

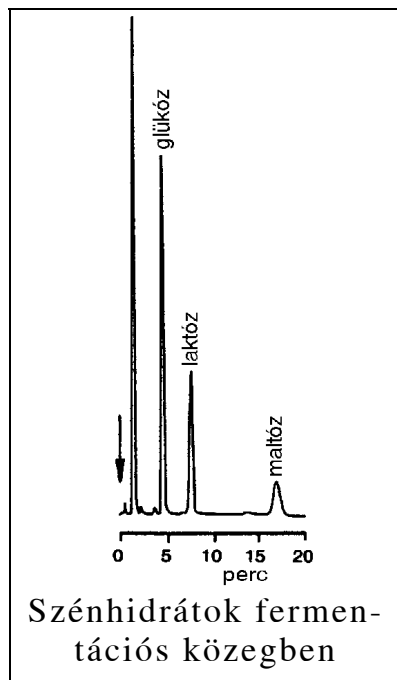
Válogatott példák a HPLC biotechnológiai alkalmazásáról*

A biotechnológia lehetővé teszi élelmiszerek, élelmiszeradalékok, kozmetikumok, mezőgazdasági termékek, gyógyszerek, valamint a diagnosztikumok és enzimek gazdaságos előállítását. A hagyományos fermentációs technikák mellett a géntechnológia számos módszere kerül előtérbe hatóanyagok és más anyagok egész sorának előállítására. Az optimális termelés előfeltétele a hatékony ellenőrzés. Erre mutatunk be példákat.

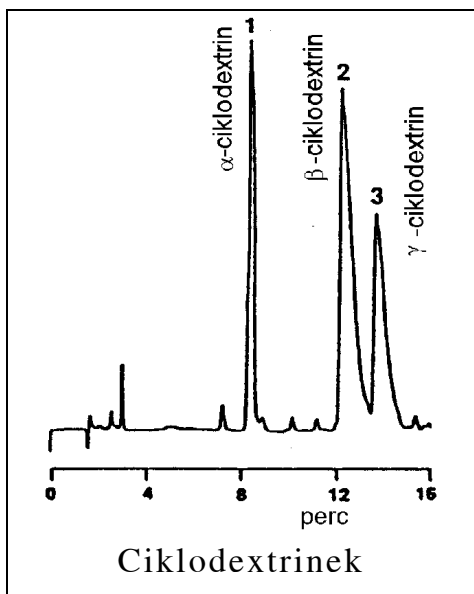
A szénhidrátok elválasztása

Jelentős szerepet töltenek be a szénhidrátok, mint szénforrások. A fermentáció helyzetéről időfüggő ellenőrzések adnak tájékoztatást.

Ebben az összetett rendszerben a szénhidrátok az anioncserélő (CarboPac PA1) oszlopon lúgos eluens (100 mM NaOH, 1 ml/perc) által különíthetők el. Annak érdekében, hogy jelentős elválasztást és érzékenységet érjenek el pulzáló amperometriás érzékelőt (PAD-Gold) alkalmaznak. Ilyen esetben a szénhidrátok az arany-elektrodon oxidálódnak, az elektródafelületet potenciálszekvencia létrehozásával tisztítják.



Szénhidrátok fermentációs közegben



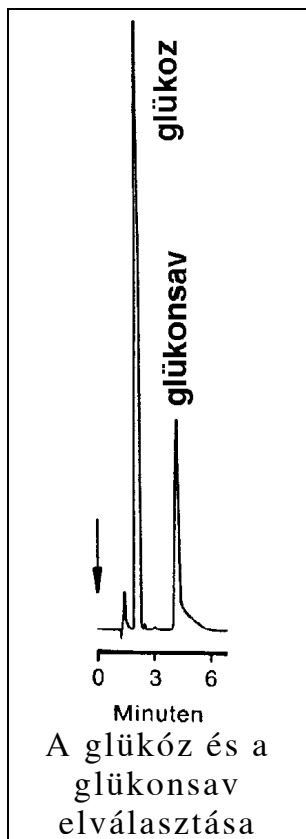
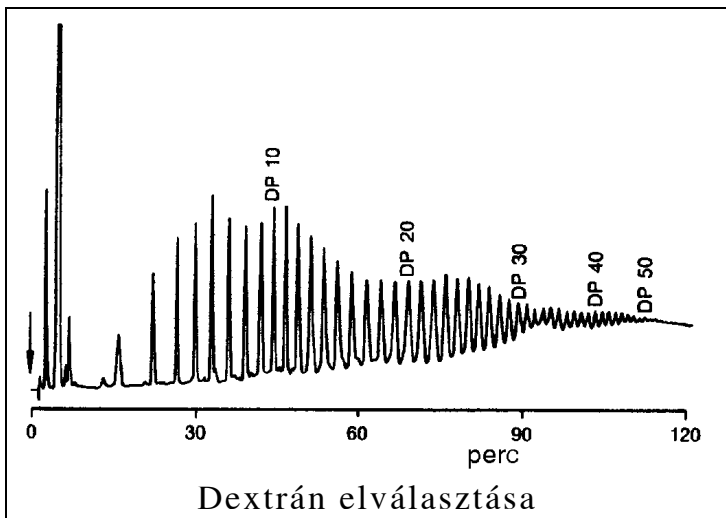
Biotechnológiai termékként - gyógyszerek és élelmiszerek adalékanyagaként fontos - az α , β és a γ -ciklodextrin.

oszlop: Carbo-Pac™ I
eluens A: 100 mM NaOH
eluens B: 100 mM NaOH+
500 mM NaOAc
gradiens: 10-80% B 20 perc alatt
áranlási sebesség: 1,0 ml/perc
érezkelő: PAD (Gold)

Ezek a ciklodextrinek képződnek az elfolyósított burgonyakeményítőtől glükamiláz és ciklodextrin-glükozil-transzferáz hatására.

* A Dionex GmbH dokumentációi alapján készített összeállítás, amely a Lebensmittel- und Biotechnologie c. folyóirat 9 (1992) 2. száma 68-71 oldalain jelent meg.

A következő példa egy glükóz polimer, a dextrans, és a különféle glükóz oligomerek elválasztása. Tejsavas baktériumok, mint a *Leuconostoc mesenteroides*, transzformálják a szacharóztartalmú tápoldatot transzglükozidáz által glükózgyűrűvé és szabad fruktózzá.



A glükóz és a glükonsav szimultán elválasztása ugyancsak jól végrehajtható anioncserélőn pulzáló amperometriás érzékkelővel. A fermentáció ellenőrzése jelentős, tekintettel a glükóz-szubsztrát meghatározására glükonsav oxidációs termék mellett.

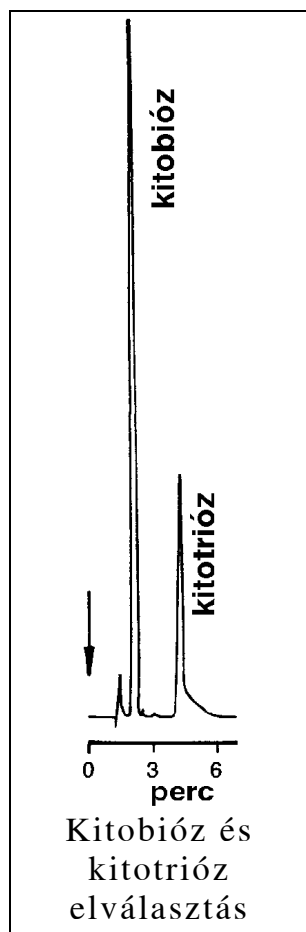
oszlop: HPIC-AS6
 eluens: 100 mM NaOH+
 100 mM NaOAc
 áramlás: 1 ml/perc
 érzékelés: pulzáló amperometria

Természetesen ez a módszer a glükonsav termékellenőrzése szempontjából is fontos.

Sok víz- és talajbaktérium kitint tud képezni. A kitin mikrobiális megtámadása extracelluláris szekréciós enzimekkel lehetséges, mint amilyen a kitináz és a kitobiáz. A kitináz által végzett lebontáskor kevés N-acetil-glükózamin képződik és túlnyomórészt kitobióz és -trióz,

amelyek Carbo Pac PA 1 anioncserélőn pulzáló amperometriával kimutathatók. A kitin szubsztrátként való alkalmazása célszerűen kitin képző baktériumok (pl. *Streptomyces griseus*) szelektív feldúsulásához és a kitintermelés növekedéséhez vezet.

oszlop: HPIC AS6
 eluens: 50 mM NaOH
 áramlás: 1 ml/perc
 érzékelés: PAD (Gold)

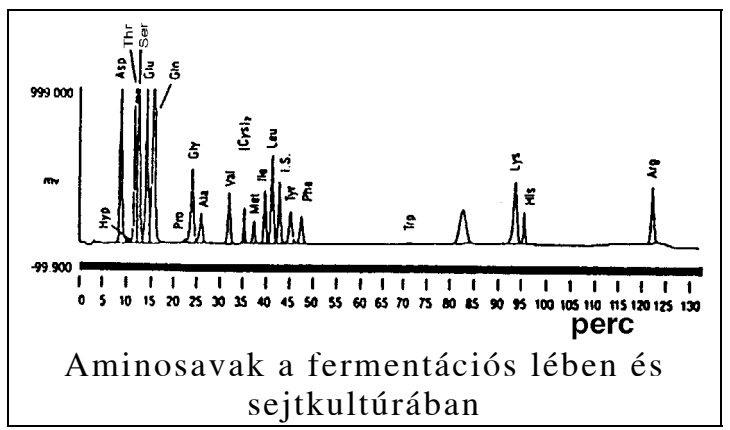


Aminosavak elválasztása

A fermentációs levekben az aminosavak elemzésére az Amino Pac Li-1 speciális oszlopot fejlesztették ki.

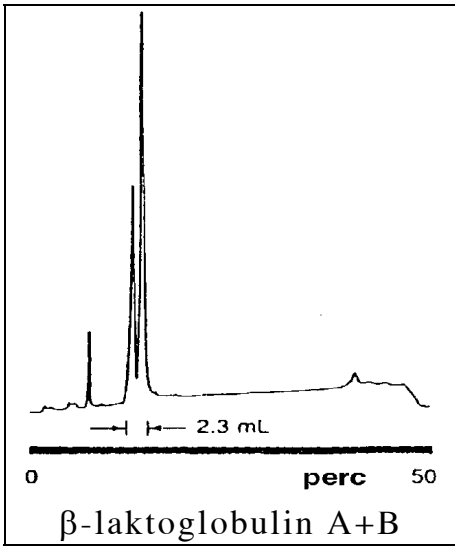
Fehérjék elválasztása

A fermentáció termékeként képződő enzimek elválasztása és feldolgozása igen jelentős feladat. Ehhez különféle kromatográfiai eljárások állnak rendelkezésre. Kipróbált módszert nyújt az anioncserélő-kromatográfia. A Dionex ehhez fejlesztette ki a teljesítőképes ProPac PA 1 elválasztó oszlopot. Jellemzők a MicroBeads (0,2 μ), amelyek polisztirol / divinil-benzolhoz kötött (10 μ) polimergyanták. Ily módon a szokásos oszlopokkal szemben lényegesen nagyobb felbontás és rövidebb analízisidő érhető el. A polimergyanták alkalmazása révén 0 és 14 pH közötti stabilitás érhető el.

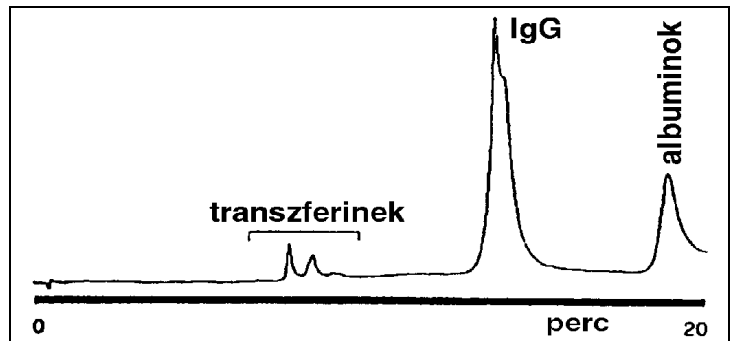


A következő példák a jelentős teljesítőképességre világítanak rá:

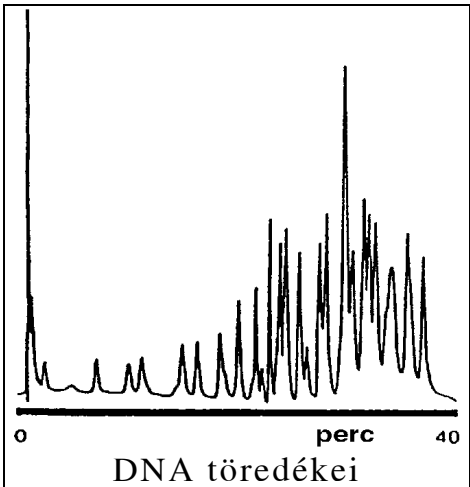
oszlop: Pro Pac PA 1 (4x250 mm)
 eluens A: 10 mM Tris.HCl, pH 7,9
 eluens B: A+1M NaCl
 áramlás: 1 ml/perc
 gradiens: 0-100% B 40 perc alatt
 érzékelés: 280 nm
 minta: 50 μ g



Természetesen az oszlop oligonukleotidok ill. nukleinsavak elválasztására is kiváló.



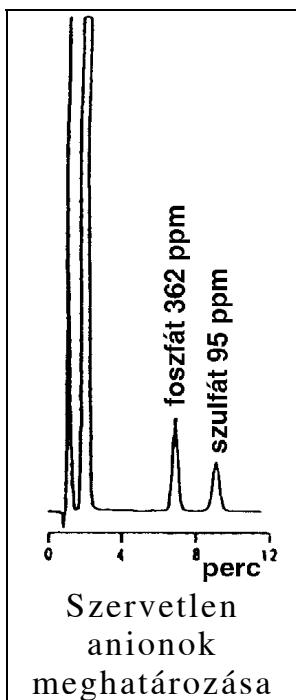
oszlop: Pro Pac PA 1 (4x250 mm)
 eluens A: 20 mM Tris.HCl, pH 8.0
 eluens B: eluens A+ 1 M NaCl
 áramlás: 1,5 ml/perc
 gradiens: 1-80% B 22 perc alatt
 érzékelés: 235 nm



eluens A: 20mM Tris.HCl, pH 7,7
 eluens B: A+1.0 M NaCl
 áramlás: 1,2 ml/perc
 gradiens: 56-64% B 40 percig
 érzékelés: 254 nm

4. Antibiotikumok

A HPLC Wahl-féle módszere termékanalízisre és termékizolálásra is alkalmas. A legfontosabb módszer ennél az alkalmazásnál az ionkromatográfia. Így például a penicillin szimultán elválasztható első lépésben a táptalaj szervesen összetevőitől a speciális IonPac AS4A latex-anioncserélőn vezetőképességi detektorral érzékelve.



oszlop: IonPac AS4, Ag4A
eluens: 2,4 mM Na₂CO₃+
áramlás: 1 ml/perc
érzékelő: vezetőképesség, 10 μS FS
fékező: AMMS, 20 mM H₂SO₄

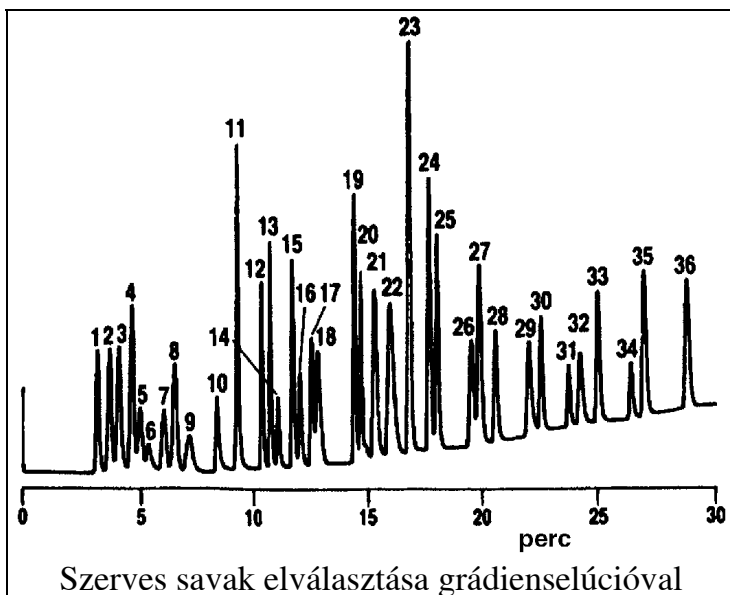
Szervesen anionok és kationok

Természetesen a fermentáció ellenőrzésére tekintettel a szervesen összetevők is jelentős szerepet játszanak. Az IonPac AS4A elválasztó oszlop a J⁻, Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄⁻, és a SO₄⁻ analízisére kiválóan alkalmas.

oszlop: IonPac AS4A
érzékelés: fékezett vezetőképesség
eluens: 2,2 mM Na₂CO₃+0,75 mM NaHCO₃

Szerves savak

Számos szerves sav keletkezik a fermentáció alatt. Ezek vizsgálata, akár bomlási termékekről, vagy izolálható végtermékekről van szó lényeges. A feladat jól megoldható anioncserélő IonPac AS5A-n, vagy ionkizárásos mechanizmussal IonPac ICE AS1 vagy AS5 oszlopon kromatografálva. Mindkét eljárásnál a vezetőképesség alapján detektálnak.



1. F⁻; 2. α-hidroxi-butirát; 3. acetát;
4. glikolát; 5. butirát; 6. glükonát;
7. α-hidroxi-valerát; 8. formiát (5 ppm); 9. valerát; 10. piruvát;
11. monoklór-acetát; 12. BrO₃⁻; 13. Cl⁻ (3 ppm); 14. galakturonát; 15. NO₂⁻ (5 ppm); 16. glükoronát; 17. diklór-acetát; 18. trifluor-acetát; 19. HPO₃²⁻; 20. SeO₃²⁻; 21. Br⁻; 22. NO₃⁻; 23. SO₄⁻; 24. oxalát; 25. SeO₄²⁻; 26. α-ketoglutarát; 27. fumarát; 28. ftalát; 29. oxál-acetát; 30. PO₄³⁻; 31. AsO₄³⁻; 32. CrO₄²⁻; 33. citrát; 34. izocitrát; 35. cisz-akonitát; 36. transz-akonitát;

