форме следов.

4. В пищевой молочной кислоте



Obr. 3. Chromatogram aminokyselin — potravinářská kyselina mléčná C (vlevo)

Legenda je shodná s obr. 2

Obr. 4. Chromatogram aminokyselin — potravinářská kyselina mléčná, získaná extrakcí technické kyseliny A ethylacetátem (vpravo)

Legenda je shodná s obr. 2

více kyseliny glutamové a alaninu. Ostatní aminokyseliny jsou ve stopách.

4. V potravinářské kyselině mléčné, vyroběné rekrystalačním způsobem (kyselina ze závodu C), nebyla prokázána přítomnost glicinu a leucinu. Podle intenzity skvrn se dá usuzovat na větší procento alaninu než u kyseliny, rafinované extrakcí organickými rozpouštědly.

Literatura

- [1] Bohart, Carson: Nature 175, 470 (1955)
- [2] Ciferri, Gechele, Mariani, Torraea: Int. Sugar. J. 57, 99 (1955)
- [3] Mariani, Ciferri, Torraea: Int. Sugar J. 58, 156 (1956)
- [4] Mariani, Ciferri, Torraea: Int. Sugar J. 58, 334 (1956)
- [5] Vavruch: Listy cukrovarnické 67, 151 (1951)
- [6] Ljungdahl, Sandgren: Acta chem. Scand. 4, 1150 (1950)
- [7] Harris: J. Inst. Brew. 58, 417 (1952)
- [8] Danckwört, Pfau: Arch. Pharmaz. 265, 68 (1927)
- [9] Neugebauer: Die Kapillar-Lumineszenzanalyse im pharmazeutischen Laboratorium, Leipzig 1933
- [10] Danckwört, Eisenbrand: Lumineszenz-Analyse im filtrierten ultravioletten Licht, Leipzig 1956
- [11] Rapp: Pharmaz. Ztg. 73, 1585 (1928)
- [12] Rojahn: Pharmaz. Ztg. 74, 14 (1929)
- [13] Párkányi: Prům. potravín 9, 200 (1958)
- [14] Párkányi: Chemie 10, 45 (1958)

Došlo do redakce 14. 11. 1958.

полученной путем перекристаллизации (кислота с завода В) не были обнаружены глицин и лейцин. Судя по интенсивности окраски пятен, можно предполагать повышенное содержание аланина по сравнению с кислотой рафинированной путем экстрагирования органическими растворителями.

DETERMINATION OF FREE AMINO ACIDS IN INDUSTRIAL AND REFINED LACTIC ACIDS

1. A new method has been developed for isolation of amino acids present in various grades of lactic acid.

2. Chromatographic analyses disclosed the following amino acids:

In industrial lactic acid manufactured by works A: aspartic acid, glycine, glutamic acid, alanin, tyrosine, γ -aminobutyric acid, valine, phenylalanin, leucine. Three stains on chromatograms were not identified. Most likely they can be attributed to lysine, threonine and a substance giving after detection yellow stain.

In edible lactic acid manufactured by work B: glycine, glutamic acid, alanin, γ -aminobutyric acid, leucine. Two stains were not identified. One stain was yellow.

In edible lactic acid supplied by work C: aspartic acid, glutamic acid, alanin, γ -aminobutyric acid.

In edible lactic acid manufactured by extracting from industrial lactic acid supplied by work A: aspartic acid, glycine, glutamic acid, alanin, γ -aminobutyric acid, leucine. Two stains of which one was yellow were not identified.

3. Proportion of individual amino

acids present in edible lactic acid (sample from works B) extracted by ethylether and ethylacetate is on all chromatograms — except aspartic acid — practically identical. Judging from the intensity of colours, it can be expected that the amounts of individual amino acids is approximately the same. The greatest part of substances in all samples is represented by glutamic acid and alanin. The rest of amino acids is present in traces only.

4. Neither glycine, nor leucine were found in edible lactic acid manufactured by recrystallization (sample from works C). The intensity of stains permits to expect higher percentage of alanin than in lactic acid refined by extraction process in which organic solvents are used.

NACHWEIS FREIER AMINOSÄUREN IN TECHNISCHER UND RAFFINIERTER MILCHSÄURE

1. Es wurde eine Methode zur Isolation der in verschiedenen Milchsäurearten enthaltenen Aminosäuren ausgearbeitet.

2. Chromatographisch wurden folgende Aminosäuren nachgewiesen:

In der technischen Milchsäure aus dem Betriebe A: Asparaginsäure, Glycin, Glutaminsäure, Alanin, Tyrosin, γ -Aminobuttersäure, Valin, Phenylalanin, Leucin. Drei Flecken auf den Chromatogrammen konnten nicht identifiziert werden. Es handelt sich wahrscheinlich um Lysin, Threonin und eine weitere Substanz, welche nach der Detektion einen gelben Flecken gibt.

In der Milchsäure zu Nahrungs-

zwecken aus dem Betrieb C: Asparaginsäure, Glycin, Glutaminsäure, Alanin, γ -Aminobuttersäure.

In der Milchsäure zu Nahrungs-zwecken, welche aus der technischen Säure (Betrieb A) mittels Ethylacetat-Extraktion gewonnen wurde: Asparaginsäure, Glycin, Glutaminsäure, Alanin, γ -Aminobuttersäure, Leucin. Zwei Flecken blieben unidentifiziert. In einem Fall handelt es sich wieder um einen gelben Fleck.

3. Die Verwertung der einzelnen Aminosäuren in der Milchsäure zu Nahrungsgruppen, welche mittels Ethyläther (Muster aus dem Betrieb B) und Ethylacetat extrahiert wurde, ist mit Ausnahme der Asparaginsäure identisch. Nach der Intensität kann vorausgesetzt werden, dass auch vom quantitativen Standpunkt der Gehalt an Aminosäuren ungefähr gleich ist. Mit Ausnahme der Glutaminsäure und des Alanins, welche in den Proben in grösseren Quanten vorkommen, sind die Aminosäuren nur in Spuren enthalten.

4. In der Milchsäure zu Nahrungs-zwecken, welche nach dem Rekristallisierungsverfahren hergestellt wurde (Säure aus dem Betrieb C), wurde Glycin und Leucin nicht nachgewiesen. Nach der Intensität der Flecken konnte auf einen höheren Prozentgehalt an Alanin geschlossen werden als bei der Säure, welche durch Extraktion mit organischen Lösungs-mitteln raffiniert wurde.