

发酵液中 L-苹果酸批量定量测定研究

吴清平 周小燕 钟瑜 陈素云

(广东省微生物研究所, 广州 510070)

摘要 摸索出发酵液中 L-苹果酸批量定量测定的简单快速方法。该方法为(1)采用微量注射器将发酵液定量点样,在展开剂中进行纸层析;(2)用显色剂喷雾显色;(3)剪下已显色的 L-苹果酸斑,置 5ml 去离子水中洗脱 3 小时;(4)取出 1ml 过滤洗脱液,加入 6ml 96×10^{-2} 硫酸和 0.1 ml 1.0×10^{-2} α -萘酚摇匀;(5)置 100℃ 水浴中加热 60 分钟;(6)冷却后在波长 476nm 处比色测定。

关键词 L-苹果酸测定;L-苹果酸发酵;纸层析

L-苹果酸(以下简称 LMA)是生物体代谢过程中产生的重要有机酸,是国际上公认的一种安全性食品添加剂、调酸剂和保鲜剂,并在医药、化工、印染及建筑材料等方面有着广阔的应用前景^[1,2]。在多种 LMA 生产研究中,目前 LMA 直接发酵法被认为是发展方向。其研究过程中首先碰到的问题是如何快速准确地测定发酵液中的 LMA,而已有的 LMA 测定方法,在 LMA 产生菌选育及发酵工艺研究中,都较难适应大量样品测定的需要^[2,3]。

本文报道采用纸层析使发酵液中 LMA 分离出来,然后利用 α -萘酚作为显色剂,进行 LMA 批量定量测定研究的结果。

材料和方法

(一) 主要试剂

1. 来源: LMA 标准样品为美国 Serva 公司生产的分析纯试剂。柠檬酸、富马酸、琥珀酸、乳酸、 α -酮戊二酸、酒石酸、草酸、硫酸、 α -萘酚及 β -萘酚等为国内生产的分析纯试剂。

2. 配制: 有机酸直接溶于去离子水中配成溶液后使用。 α -萘酚及 β -萘酚直接溶于 96×10^{-2} 的分析纯硫酸中配成溶液待色褪后使用。

(二) LMA 发酵液样品的制备

1. 菌种: 本研究选用的 LMA 产生菌株为

曲霉 LM02 (*Aspergillus* sp. LM02), 为本所分离获得。

2. 培养基配制^[4]。

3. 样品制备方法: 在 250ml 三角瓶中加入 70ml 培养基, 121℃ 下灭菌 30 分钟后, 冷却至常温, 接种 LM02 的孢子, 在摇床上 (转速 200—300r/min, 温度 30—37℃) 培养 140 小时, 然后加入硫酸调发酵液 pH 值至 1.0—1.5, 置 4℃ 冰箱中备用。

(三) 纸层析分离 LMA

用微量注射器取样定量点样于 3 号新华滤纸上, 用热风吹干, 然后置展开剂 (正丁醇: 甲酸: 水 = 8: 1.5: 1) 中进行纸上层析。待层析完成后, 取出层析纸在通风处过夜, 使展开剂完全挥发, 然后用 0.02×10^{-2} 溴甲酚绿 (10 ml 溴甲酚绿溶液加入 0.2ml 10×10^{-2} 氢氧化钠混匀) 喷雾显色。

由于本试验采用剪下的 L-苹果酸显色斑洗脱直接测定, 因此选用了 L-苹果酸与 α -萘酚显色反应干扰极小的溴甲酚绿作为纸层析酸斑显色剂。显色时, 每张 30×30cm 滤纸均匀喷雾 1.0—1.5ml 显色剂, 不会干扰 L-苹果酸含量的比色测定。

本文承蒙广东省微生物研究所陆大京研究员审阅, 深表谢意。

(四) LMA 反应体系的比色测定

波长选择采用 Shimadzu UV-260 紫外分光光度计进行扫描, 吸光度的测定采用 751 紫外分光光度计进行比色。

(五) LMA 液相色谱法测定

采用 Spectra-Physics 高效液相色谱仪测定^[5,6]。

结 果

(一) 显色试剂的选择

通过对多种显色试剂的初筛, 选出 α -萘酚及 β -萘酚做进一步的显色试验。取 1ml 0.518×10^{-2} LMA 标准溶液, 加入 96×10^{-2} 硫酸 6ml 及 1.0×10^{-2} α -萘酚或 β -萘酚 0.1ml, 摇匀后, 在 100°C 沸水中加热 60 分钟, 取出冷却后, 在波长 190—900nm 范围内进行扫描。从图 1 可看出, α -萘酚与 LMA 反应后呈现的颜色在波长 476.0 nm 处有较强的吸收峰 ABS 0.435; β -萘酚与 LMA 反应后呈现的颜色在波长 474.4nm 处有较弱的吸收峰 ABS 0.107。因此选择 α -萘酚作为进一步研究测定方法的显色试剂。

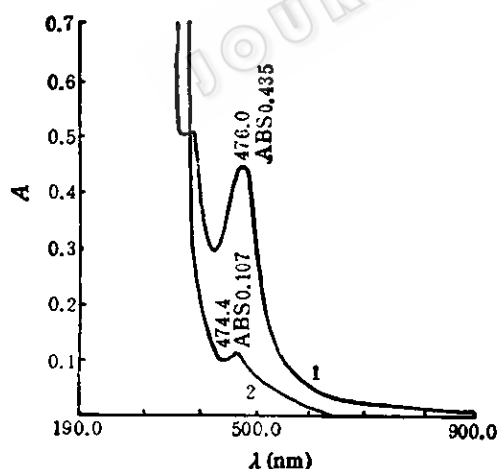


图 1 L-苹果酸和萘酚反应后的吸收曲线

1. α -萘酚; 2. β -萘酚

(二) 影响显色的因素

对颜色形成影响的因素包括加入反应体系中的 LMA、水、 α -萘酚、硫酸及加热时间等。

在进行优化显色条件的试验中, LMA 采用三个不同含量(20.7、41.4 及 $82.9 \mu\text{g}$), 反应体系的加入体积控制在 7.1ml。 96×10^{-2} 硫酸加入体积 (ml) 为 7.1ml - (LMA + 水 + α -萘酚) ml。显色反应在 100°C 水浴中进行, 冷却后在波长 476nm 处比色测定。

1. 水含量: 每个显色反应加入 $1.0 \times 10^{-2} \alpha$ -萘酚 0.1ml, 在 100°C 水浴中加热 60 分钟。

从图 2 可看出, 水含量对显色的影响很大, 在反应体系中较好的水含量为 1.0ml。

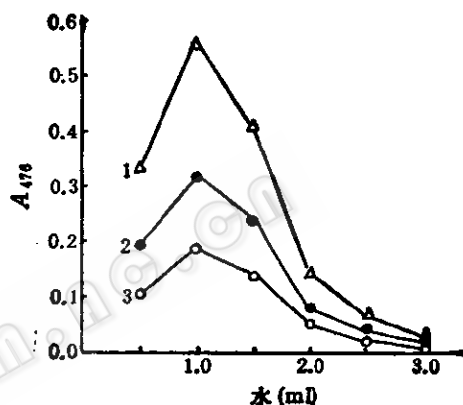


图 2 水含量对显色的影响

L-苹果酸: 1. 82.9; 2. 41.4; 3. 20.7

2. α -萘酚含量: 每个显色反应水含量 1.0 ml, 在 100°C 水浴中加热 60 分钟。从图 3 可看出, 反应中体系颜色随 α -萘酚含量的不同而有所不同, 在三个不同 LMA 含量的反应体系

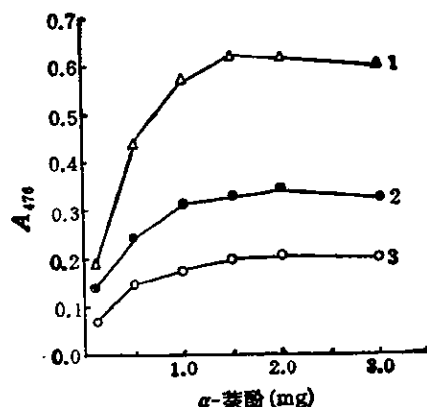


图 3 α -萘酚浓度对显色的影响

L-苹果酸: 1. 82.9; 2. 41.4; 3. 20.7

中,加入 1.0mg α -萘酚比较合适。

3. 加热时间: 每个显色反应水含量 1.0ml, α -萘酚含量 1.0mg。从图 4 可看出, 反应体系的颜色随加热时间的延长而不断加深, 较适宜的加热时间为 60 分钟。

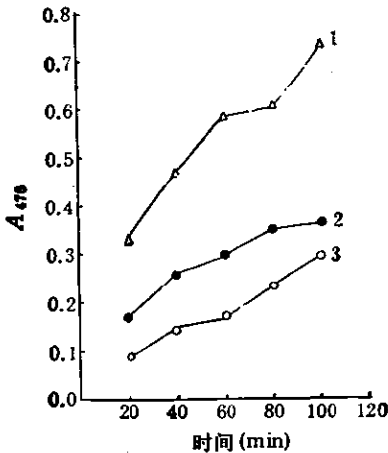


图 4 加热时间对显色的影响
L-苹果酸: 1. 82.9; 2. 41.4; 3. 20.7

(三) 反应体系颜色稳定性的测定

反应体系颜色稳定时间的长短直接影响到测定的精确度, 通过对三个不同含量的 LMA 反应体系的测定, 发现加入水 1.0 ml、 96×10^{-2} 硫酸 6.0 ml 及 1.0×10^{-2} α -萘酚 0.1ml 后, 在 100℃ 水浴中加热 60 分钟后的这种反应体系的颜色至少在 24 小时以内是稳定的 (表 1)。

(四) LMA 发酵中常见有机酸对反应体系的干扰情况

在 LMA 发酵过程中, 常常伴随着少量其它有机酸的产生, 它们对 LMA 与 α -萘酚反应的干扰程度, 对测定的结果有直接影响。为了测定这种干扰程度, 在每个显色反应体系中加入 51.8 μ g LMA 和 250 μ g 其它有机酸。从表 2 可看出, 在上述已选出的反应体系中, LMA 与 α -萘酚的显色反应特异性较高。草酸对显色没有干扰, 富马酸、琥珀酸及 α -酮戊二酸对显色干扰较小, 使吸光度 ABS 上升值均在 10×10^{-2} 以下。柠檬酸对显色亦干扰较小, 使吸

表 1 L-苹果酸与 α -萘酚反应后形成颜色的稳定性

L-苹果酸 (μ g)	时间 (h)			
	0	1	5	24
	吸光度 (476nm)			
20.7	0.164	0.162	0.167	0.165
20.7	0.162	0.165	0.164	0.167
41.4	0.294	0.290	0.289	0.293
41.4	0.291	0.295	0.294	0.295
82.9	0.577	0.582	0.581	0.576
82.9	0.579	0.581	0.577	0.579

表 2 L-苹果酸存在下各种有机酸与 α -萘酚的反应

其它有机酸	吸光度(476nm)	干扰(10^{-2})
空白	0.358	—
柠檬酸	0.328	-8.38
草酸	0.356	0.01
α -酮戊二酸	0.366	2.22
琥珀酸	0.381	6.42
富马酸	0.392	9.50
酒石酸	0.816	127.93
乳酸	1.069	198.60

光度下降 8.38×10^{-2} 。但乳酸及酒石酸则对显色的干扰较大, 使吸光度 ABS 上升 100—200 $\times 10^{-2}$ 。

(五) LMA 标准曲线的建立

在配好不同浓度的 LMA 标准样品后, 用微量注射器取样定量点样于 3 号新华滤纸上进行纸层析分离。然后各自剪下显色酸斑, 置 5.0ml 去离子水中洗脱 3 小时后, 取 1.0ml 过滤洗脱液, 加入 96×10^{-2} 硫酸 6.0 ml、 1.0×10^{-2} α -萘酚 0.1ml, 摇匀后置 100℃ 水浴中加热 60 分钟, 冷却后在波长 476 nm 处比色测定。

从图 5 可看出, 反应体系中 LMA 含量在 0—100 μ g 内, 其浓度与颜色成正比, 具有很好的相关性。因此, 采用纸上层析分离 LMA, 然后利用 α -萘酚作显色剂, 在特定的反应体系中就能准确地测出 LMA 的含量。

(六) 发酵液中 LMA 含量的测定

采用上述建立 LMA 标准曲线的批量法, 以及液相色谱法测定发酵液中 LMA 含量的结

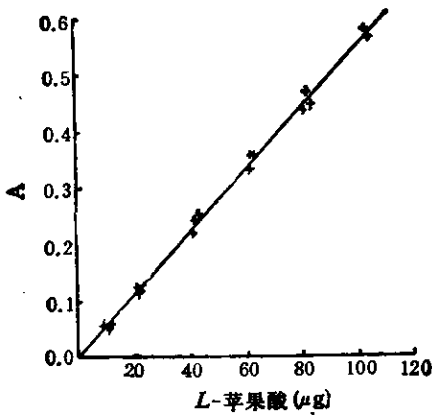


图 5 LMA 的标准曲线

表 3 发酵液中 L-苹果酸含量的测定

测定号	L-苹果酸含量(g/L)	
	批量法	液相色谱法
1	54.8	57.3
2	56.2	57.8
3	56.6	57.7
4	56.4	58.4
5	54.9	59.1
6	55.5	56.9
7	55.8	57.6
平均值	55.7	57.8

果(表 3)表明,批量法与液相色谱法一样,具有较好的重现性,且这两种测定方法的结果极为相近。

讨 论

在 LMA 的测定方法中,Goodban 等建立的 2,7-萘二酚法较为经典,为许多人所接受。

但其分离样品中的 LMA 采用柱层析的方法,应用起来比较麻烦,耗工费时,而且这种方法的显色反应的吸收峰在波长 395nm 处,不能用肉眼直观辨别出反应体系中 LMA 含量的高低^[3]。而采用本研究建立的方法,发酵液中的 LMA 用纸层析分离,应用起来比较简便省事,且这种方法的显色反应的吸收峰在波长 476nm 处,可直观辨别出反应体系中 LMA 含量的大致高低。

随着分析仪器的迅速发展,液相色谱法广泛应用于 LMA 的测定,此法自动化程度高、重现性较好,单个样品的测定可在短时间内完成。但若测定大批样品,液相色谱法除了显得费时外,色谱分离柱亦很快失效,需重新更换,很不经济^[5,6]。采用本研究建立的方法,不但在一段时间内可对大批样品进行定量测定,而且操作简便、成本很低、反应体系颜色稳定时间长、重现性好,能广泛地应用于发酵液中 LMA 含量的分析测定,可在 LMA 产生菌选育及发酵工艺研究中发挥重要的作用。

参 考 文 献

1. Battat E et al.: *Biotechnology and Bioengineering*, 37: 1108—1116, 1991.
2. 吴清平等: *微生物学通报*, 17(1): 30—33, 1990.
3. Goodban A E et al.: *Anal. Chem.*, 29(2): 283—287, 1957.
4. Shimazaki T et al.: *J. Brew. Soc. Japan*, 80 (10): 677—681, 1985.
5. 李明光: 高效液相色谱法及其在食品分析中的应用, 北京大学出版社, 北京, 第 161 页, 1988 年.
6. Hsiao-Tsuloh W et al.: *Journal of General Microbiology*, 130: 1051—1059, 1984.

RESEARCH ON BATCH QUANTITIVE DETERMINATION OF L-MALIC ACID IN FERMENTATION LIQUOR

Wu Qingping Zhou Xiaoyan Zhong Yu Chen Suyun

(Microbiology Institute of Guangdong, Guangzhou 510070)

A simple and rapid method was established for the determination of the content of L-malic acid in fermentation liquor. This procedure includes six steps: (1) Use a microi-

njector to inject the fermentation liquor quantitatively on the filter paper, then use the chromatography solution (n-butanol: formic acid: water=8:1.5:1) for paper chromatography. (2) Atomize the display reagent (10ml 0.02×10^{-2} bromocresol green: 0.2ml 10×10^{-2} sodium hydroxide) on the chromatography paper. (3) Scissor off L-malic acid spots from the paper and put in into 5 ml distilled water for three hours. (4) In 1 ml eluent, add 6 ml 96×10^{-2} sulphuric acid and 0.1ml 1.0×10^{-2} α -naphthol.(5) Heat the reaction system in 100°C water for sixty minutes. (6) After cooling determine the optical density at the wavelength 476 nm in the colorimeter.

Key words Determination of L-malic; L-Malic acid fermentation; Paper chromatography