

# APARATURA

## BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

### Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) do oznaczania polioli w brzeczkach fermentacyjnych

AGNIESZKA DROŹDŻYŃSKA, KATARZYNA CZACZYK, JOANNA PAWLICKA  
UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,  
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

#### STRESZCZENIE

Alkohole (etanol, butanol, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, glicerol), kwasy organiczne (kw. cytrynowy, kw. bursztynowy, kw. mlekowy, kw. propionowy, kw. masłowy), cukry (glukoza), a także acetoinę rozdzielano na kolumnie Aminex HPX-87H przy zastosowaniu dwóch detektorów – refraktometrycznego i UV-DAD pracujących w układzie szeregowym. Badano wpływ poszczególnych parametrów chromatograficznych na jakość rozdzielenia. Wyznaczono niektóre parametry walidacyjne dla zaproponowanej metody.

Opracowana metoda pozwala na jakościową analizę wielu substancji w brzeczkach fermentacyjnych w szczególności, gdy niektóre z nich koeluują ze sobą.

#### The use of high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of polyols in fermentation broth

#### ABSTRACT

Alcohols (ethanol, butanol, 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, and glycerol), organic acids (citric acid, succinic acid, lactic acid, propionic acid, and butyric acid), sugar (glucose) and acetoin were separated on an Aminex HPX-87H column using two detectors: refractive index detector and UV-DAD detector. The influence of chromatographic parameters on chromatographic separation was analyzed. Some validation parameters for proposed method were determined.

## 1. WSTĘP

Poliole to wielowodorotlenowe alkohole mające dwie lub więcej grup wodorotlenowych (-OH) przyłączonych do różnych atomów węgla. Jednym z nich jest 1,3-propanodiol (1,3-PD) – alkohol o znaczącym potencjale przemysłowym. Zainteresowanie tym związkami znacznie wzrosło w ostatnim czasie ze względu na możliwość jego wykorzystania w procesach otrzymywania tworzyw sztucznych, takich jak poliestry, polietera i poliuretany – tworzywa o dużym stopniu biodegradowalności. W produkcji poliuretanów alkohol ten zastępuje toksyczny glikol etylenowy. Poliole są stosowane do produkcji rozpuszczalników, lubrykantów, kosmetyków, tekstyliów, produktów żywnościowych i preparatów farmaceutycznych [1].

1,3-PD jest jednym z najstarszych znanych produktów fermentacji. Odkryty i zidentyfikowany w 1881 roku przez Augusta Freunda jako produkt fermentacji glicerolu z udziałem *Clostridium pasterianum* [1].

Roczna produkcja 1,3-PD sięga 100 tys. ton i wytwarzany jest on głównie na drodze syntezy chemicznej z akroleiny lub tlenku etylenu. Jest to jednak proces wysoce kosztochłonny (konieczność wytworzenia odpowiednich warunków – wysoka temperatura, ciśnienie, zastosowanie katalizatorów). Technologie te powodują także powstawanie toksycznych produktów ubocznych, których utylizacja nastęrcza dodatkowych problemów. Mikrobiologiczna synteza 1,3-PD może być zatem optymalnym rozwiązaniem, ze względu na korzyści ekologiczne i możliwość zagospodarowania odpadowego glicerolu.

Biotechnologiczna produkcja 1,3-PD prowadzona jest z wykorzystaniem różnych szczepów mikroorganizmów (*Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Clostridium* spp. i in.) i różnych substratów (głównie glukozy i glicerolu) [2, 3]. Intensywnie rozwijane są także technologie oparte na zastosowaniu drobnoustrojów zmodyfikowanych genetycznie [4]. Szczególne zainteresowanie budzi glicerol jako substrat, ze względu na fakt, że jest to produkt uboczny przy produkcji biodiesla. W 2009 roku produkcja biodiesla w Unii Europejskiej osiągnęła poziom 10 milionów ton, w Polsce 1,5 mln ton. Poziom produkcji tego biopaliwa w Polsce generuje wytworzenie 200-300 tys. ton fazy glicerynowej, która może być wykorzystana jako substrat w procesach biotechnologicznych (co pozwoli na obniżenie ceny biodiesla) [5, 6].

Wykorzystanie glicerolu przez drobnoustroje obejmuje dwa szlaki metaboliczne – pierwszy, z udziałem dehydratazy glicerolu prowadzi do syntezy 1,3-PD,

drugi, z udziałem dehydrogenazy glicerolu może prowadzić do powstania 2,3-butanodiolu (2,3-BD) i innych metabolitów (mleczanów, propionianów, octanów i in.). Mikroorganizmy są zdolne do utylizacji glicerolu z wykorzystaniem obu szlaków metabolicznych jednocześnie [7]. Badania nad izolacją szczepów zdolnych do syntezy 1,3-propanodiolu stworzyły konieczność opracowania metody jednoczesnego oznaczania wszystkich tych związków.

Celem pracy było opracowanie metody jednoczesnego oznaczania 1,3-PD, 2,3-BD, glicerolu, acetoiny, mleczanów, propionianów, octanów, maślanów i etanolu techniką HPLC. W tym celu wykorzystano chromatograf cieczowy Agilent Technologies 1200 Series, z szeregowo podłączonymi detektorami: ultravioletowym z przeglądem widma i refrakcyjnym. Planowano także dokonać walidacji metody poprzez oznaczenie limitów detekcji, limitów oznaczalności i precyzji metody. Opracowanie takiej metody pozwoliłoby na precyzyjną ocenę zdolności wyizolowanych szczepów mikroorganizmów do syntezy 1,3-propanodiolu i/lub innych metabolitów.

## 2. MATERIAŁY I METODY

Oznaczenia wykonano na chromatografie cieczowym Agilent Technologies 1200 Series wyposażonym w automatyczny podajnik prób (G1329B), pompę binarną (G1312B) oraz kolumnę Aminex HPX-87H 300x7,8 (BIO-RAD). Do oznaczeń badanych substancji użyto dwóch detektorów pracujących w układzie szeregowym: detektora refraktometrycznego (RI) (G1362A) oraz detektora diodowego (G1315C) z przeglądem widma (190-400 nm) (DAD).

Testowano parametry chromatograficzne:

- temperatura rozdziału: 30-65°C;
- przepływ fazy ruchomej 0,5-0,6 ml/min;
- eluent:
  - substancja zakwaszająca eluent: kwas siarkowy; kwas fosforowy,
  - pH fazy regulowane stężeniem kwasu siarkowego w fazie ruchomej (0,0005M-0,02M),
  - dodatek substancji organicznej do fazy – acetonitrylu (0, 10, 30%) oraz izopropanolu.

Do kolumny chromatografu cieczowego wprowadzano 4 µl próby. Obliczenia wykonano w oparciu o metodę standardu zewnętrznego z wykorzystaniem powierzchni lub wysokości pików (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem programu ChemStation for LC 3D systems, Agilent).

Wszystkie standardy pochodziły z firmy SIGMA-ALDRICH.

**Zdolność rozdzielczą** kolumny  $R_s$  wyznaczono z równania [8]:

$$R_s = 2 \frac{t_2 - t_1}{w_2 + w_1} \quad (1)$$

gdzie:

$t_1$  – czas retencji piksu eluującego wcześniej,

$t_2$  – czas retencji piksu eluującego później,

$w_1$  – szerokość piksu eluującego wcześniej mierzona przy podstawie,

$w_2$  – szerokość piksu eluującego później mierzona przy podstawie.

**Granica wykrywalności** (ang. *Limit of Detection* – LOD) – najmniejsza ilość lub stężenie substancji możliwe do wykrycia za pomocą danej techniki analitycznej z określonym prawdopodobieństwem.

Granice wykrywalności wyznaczono w oparciu o metodę graficzną. Wykonano po 6 równoległych oznaczeń dla 3 poziomów stężeń ( $c$ ) wybranych analitów. Dla każdej serii pomiarów obliczano wartość odchylenia standardowego ( $s$ ) i wyznaczano zależność liniową  $s = f(c)$ . Z wykresu odczytywano wartość wyrazu wolnego  $s_0$  i wyznaczano wartość granicy wykrywalności zgodnie z zależnością [9]:

$$\text{LOD} = 3s_0 \quad (2)$$

O poprawności wyznaczonych wartości granic wykrywalności świadczy spełnienie zależności

$$10\text{MDL} > c > \text{MDL} \quad (3)$$

gdzie:

$c$  – najniższa wartość stężenia wykorzystywanego wzorca,

MDL – ang. *Method Detection Limit* – Granica wykrywalności metody analitycznej.

**Granica oznaczalności** (ang. *Limit of Quantification* – LOQ) – najmniejsza ilość lub stężenie substancji możliwe do ilościowego oznaczenia za pomocą danej techniki analitycznej z określonym prawdopodobieństwem.

Granice oznaczalności wyznaczono na podstawie zależności [9]:

$$\text{LOQ} = 3\text{LOD} \quad (4)$$

**Powtarzalność** – określa stopień zgodności między wynikami uzyskanymi tą samą metodą (w danym laboratorium, przez danego analityka z wykorzystaniem danego urządzenia pomiarowego w krótkim czasie) i na tej samej próbce przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczeń [8, 9].

Powtarzalność metody obliczono zgodnie ze wzorem:

$$\text{CV} = \frac{s}{x_{sr}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (5)$$

gdzie:

CV – współczynnik zmienności (ang. *Coefficient of Variation*),

$x_{sr}$  – wartość średnia powierzchni piksu z 10 powtórzeń dla roztworów wzorcowych analitów (1g/l),

$s$  – odchylenie standardowe.

**Poprawność (prawdziwość)** – określa stopień zgodności wyniku oznaczenia, będącego wartością średnią z serii pomiarów, z wartością oczekiwaną [9].

Poprawność metody wyznaczono posługując się metodą z użyciem standardu zewnętrznego. Sporządzono 8 mieszanin roztworów wzorcowych zawierających 1,3-PD, 2,3-BD, acetoinę oraz kwas propionowy w znanych stężeniach (0,25-1,25 g/l w różnych kombinacjach). Wykonano analizę chromatograficzną przygotowanych roztworów w trzech powtórzeniach. Następnie wyznaczono poprawności metody, której miarą jest odzysk standardu ( $R$ ):

$$R = \frac{T_o}{T_s} \cdot 100 \quad (6)$$

w którym:

$T_o$  – ilość (stężenie) substancji oznaczonej w próbce za pomocą analizy chromatograficznej,

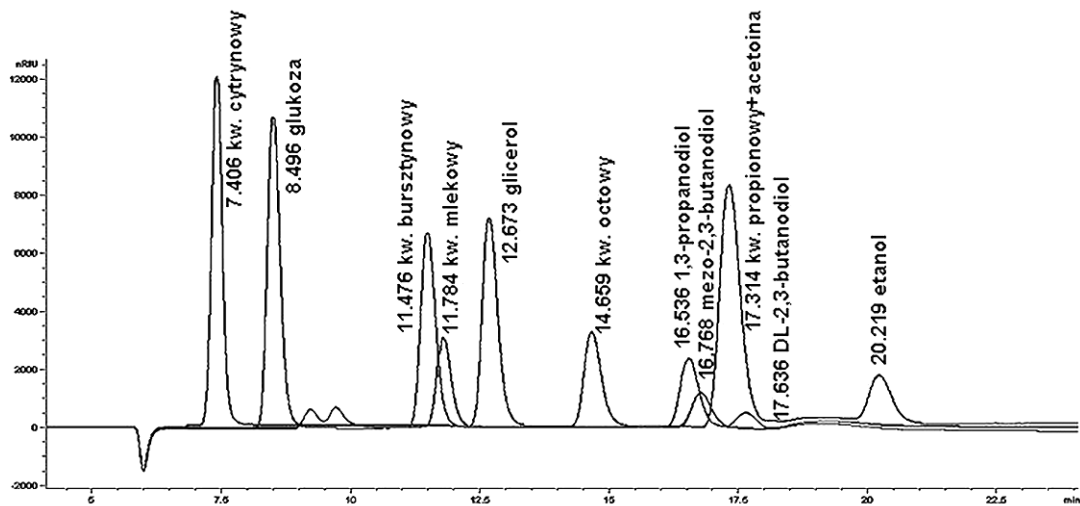
$T_s$  – znana ilość (stężenie) substancji w próbce.

### 3. WYNIKI I DYSKUSJA

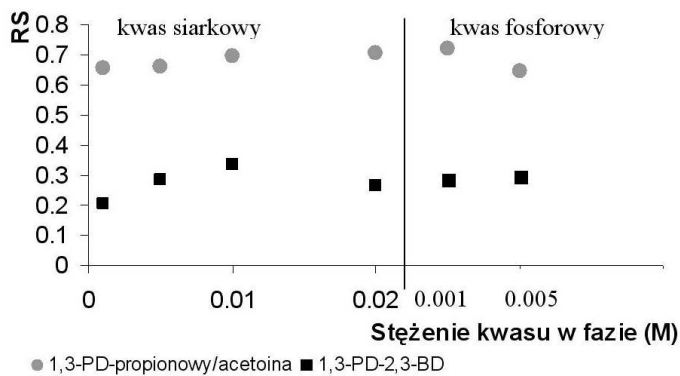
Kolumna chromatograficzna Aminex HPX-87H firmy Bio-Rad jest kolumną dedykowaną do oznaczania cukrów, alkoholi, kwasów organicznych i stosowana jest w monitoringu procesów fermentacyjnych czy analizie płynów biologicznych itd. [10]. Rysunek 1 przedstawia przykładowy chromatogram rozdzielu brzożki fermentacyjnej na kolumnie Aminex HPX-87H.

Przy zastosowaniu danych parametrów chromatograficznych nie jest możliwa analiza 1,3-PD oraz 2,3-BD, gdyż substancje te koeluują. Podjęto próbę optymalizacji parametrów chromatograficznych w celu uzyskania metody umożliwiającej analizę jakościową oraz ilościową 1,3-PD w próbach mogących zawierać inne substancje (m.in. 2,3-BD, acetoinę, kw. propionowy). Testowano takie parametry jak rodzaj eluentu, temperaturę rozdzielu oraz przepływ fazy ruchomej.

Zmiana stężenia kwasu siarkowego w fazie ruchomej i związana z tym zmiana pH eluentu nie wpływały znacząco na zdolność rozdzielczą kolumny (Rys. 2). Może to być spowodowane tym, iż pH eluentu najbardziej wpływa na rozdział kwasów organicznych o  $pK_a < 4$  [10], natomiast  $pK_a$  kwasu propionowego jest większe od 4. Rodzaj dodanego kwasu do eluentu także nie wpłynął znacząco na rozdział badanych związków. Zastosowanie kwasu fosforowego nie wpłynęło istotnie na wartość zdolności rozdzielczej kolumny (Rys. 2).

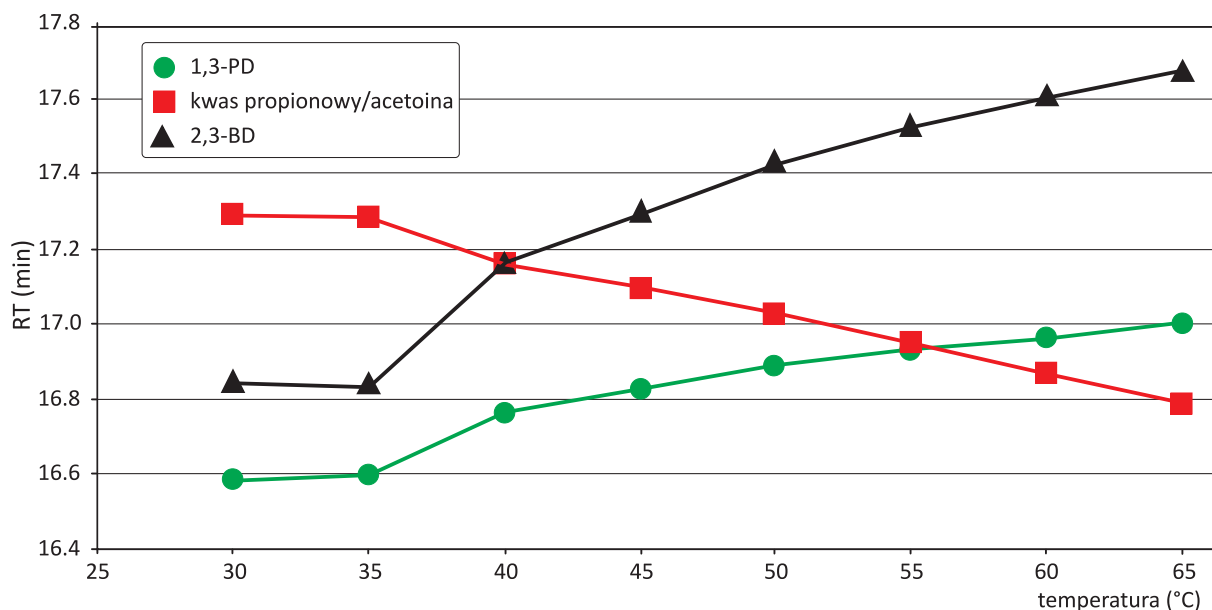


**Rysunek 1.** Przykładowy chromatogram rozdziatu cukrów, kwasów organicznych i alkoholi w brzeczce fermentacyjnej. Parametry analizy: kolumna Aminex HPX-87H, 0,001 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,6 ml/min, 30°C, detektor RI



**Rysunek 2.** Wpływ stężenia kwasu w eluencie na zdolność rozdzielczą kolumny. Parametry: kolumna Aminex HPX-87H, temp. 30°C, 0,6 ml/min

Kolejnym testowanym parametrem była temperatura procesu. Zaobserwowano, iż wraz ze wzrostem temperatury zwiększały się czasy retencji 1,3-PD oraz 2,3-BD, natomiast czasy retencji kwasu propionowego i acetoiny ulegały skróceniu. Najlepszy rozdziel 1,3-PD od 2,3-BD uzyskano w temperaturze 65°C, natomiast w temperaturze 30°C uzyskano najlepszy rozdziel 1,3-PD od kwasu propionowego/acetoiny (Rys. 3). W niskich temperaturach 1,3-PD koeluował z 2,3-BD, natomiast w wysokich 1,3-PD koeluował z kw. propionowym i acetoiną. Kwas propionowy i acetoina koeluowały ze sobą bez względu na temperaturę procesu chromatograficznego. Temperatura 40°C została wybrana jako najlepsza dla oznaczania 1,3-PD w próbach mogących zawierać 2,3-BD oraz kw. propionowy i acetoinę, gdyż umożliwiła najlepszy rozdziel 1,3-PD od 2,3-BD oraz kwasu propionowego i acetoiny (Rys. 3).



**Rysunek 3.** Wpływ temperatury na czasy retencji (RT) wybranych związków. Parametry rozdziatu: kolumna Aminex HPX-87H, 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,6 ml/min, detektor RI

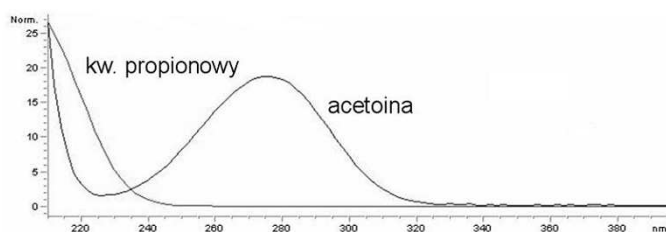
W kolejnych eksperymentach dodawano do fazy ruchomej modyfikator organiczny w postaci acetonitrylu lub izopropanolu. Dodatek 30% acetonitrylu do eluentu znacznie skracał czas retencji kwasów organicznych i acetoiny (analiza z wykorzystaniem detektora DAD). Niemożliwa była analiza pozostałych związków, gdyż odczyt z detektora RI charakteryzował się bardzo dużym szumem przez co znacznie spadał współczynnik odpowiedzi dla związków analizowanych z użyciem tego detektora (niemożliwe było wykrycie 1,3-PD na poziomie 1g/l). Podobny efekt uzyskano w przypadku zastosowania 10% acetonitrylu oraz 5% izopropanolu (dane nie prezentowane).

Standardowo stosowaną szybkością przepływu fazy ruchomej dla kolumny Aminex HPX-87H jest 0,6 ml/min. W jednym z eksperymentów zmniejszono ją do 0,5 ml/min uzyskując lepsze zdolności rozdzielcze.

Na podstawie przeprowadzonych analiz do dalszych doświadczeń wybrano następujące parametry analizy chromatograficznej: temperatura 40°C, przepływ 0,5 ml/min oraz 0,5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> jako eluent (Rys. 4). Ponieważ parametry te nie umożliwiły jednoczesnego całkowitego rozdzielenia 1,3-PD, 2,3-BD, kwasu propionowego oraz acetoiny z wykorzystaniem detektora RI, zastosowano układ składający się z dwóch detektorów – RI oraz UV-DAD pracujących w układzie szeregowym.

Oznaczanie dioli wykonano przy użyciu detektora RI, natomiast acetoinę i kwas propionowy oznaczono przy zastosowaniu detektora UV. Zarówno acetoina jak i kwas propionowy absorbują światło UV, jednak

ich widma absorpcyjne różnią się od siebie (Rys. 5). Oznaczenia acetoiny wykonano przy długości fali, w której wykazuje ona maksimum absorpcji – przy 276 nm (Rys. 6B). Przy tej długości fali kw propionowy nie daje sygnału na detektorze UV-DAD. Kwas propionowy oznaczono przy długości fali wynoszącej 226 nm (Rys. 6A), ponieważ przy tej długości fali występuje największa różnica w ilości absorbowanego światła przez kwas propionowy i acetoinę.



Rysunek 5. Widma absorpcyjne kwasu propionowego oraz acetoiny

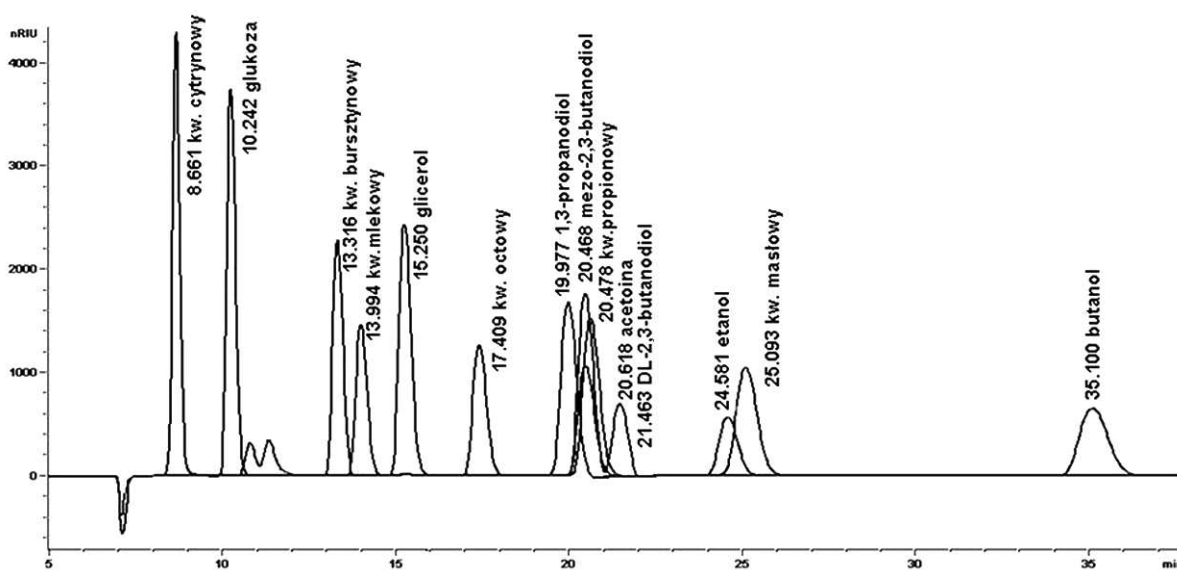
Oznaczenia ilościowe kwasu propionowego dokonano na podstawie następujących wyliczeń [11]:

– Posługując się krzywą kalibracyjną, sporządzoną dla roztworów wzorcowych kwasu propionowego przy długości fali 226nm obliczono jego stężenie w próbce na podstawie wyznaczonej wysokości (powierzchni) piku kwasu propionowego przy 226 nm ( $H_{prop_{226}}$ ).

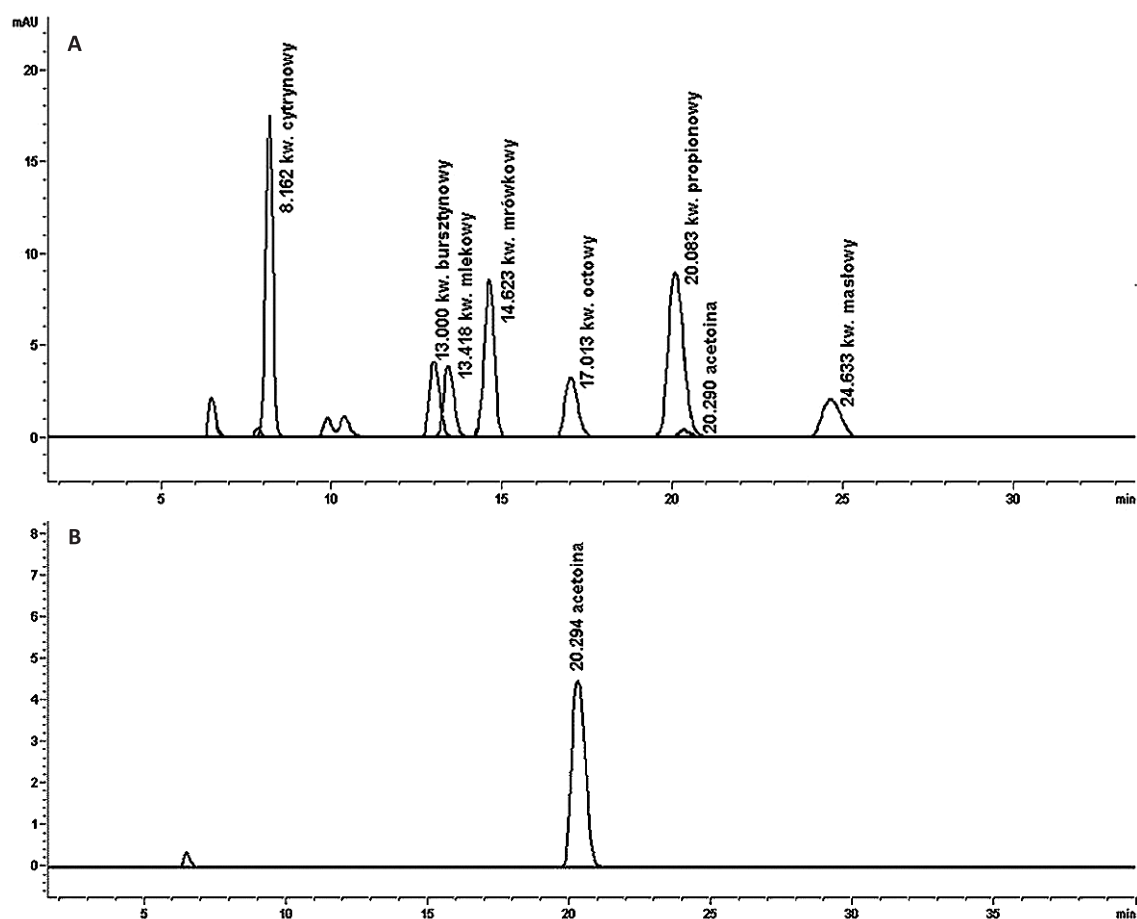
– Wysokość (powierzchnię) piku kwasu propionowego przy 226 nm ( $H_{prop_{226}}$ ) wyznaczono w następujący sposób:

$$H_{prop_{226}} = H_{226} - H_{a_{226}} \quad (7)$$

$H_{226}$  – wysokości (powierzchnia) piku przy 226nm (odczytane z chromatogramu),



Rysunek 4. Przykładowy chromatogram rozdzielania cukrów, kwasów organicznych i alkoholi w brzezce fermentacyjnej. Parametry analizy: kolumna Aminex HPX-87H 0,5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 ml/min, 40°C, detektor RI



**Rysunek 6.** Przykładowy chromatogram rozdzielania kwasów organicznych przy 226 nm (A) oraz 276 nm (B). Parametry analizy: kolumna Aminex HPX-87H 0,5 m  $\text{MH}_2\text{SO}_4$ , 0,5 ml/min, 40°C, detektor UV

$H_{a_{226}}$  – wysokości (powierzchnię) piku acetoiny przy 226 nm, obliczona z równania:

$$H_{a_{226}} = a C_a + b \quad (8)$$

w którym:

a oraz b – współczynniki w równaniu kalibracyjnym sporządzonym dla roztworów wzorcowych acetoiny przy długości fali równej 226 nm,

$C_a$  – stężenie acetoiny (obliczone przy długości fali 276 nm).

Przy oznaczeniach ilościowych mezo-2,3-BD postużono się następującą procedurą:

- Postużując się krzywą kalibracyjną sporządzoną dla mezo-2,3-BD obliczono jego stężenie na podstawie wyznaczonej wysokości (powierzchni) piku mezo-2,3-BD ( $H_{BD}$ ).
- Wysokość (powierzchnię) piku mezo-2,3-BD ( $H_{BD}$ ) wyznaczono w następujący sposób:

$$H_{BD} = H_{RI} - H_{a_{RI}} - H_{prop_{RI}} \quad (9)$$

$H_{RI}$  – wysokości (powierzchnia) piku z detektora RI (odczytane z chromatogramu)

$H_{a_{RI}}$  – wysokości (powierzchnię) piku acetoiny (detektor RI), obliczona z równania:

$$H_{a_{RI}} = a C_a + b \quad (10)$$

gdzie:

a oraz b – współczynniki w równaniu kalibracyjnym sporządzonym dla roztworów wzorcowych acetoiny (detektor RI),

$C_a$  – stężenie acetoiny (obliczone przy długości fali 276 nm).

$H_{prop_{RI}}$  – wysokość (powierzchnię) piku kw. propionowego (detektor RI), obliczona z równania:

$$H_{prop_{RI}} = a C_{prop} + b \quad (11)$$

gdzie:

a oraz b – współczynniki w równaniu kalibracyjnym sporządzonym dla roztworów wzorcowych kwasu propionowego (detektor RI),

$C_{prop}$  – stężenie kwasu propionowego (obliczone przy długości fali 226 nm, zgodnie z metodyką opisaną powyżej).

Zaproponowana metoda pozwala na ilościowe oznaczanie znacznej liczby substancji w czasie trwania jednej analizy. 1,3-PD jak również 2,3-BD i koelujące z nim acetoina i kwas propionowy mogą być oznaczone z stosunkowo dobrą dokładnością. Średnie wartości odzysku (R) obliczone ze wzoru (6) dla

**Tabela 1.** Dokładność metody – odzysk standardu R (%)

Substancja	1,3-PD	meso-2,3-BD	acetoina	kwask propionowy
Odzysk standardu R (%)	102,5	113,8	98,6	92,4

**Tabela 2.** Wartości liczbowe granic wykrywalności (LOD), granic oznaczalności (LOQ) oraz współczynnika zmienności (CV%)

Substancja Parametr	1,3-PD	meso-2,3-BD	DL-2,3-BD	acetoina	kwask propionowy	glicerol
LOD g/l	0,009	0,04	0,04	0,02	0,03	0,007
LOQ g/l	0,027	0,13	0,12	0,05	0,08	0,02
CV [%] dla 1g/l	0,65	0,9	0,9	1	0,8	0,2

1,3-PD, 2,3-BD oraz kwasu propionowego i acetoiny umieszczono w Tabeli 1.

W kolejnych doświadczeniach wyznaczono parametry walidacyjne dla zaproponowanej metody. Wartości granicy wykrywalności, oznaczalności oraz precyzji dla 1,3-PD, 2,3-BD, acetoiny, kwasu propionowego oraz glicerolu przedstawiono w Tabeli 2.

#### 4. PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej badania miały na celu pokazanie w jaki sposób poszczególne parametry wpływają na rozdział badanych związków. Opracowana

metoda pozwala na jakościową analizę wielu różnych substancji (cukrów, alkoholi, kwasów organicznych) w brzeczkach fermentacyjnych, w szczególności gdy niektóre z nich (1,3-PD, 2,3-BD, acetoina, kwas propionowy) koeluują ze sobą przy danych parametrach analizy chromatograficznej. Kolumna Aminex HPX-87H umożliwia separację molekuł dzięki takim mechanizmom jak wykluczenie jonowe, wymiana jonów, wymiana ligandów, sączenie molekularne dlatego tak trudne jest zoptymalizowanie parametrów chromatograficznych.

**Badania zrealizowano w ramach projektu „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksyłowych”. Badania finansowane z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, projekt PO IG 01.01.02-00-074/09.**

#### LITERATURA

- [1] Saxena R.K., Anand P., Saran S., Isar J.: Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol. Adv.*, 27, 895-913, 2009.
- [2] Deckwer W-D.: Microbial conversion of glicerol to 1,3-propanediol. *FEMS Microbiol. Rev.*, 16, 143-149, 1995.
- [3] Selembo P.A., Perez J.M., Lloyd W.A., Logan B.E.: Enhances hydrogen and 1,3-propanediol production from glicerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 104(6), 1098-1106, 2009.
- [4] Celińska E.: Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. *Biotechnol. Adv.*, 28, 519-530, 2010.
- [5] Da Silva G.P., Mack M., Contieo J.: Glicerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.*, 27, 30-39, 2009.
- [6] Barbirato F., Himmi E.H., Conte T., Boris A.: 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and etanol industries. *Ind. Crops Prod.*, 7, 281-289, 1998.

- [7] Celińska E., Grajek W. Biotechnological production of 2,3-butanediol – Current state and prospects. *Biotechnol. Adv.*, 27, 715-725, 2009.
- [8] Szczepaniak W.: *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002, 47-54, 301-319.
- [9] Konieczka P., Namieśnik J.: *Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych*. Warszawa, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne Warszawa, 2007, 228-233, 276-277.
- [10] *Guide to Aminex HPLC Columns for Food and Beverage, Biotechnology, and Bio-Organic Analysis*. Bio-Rad, 1993.
- [11] Zeppa G., Conterno L., Gerbi V.: Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2722-2726, 2001.