

技术与方法

微量甲醇和乙醇测定法
——微生物氧吸收测定法

何开泽 赵树杰

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

摘要 本文介绍一种新的甲醇及乙醇含量测定法。它的原理是: 甲基化合物营养细菌菌株 *Hyphomicrobium* sp. 8502 活细胞在有氧条件下氧化甲醇或乙醇, 氧的消耗量与样品中甲醇或乙醇的含量成正比, 而前者可以通过溶氧电极定量测定。此法简便快速, 灵敏度高, 甲醇含量低于 10 mg/L 仍能准确测定。用此法测定了微生物发酵上清液甲醇浓度, 所得结果与化学测定非常接近。

关键词 甲醇测定; 乙醇测定; 生丝微菌

在以甲醇或乙醇作为基质或产物的微生物发酵过程中, 对甲醇或乙醇浓度的监测是非常重要的。除气相色谱法外, 一般测定甲醇的含量均采用传统的化学测定法。即高锰酸钾-亚硫酸品红法^[1]。此法操作复杂, 显色缓慢, 成色不稳定, 并且测定范围有限, 样品甲醇含量低于 0.4 g/L 时, 光吸收值与甲醇含量之间无线性关系^[1]。如用铬变酸代替亚硫酸品红^[2], 虽在一定程度上能提高测定的灵敏性, 但仍未能完全克服此法的明显缺陷。所以化学测定法作为发酵过程的监测手段难于满足快速、准确的实际需求。为了解决这一困难, 我们在工作实践中摸索出了一种新的甲醇含量测定法——微生物氧吸收法, 此法也适合于乙醇含量的测定。

此法的基本原理是: 微生物在生命活动中氧化甲醇, 这一过程有氧的消耗。当甲醇作为唯一基质时, 氧的消耗量可作为甲醇含量的指标。*Hyphomicrobium* sp. 8502 是一株能以甲醇为唯一碳源和能源的甲基化合物营养细菌。当 8502 活细胞氧化甲醇时, 甲醇浓度很低便可达到最大反应速度, 其反应速度保持不变。甲醇初始浓度与反应终了时的消耗量成正比, 而后者可用溶解氧电极定量测定, 并可在记录仪上直观地显示出来。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌株: 用生丝微菌 (*Hyphomicrobium* sp.) 8502 活细胞作为甲醇氧化的催化剂, 此菌能以甲醇作为唯一碳源和能源生长, 并能氧化乙醇。

2. 试剂: 主要试剂均为分析纯。标准甲醛溶液由下述方法制备: 称取聚合甲醛 (Paraformaldehyde) 1.0 克于封闭试管中, 加蒸馏水 10 ml, 沸水浴加热 12 小时使聚合物完全水解。

3. 仪器

① Rank 氧电极: 是一种可用于微生物材料呼吸测定的溶氧电极。

② 自动平衡记录仪: 上海大华仪表厂出品, 型号: XWT-100, 量程: 1 mV。

(二) 方法

1. 微生物氧吸收法

① 菌体悬液的制备: 8502 菌株液管保存菌种在含有 4.0 g/L 甲醇的 No.2 无机盐培养基^[3]中活化, 30℃ 摇动扩大培养过夜至对数生长期, 用 RPR-12 转头 4000 r/min 离心 15 分钟, 细胞用 50 mmol/L 磷酸盐-5 mmol/L MgCl₂ (pH 7.0) 洗涤两次, 以适当密度 0.5—1.0 mg 干重/ml 悬浮于同一缓冲液中。离心细胞可在 2—4℃ 条件下贮存两周以上。

② 测定: 取 1.7 ml 菌悬液于 Rank 氧电极反应杯中, 恒温 30℃ 搅拌, 待溶氧变化速率平衡后, 准确加入经 30℃ 预热的 0.1 ml 适当浓度的基质溶液。反应开始, 溶氧按明显增加的

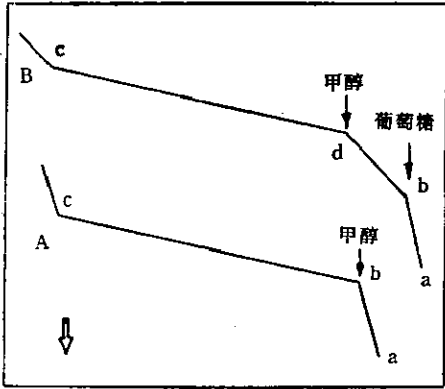


图1 *Hyphomicrobium* sp. 8502 甲醇(A)及葡萄糖(B)氧化的耗氧曲线示意图

a—b: 基础呼吸; 基质加入(反应起始)如箭头所示;
c: 甲醇反应终点; 曲线A中 b—c 间的横向位移为
迁移距离; 曲线B中 b—d 与 d—c 间斜率的差异可
区分葡萄糖与甲醇的反应

空心箭头表示走纸方向, 纸速: 8mm/min

速率匀速下降。待溶氧曲线回复到基础呼吸斜率时, 为反应终点。以反应开始至终了时曲线的迁移距离(记录纸上横向格数表示)作为耗氧量指标。耗氧曲线如图1所示。

2. 化学测定法: 见参考文献^[4]。

实验结果

1. 已知甲醇浓度的测定——标准曲线的绘制: 为了探讨耗氧量与底物浓度间的关系, 对不同浓度的标准甲醇溶液作了氧吸收测定。图2表明甲醇浓度与相应的耗氧曲线迁移距离的

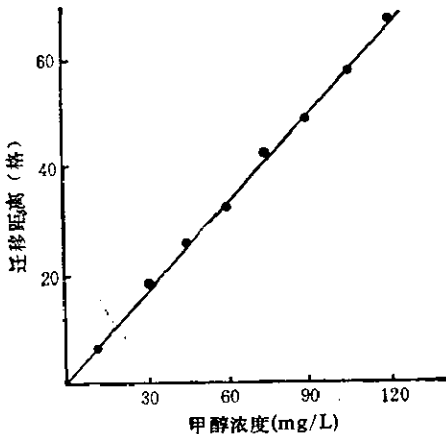


图2 甲醇测定的标准曲线

关系。相关系数 r 值为 0.9986。

2. 未知样品的测定: 所用样品为以甲醇为基质用 8502 发酵生产聚羟基丁酸 (Poly-3-hydroxy-butyrates, PHB) 过程中不同时期的发酵上清液。在计算样品含量时, 先用标准甲醇标定出记录纸上每格位移相当的甲醇含量, 再据此系数及样品的迁移距离求出甲醇含量。表1列出测定结果及其与化学法的比较。

表1 未知样品的氧吸收测定及其与化学测定的比较

样品编号	1		2		3	
稀释倍数	100	50	50	25	100	50
迁移距离[格]	19	40	20	40	15	29
甲醇含量(g/L)	3.4	3.6	1.8	1.8	2.7	2.6
平均值(g/L)	3.5		1.8		2.7	
化学测定*(g/L)	3.3		1.6		2.6	

* 根据参考文献, 用比色法测定^[4]。

3. 乙醇含量的测定: *Hyphomicrobium* sp. 8502 是一株有限兼性的甲基化合物营养菌, 除甲醇外, 它还能氧化其他一些简单的有机化合物, 乙醇就是其中之一。为了阐明乙醇含量与氧吸收间的关系, 用此菌作了不同浓度的乙醇的氧吸收测定。从图3的结果可知: 同甲醇一样, 乙醇浓度与氧吸收之间亦存在良好的线性关系。相关系数 r 为 0.9993。

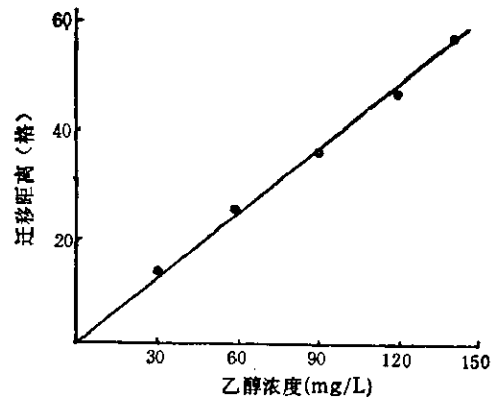


图3 乙醇测定标准曲线

4. 8502 菌对甲醇乙醇以外的几种基质的氧化——干扰因素的探讨

由于 8502 菌在营养上的有限兼性特性, 它

表 2 不同基质最大反应速度及相应的
基质浓度与甲醇的比较*

基 质	甲醇	异丙醇	甲酸	丙三醇	葡萄糖	柠檬酸三钠
最大反应速度	100	65	59	15	9	6
基质浓度	1	66	239	1358	377	116

* 反应速度的计算扣除了基础呼吸,表中所列为相对值。

对待测底物以外的物质的氧化就可能成为测定的干扰因素。我们对甲酸、异丙醇、丙三醇、葡萄糖及柠檬酸三钠几种基质作了测定。表 2 列出了这些物质在同一测定条件下的最大反应速度(以单位时间内的氧消耗表示)及达到这一速度所需底物浓度与甲醇的比较。

从上表可见,各基质的最大反应速度及相应的基质浓度均与甲醇有很大差异,可以明确地区分(图 1 曲线 B 表示甲醇及葡萄糖反应速度的差异在耗氧曲线上的直观反应)。

讨 论

如前所述,用传统的化学法测定甲醇,操作繁琐,显色缓慢,成色不稳定,而且测定范围局限性大。本文报道的微生物氧吸收法正好克服了上述缺点。首先是方法快捷,在细胞悬液制备好后,十几分钟内即可获得测定结果。其次是反应直观,起迄明显,易于判断。尤为重要的是测定范围的样品浓度下限可达 10mg/L (反应杯中的浓度约 0.6mg/L。如适当调节反应杯中菌液与基质溶液的容积比例,样品浓度下限还可降低),这是一般气相色谱法也难于办到的。从氧吸收法与化学测定法的比较来看,两者对未知样品的测定结果较为接近,这也表明

氧吸收法能够满足化学测定法所能满足的一般要求。我们在用 8502 菌以甲醇为基质发酵生产 PHB 的工作中,应用此法监测发酵罐中的甲醇浓度,效果良好。

对乙醇的测定结果也表明了此法应用于乙醇测定的可能性,可望在有关方面获得应用。例如可用它来测定人体血液中的微量酒精,以检测汽车驾驶员是否酒后开车。

对甲醇及乙醇以外的几种物质的测定表明,8502 菌虽对这些物质有不同程度的氧化作用,但各自的最大反应速度及相应的底物浓度较之甲醇都有明显的差异,从耗氧曲线上可以严格地区分(图 1)。因而这些物质不致成为测定的干扰因素,在含量不高的情况下尤其如此。

除以甲醇和乙醇互为干扰因子外,我们还对甲醛进行了测定。在甲醇-甲醛的混合物中,无法区分出各自的反应,因而它们之间亦会互相干扰,这同化学法一样,是本法的一大缺陷。

此外,在我们的实验条件下,8502 菌液制备后,在 20—30℃ 的室温下静置 72 小时,仍能满足测定需要,并且细胞密度在所用密度的 0.5—3 倍之间,均不影响测定。本法对测定的温度也无严格要求,20—35℃ 之间的任一温度均能获得满意结果。培养细胞可以低温贮存备用。

参 考 文 献

1. 天津轻工业学院等编:工业发酵分析,轻工业出版社,北京,第 59 页,1980 年。
2. 李述信等译:AOAC 分析方法手册,中国光学学会光谱专业委员会出版,第 344 页,1986 年。
3. Shu-jie Zhao and RS Hanson: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(6):1237,1984.