

发酵液中

L-精氨酸定量检测方法的研究

(江南大学食品学院国家教育部功能食品工程研究中心, 无锡 214036) 郝刚 钱和

摘要: 确立了用甲萘酚-双乙酰法定量检测发酵液中 L-精氨酸的最佳条件: 40g/L NaOH 溶液、80g/L 甲萘酚正丙醇溶液、0.5mL/L 双乙酰正丙醇溶液各 1mL 作为显色液, 再加入 1 μ L 适当稀释的发酵液, 30 $^{\circ}$ C 水浴加热 15min 后测其 OD₅₄₀ 值。对显色反应的稳定性及检测方法的重现性也进行了研究。

关键词: L-精氨酸, 发酵液, 定量检测

Abstract: In this paper, the optimal conditions for quantitative determination of L-arginine in fermentation broth were established: 1 mL of 40g/L NaOH, 80g/L 1-Naphthol-propanol and 0.5mL/L Diacetyl-propanol was added sequentially as the indicator, then 1 μ L of appropriately diluted broth was added. The mixture was incubated in a water bath at 30 $^{\circ}$ C for 15 minutes, and then its OD value was measured at 540nm. The stability of this reaction and the reproducibility of this method were also studied.

Key words: L-arginine; broth; quantitative-determination

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2005)02-0184-03

L-精氨酸是合成蛋白质和肌酸的重要原料, 是人和动物体内的半必需氨基酸, 在医药和食品工业上具有广泛用途^[1]。L-精氨酸-L-谷氨酸盐还作为忌钠患者的调味品, 以 L-精氨酸为原料制备的阳离子表面活性剂具有抗菌性强, 毒性低等特点, 是食品、化妆品等的优良防腐剂。此外, L-精氨酸还作为饲料、食品等的添加剂。目前, L-精氨酸的生产很多是通过发酵进行的, 因而对发酵液中 L-精氨酸的测定有着相当重要的意义。建立一种简单、快速而又有效的检测方法, 对筛选出产酸高、具有优良性状的菌种也是必要的。本文针对类似的文献^[2-4]报道, 就发酵液中 L-精氨酸定量检测的甲萘酚-双乙酰法进行

了研究。

1 材料与方法

1.1 显色液^[5]

40g/L NaOH 溶液, 80g/L 甲萘酚正丙醇溶液和 0.5mL/L 双乙酰正丙醇溶液。

1.2 显色步骤

在试管中依次加入 NaOH 溶液、甲萘酚正丙醇溶液和双乙酰正丙醇溶液各 1mL, 再加入 1 μ L 试样。震荡摇匀, 水浴加热一定时间后测反应液的 OD 值。

2 实验结果

精氨酸中的侧链胍基在碱性介质中与甲萘酚和双乙酰的混合液能够反应生成紫红色的物质^[6](如图 1), 且此物质的 OD 值在一定范围内与 L-精氨酸浓度呈线性关系^[7]。根据此原理, 本文采用分光光度计检测不同浓度精氨酸反应时产物的 OD 值, 绘制 L-精氨酸浓度与 OD 值之间的标准曲线, 从而得到待测液中精氨酸的含量。在实验中发现, 用此方法测定 L-精氨酸含量, 受显色剂浓度、水浴时间、水浴温度等条件的影响较大。

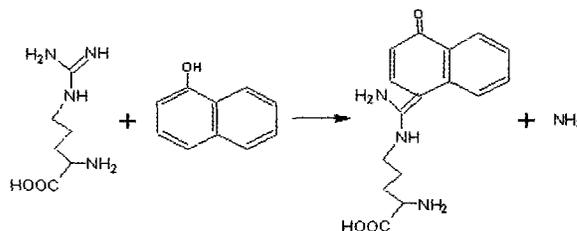


图 1 L-精氨酸与甲萘酚的反应

2.1 测定波长的确定

用 TU-1900 型分光光度计对精氨酸与显色液的紫红色反应液进行光谱扫描, 如图 2 所示, 在 540nm 处的吸光值最大。因此, 以 540nm 作为反应液的测定波长。

收稿日期: 2004-07-22

作者简介: 郝刚(1978-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物技术
在食品科学中的应用。

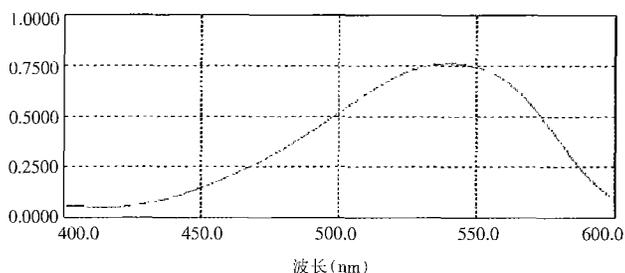


图2 反应液的光谱扫描图

2.2 显色条件的确定

据文献[8]报道,显色条件为 140g/L NaOH 溶液、40g/L 甲萘酚正丙醇溶液、0.2mL/L 双乙酰正丙醇溶液,40℃水浴加热 10min,室温冷却 5min,L-精氨酸标准溶液浓度为 30g/L。但在此条件下的显色效果并不佳。本试验针对此显色条件作了进一步的研究。

2.2.1 NaOH 溶液浓度的确定 NaOH 溶液浓度对显色的影响如图 3 所示,OD 值在浓度 40g/L 时达最大。当 NaOH 溶液浓度超过 100g/L 时,反应液开始出现分层现象,颜色上层浅下层深,这更加影响了测定的结果。因此,NaOH 溶液浓度最后确定为 40g/L。

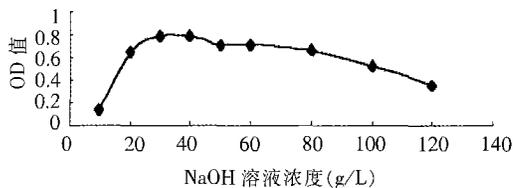


图3 NaOH 浓度与 OD 值的关系

2.2.2 甲萘酚正丙醇溶液浓度的确定 甲萘酚浓度对显色的影响如图 4 所示,当浓度增加到 80g/L 时,OD 值达到最大,此后再增加甲萘酚的浓度,OD 值也没有太大变化。在浓度较小时,测得的数据相差很大,说明反应液不稳定,反应不完全。最后确定甲萘酚浓度为 8g/L。

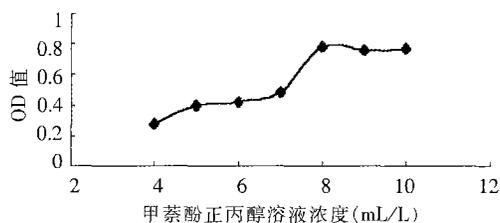


图4 甲萘酚浓度与 OD 值的关系

2.2.3 双乙酰正丙醇溶液浓度的确定 双乙酰浓度对显色的影响如图 5 所示,当增加到 0.5mL/L 时,OD

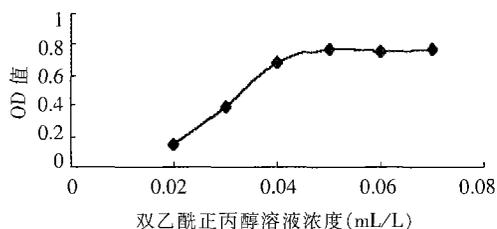


图5 双乙酰浓度与 OD 值的关系

值达到最大值,之后再增加浓度,OD 值的变化不大。在浓度很低时,依然存在数据不稳定、相差太大的现象。最后确定双乙酰浓度为 0.5mL/L。

2.2.4 水浴温度对显色的影响 在碱性条件下,精氨酸与显色液在室温下震荡摇匀后就能显出颜色,但显色反应时间较长,颜色也不稳定。水浴加热可以较快得到稳定的 OD 值,结果如图 6 所示,温度在 35℃后就开始迅速下降。但考虑到夏天室内温度较高的缘故,水浴温度以 30℃为准。

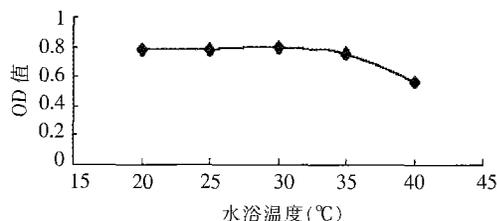


图6 水浴温度对显色的影响

2.2.5 显色时间对显色的影响 显色随时间的变化如图 7 所示,在 10~20min 期间 OD 值稳定且最高。这是因为随着时间的延长,反应渐趋完全、彻底。但时间太长,OD 值也会呈现下降的趋势。因此,确定显色时间为 15min。

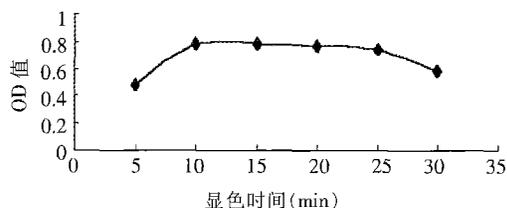


图7 显色时间对显色的影响

2.3 显色反应稳定性的研究

对显色反应稳定性的研究如图 8 所示,用分光光度计对反应液进行时间扫描,在 30min 以内,处在室温下的反应液的 OD 值随时间的变化非常小,说明此反应液是很稳定的,同时也说明显色后的反应液受温度的影响不大,没有必要在水浴显色后进行冷却。

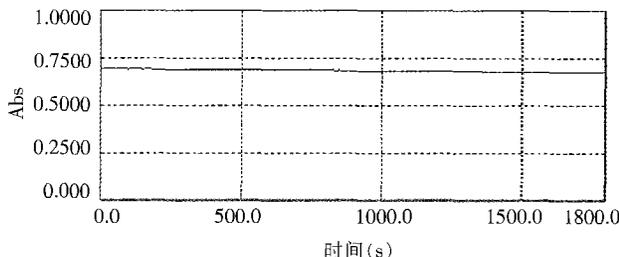


图8 反应液的时间扫描图

2.4 L-精氨酸标准曲线的测定

将上述实验确定的最佳显色条件作为实验条件,测定 L-精氨酸的标准曲线如图 9,得到其直线回归方程为 $y=0.2681x-0.0006$, R^2 为 0.9997。由此可见,

在上述确定的显色条件下测得的 OD 值与精氨酸的含量呈较明显的线性关系。

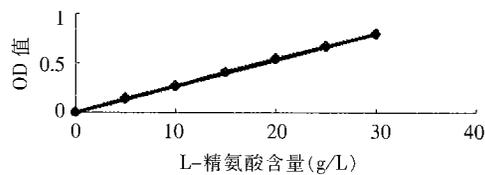


图9 L-精氨酸的标准曲线

2.5 方法的重现性研究

上述方法的重现性对于准确测定 L-精氨酸来说是十分重要的。本实验进行了五次平行测定,根据每次测定的标准曲线的斜率 k 计算出标准偏差 S ,如表 1 所示,标准偏差 S 为 0.0038,说明这种检测方法的重现性较好,能用于 L-精氨酸的定量测定。

表1 标准曲线斜率的标准偏差

L-精氨酸 含量(g/L)	测定次数				
	1	2	3	4	5
0	0	0	0	0	0
5	0.136	0.123	0.144	0.153	0.118
10	0.261	0.248	0.273	0.268	0.271
15	0.399	0.394	0.423	0.438	0.367
20	0.542	0.539	0.545	0.535	0.531
25	0.674	0.664	0.671	0.687	0.655
30	0.799	0.774	0.764	0.801	0.781
斜率 k	0.2681	0.2639	0.2584	0.267	0.2626
\bar{k}			0.264		
标准偏差 S			0.0038		

2.6 发酵液中 L-精氨酸的测定

2.6.1 测定步骤 将发酵液离心沉淀菌体和 CaCO_3 等固形物,并稀释至浓度为 5~30g/L,在确定的显色条件下测其 OD_{540} 值。

2.6.2 精氨酸含量的计算 由测得的 OD_{540} 值,根据曲线方程和稀释倍数即得发酵液中 L-精氨酸的含

(上接第 171 页)

反应 30min,油酸乙酯转化率可过 45%;反应 1h,油酸乙酯转化率可达 93%;此后延长反应时间,油酸乙酯转化率只稍有增加,反应 5h,转化率可达 95%。

3.4 在最适反应条件下进行转酯化反应,当蔗糖八乙酸酯与油酸乙酯的物质的量之比为 1:1 时,主要生成产物是蔗糖八乙酸酯中有一个乙酰基被油酸酰基取代;原料配比为 1:2 时,主要产物是蔗糖八乙酸酯中有两个乙酰基被油酸酰基取代;原料配比为 1:3 时,主要产物是蔗糖八乙酸酯中有三个乙酰基被油酸酰基取代,另有部分产物是二取代产物;原料配比为 1:4 时,主要产物是蔗糖八乙酸酯中有三个乙酰基被油酸酰基取代,另有少量二取代产物。

参考文献:

量。同时取两份发酵液样品,用氨基酸自动分析仪进行定量分析,由上述所确立的测定条件下得出的两个结果比由氨基酸自动分析仪得出的结果相应的低 1.7g/L 和 1.1g/L。这说明在此测定条件下定量测定 L-精氨酸较准确可靠。

3 结论

在 L-精氨酸的定量检测实验中,确立了最佳检测条件为 40g/LNaOH 溶液、80g/L 甲萘酚溶液、0.5mL/L 双乙酰溶液各 1mL 作为显色液,加入离心并适当稀释的发酵液 1 μ L,30 $^{\circ}$ C 水浴加热 15min 后测 OD_{540} 值。此方法非常灵敏,检测迅速,重现性和准确性都较好,并且测定条件较简单,受外界影响很小,作为实验室中精氨酸的定量检测很合适。

参考文献:

- [1] 路志强,龚建华.L-精氨酸产生菌诱变育种的研究[J].微生物学报,1988,28(2):131~135.
- [2] 王妙虎,王京华.L-精氨酸测定方法的研究[J].上海科技大学学报,1989(2):94~98.
- [3] Rosenberg, H, Ennor, A H, Morrison, J F. Chem[J],1955, 63:153~159.
- [4] Block R T, et al. A manual paper chromatography and paper electrophoresis[M]. New York Academic Press,1955.
- [5] 北京师范大学生物系生化教研室编.基础生物化学实验[M].北京:高等教育出版社,1994.
- [6] 蒙绮芳,赖碧清,等.L-精氨酸测定方法的研究[J].氨基酸和生物资源,1998,20(3):1~4.
- [7] 张楚富.猪毛水解液中精氨酸含量测定(氨基酸学术论文集)[M].武汉:武汉大学出版社,1983.
- [8] 伍时华,俞海青,等.发酵液 L-精氨酸测定的研究[J].发酵科技通讯,2001,30(4):12~15.

- [1] 张卫,孙乃有,李建英.无溶剂法合成蔗糖酯的工艺研究[J].食品科技,2003(4):68~70.
- [2] 章亚东,高晓蕾,蒋登高,刘诗飞,王自健.无溶剂法合成蔗糖硬脂酸酯的工艺研究[J].高等化学工程学报,2002,16(5):519~523.
- [3] 谢德明,高大维,郑建仙.相转移催化合成蔗糖聚酯研究[J].中国油脂,1998,23(4):60~61.
- [4] 李延科,张淑芬,杨锦宗.蔗糖酯的酶催化区域性合成[J].有机化学,2003,23(8):770~775.
- [5] Manuel Ferrer, M Angeles Cruces, Manuel Bernabe, Antonio Ballesteros, Francisco J Plou. Lipase-Catalyzed Regioselective Acylation of Sucrose in Two-Solvent Mixtures [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999,65(1):10~16.
- [6] 刘运凤,吾满江·艾力,文彬.八乙酸蔗糖酯的合成工艺研究[J].日用化学工业,2002,32(6):20~22.