

发酵液中纳他霉素的快速测定

郑凤娥¹, 张燕维², 魏宝东¹, 孟宪军^{1*}

(1. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110161; 2. 阜新双汇食品有限公司)

摘要 采用紫外分光光度计快速测定发酵液中的纳他霉素产量,以5%冰乙酸的甲醇溶液为提取剂提取发酵液中的纳他霉素,紫外检测波长为303nm。实验表明,回收率为99.6%以上。该方法简单、快速、准确。

关键词 紫外分光光度计法,纳他霉素发酵液,纳他霉素

中图分类号: TS207.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2005)06-0170-02

纳他霉素(Natamycin)别名匹马菌素(Pimaricin),游链霉素,它主要是恰塔努加链霉菌(*Streptomyces chattanovgensis*)、纳塔尔链霉菌(*Streptomyces natalensis*)和褐黄孢链霉菌(*Streptomyces gilvosporeus*)产生的多烯大环内酯族的抗菌物质^[1],其分子式为 $C_{38}H_{47}NO_{13}$,分子量为665.7。1997年3月,我国正式批准纳他霉素作为食品防腐剂。纳他霉素作为食品防腐剂,既可以抑制各种霉菌、酵母菌的生长,也能抑制真菌毒素的产生。对发酵液中纳他霉素产量的快速测定是分析、控制和改进发酵工艺过程的有效手段。本文对用紫外分光光度计法快速测定发酵液中的纳他霉素进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

菌种 褐黄孢链霉菌 *S.gilvosporeus* JCM4795;发酵培养基(%) 大豆蛋白胨 1.95,酵母浸粉 0.40,糊精 3.6, pH7.6;甲醇、冰乙酸 分析纯,蒸馏水,纳他霉素。

UV-1100型紫外分光光度计 北京瑞丽分析仪器有限公司;HZQ-F全温振荡培养箱 哈尔滨东明医疗仪器厂;TGL-16C型台式高速离心机。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵条件 取浓度为 10^8 个/mL的孢子悬液10mL,接种于装有20mL种子培养基的250mL三角瓶中,29℃,200r/min振荡培养26h,使菌体处于迅速生长期。然后以2%的接种量将种子液接种于装有30mL发酵培养基的250mL三角瓶中,29℃,200r/min

回转式空气摇床发酵144h,待测。

1.2.2 样品处理 取1mL发酵液于刻度试管中,加入5%冰乙酸的甲醇提取试剂9mL,充分摇匀试样,振荡器充分振荡后10000r/min离心15min,除去菌丝体及培养基中杂质,所得上清液再用提取试剂适当稀释后即待测液。

1.2.3 标准溶液 准确称取0.01g纳他霉素,用灭菌后的发酵培养基溶解后转移到100mL容量瓶中,再定容至100mL,配成纳他霉素标准使用液,然后进行稀释,分别配成1、2、3、4、5、6、7、8mg/L的标准溶液。

1.2.4 参比溶液 以灭菌后的发酵培养基按比例加入提取试剂,同样品处理后,做空白溶液,然后进行测定。

1.2.5 检测条件 用紫外分光光度计在波长200~350nm范围内进行波长扫描测量,在最大吸收波长303nm处测定发酵液的吸收峰值。

1.2.6 定性测量 处理好的发酵液在波长200~350nm范围内进行波长扫描,将图谱与霉克水溶液的紫外扫描图谱进行对照。

1.2.7 定量测定 样品经过处理后在303nm处测定其吸收峰值,根据303nm处的吸光度值及所做出的标准曲线进行定量。

2 实验结果

2.1 发酵液中纳他霉素提取试剂的确定

根据纳他霉素在相关溶剂中溶解度(表1)和相关文献报道,试验了以下几种提取试剂:甲醇(pH6.8)、冰乙酸+水(5+40)、甲醇+水+冰乙酸(60:40:5)、甲醇+0.1%冰乙酸(pH4.4)、甲醇+1%冰乙酸(pH3.4)、甲醇+5%冰乙酸(pH2.7)、甲醇+10%冰乙酸(pH2.3)对纳他霉素的提取效果。结果表明,以含5%

表1 纳他霉素在各种溶剂中的溶解度

溶剂	溶解度(g/100mL)
水	0.005~0.01
乙醇	0.01
丙二醇	1.4~2.0
丙三醇	1.5
冰乙酸	18.5

收稿日期: 2004-12-09 * 通讯联系人

作者简介: 郑凤娥(1979-),女,研究方向:食品微生物发酵。

冰乙酸的甲醇溶剂作为提取试剂,发酵液的杂质清除效果好,扫描图谱显示干扰少,纳他霉素提取率高,活性保存时间长。

2.2 霉克水溶液及发酵液中纳他霉素的紫外扫描图谱

将用 5%冰乙酸甲醇溶剂提取的发酵液中纳他霉素的扫描图谱与霉克水溶液的紫外扫描图谱进行对照,二图谱的吸收峰在 295、303 和 318nm 处吻合,且在特征吸收峰处均无杂峰干扰,见图 1 和图 2。

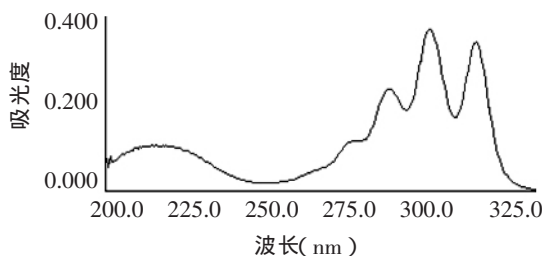


图 1 霉克水溶液的紫外扫描光谱图

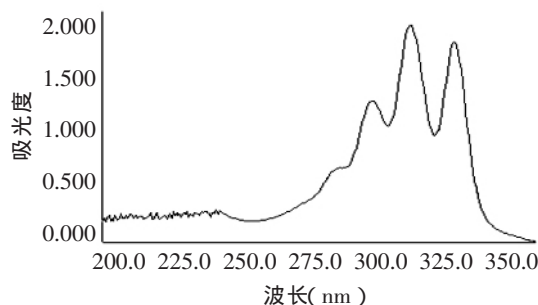


图 2 发酵液中纳他霉素紫外扫描光谱图

2.3 定量计算方法

采用标准曲线法(一点法),选 303nm 处的吸光度值与样品浓度做标准曲线。

2.4 标准曲线

以各标准溶液的浓度为横坐标,303nm 处的吸光度 A 为纵坐标,绘制吸光度 A 与浓度 C 的关系曲线,结果见图 3,求得线性回归方程为 $Y=0.1066X-0.0069$ 。 $R^2=0.9993$ 说明本方法在 1~8mg/L 范围内线性关系良好。

2.5 回收率和精密度实验

取处理后的发酵液作为样品,分成 3 份,1 份作为本底值,另 2 份添加已知质量浓度的标准液,分别测出纳他霉素在样品中的含量,再根据检测量计算出纳他霉素的回收率,结果见表 2。实验表明,回收率超过 99.6%,RSD 分别为 0.38%和 0.42%。

2.6 样品中纳他霉素测定结果

对 5 批发酵液进行测定,测得的纳他霉素的质量浓度分别为 0.27、0.35、0.33、0.38、0.41g/L。

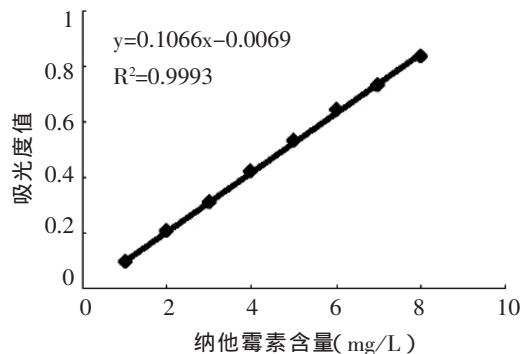


图 3 纳他霉素测定标准曲线

3 结束语

已经报道的纳他霉素检测方法有分光光度计法、比色分析法、元素分析法、微生物分析法、色谱分析法和 HPLC 法等,纳他霉素的分析干扰因素很多,各种方法各有优缺点。目前常用的检测方法主要有三种:生物检测法、HPLC 法和紫外分光光度计法。生物检测法被国际公认,但该方法操作繁琐,对实验条件及操作水平要求较高,测定周期较长,不够快捷方便。HPLC 法对样品处理要求较高,条件要求严格。紫外分光光度计法作为实验室的常规对照方法,标准品选用霉克即可,因其复合物在纳他霉素吸收波长处无吸收值,故不需要纯品,同时样品处理简单,方便快捷,准确度较高,是一种比较理想的快速定性定量检测方法。

参考文献:

- [1] 陈晓丽,吕振岳,等.新型天然食品防腐剂纳他霉素的研究进展[J].食品研究与开发,2002,23(8):23~25.
- [2] M A 艾森申克,等.通过控制发酵培养基的 pH 以提高纳他霉素的生产速度[P].CN1072959A,1993,6.
- [3] 陈冠群,季波.纳他霉素的特性及应用[J].中国乳品工业,2002,30(4):26~28.
- [4] 李东,李颖辉,等.纳他霉素分析方法的研究进展[J].中国食品添加剂,1999(1):1~3.
- [5] 王克利,等.HPLC 法测定沙拉酱及干酪中纳他霉素含量方法的研究[J].中国卫生检验杂志,1998,6(8):380~381.
- [6] 袁亦丞.纳他霉素[J].中国食品用化学品,1997,3(1):37~41.
- [7] 周艳明.现代农业分析科学与技术[M].吉林科学技术出版社:沈阳农业大学仪器分析中心,2002.8~36.
- [8] 陈冠群,杨东靖,杜连祥.反相高效液相色谱法测定发酵液中的纳他霉素[J].天津轻工业学院学报,2003,18(1):9~11.
- [9] 食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2002.25~37.
- [10] Harry Brik.Natamycin. In Analytical Profiles of Drug Substances[M].New York:Academic Press,1994.514~557.

表 2 纳他霉素回收率结果(n=5)

本底值(mg/L)	加入值(mg/L)	实测值与本底值之差(mg/L)					平均回收率(%)	精密度 RSD(%)
0.350	0.100	0.0992	0.1004	0.0996	0.1013	0.1009	100.1	0.38
0.350	0.200	0.1988	0.2005	0.2013	0.1996	0.2008	99.1	0.42