

发酵液中L-精氨酸的检测方法

贺小贤, 孙莹, 陈合

(陕西科技大学, 陕西 咸阳 712081)

摘要:目的 建立发酵液中L-精氨酸的定量检测方法。方法 用坂口试剂(α -萘酚和2,3-丁二酮)定量测定L-精氨酸的含量。结果 最佳测定波长为525 nm, 显色反应温度为30℃, 反应时间为15 min, NaOH浓度为15 g/L。该方法具有较高稳定性和重复性。结论 本方法可对发酵液中L-精氨酸进行定量测定。

关键词: 发酵液; L-精氨酸; 检测方法

中图分类号: Q517

文献标识码: A

文章编号: 1672-979X(2007)01-0018-03

Study on Determination Method of L-Arginine in Fermentation Broth

HE Xiao-xian, SUN Ying, CHEN He

(Shaanxi University of Science and Technology, Xianyang 712081, China)

Abstract: Objective To describe a method for the determination of L-arginine in fermentation broth. **Methods** This paper studied a quantitative determination of L-arginine with α -naphthol and 2,3-Butanedione in detail. **Results** The best results could be achieved with the determination wavelength of 525 nm, color reaction temperature of 30℃, response time of 15 min and 15g/L NaOH. This method had a good stability and reproducibility. **Conclusion** This method can be used for the quantitative determination of L-arginine in fermentation broth.

Key words: fermentation broth; L-arginine; determination method

收稿日期: 2006-09-12

作者简介: 孙莹 (1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物工程

Tel: (0910) 8570149 Email: suny270494920@126.com

温度协同750 MPa的压力处理后还有28.2%的相对活性。所以, 在生产鲜榨梨汁中仅靠高压处理来彻底钝化PPO, 防止酶促褐变是行不通的, 如结合添加防褐变剂、热处理、低温贮藏以及脱气处理等其他手段, 酶促褐变可得到一定程度的控制。保压时间超过30 min实用意义不大。添加维生素C在500 MPa以下对PPO有激活作用, 在600MPa以上或热处理结合高压时有钝化PPO的作用。500 MPa 60℃或750 MPa 50℃以上的处理条件可使鲜榨梨汁中的PPO失去60%以上的活性, 如结合添加防褐变剂、热处理以及脱气处理等手段, 有望解决实际问题, 但压力过高对工业化有一定难度。

参考文献

- [1] 吴卫华. 苹果加工技术[M]. 北京: 轻工业出版社, 2001: 79.
- [2] Pendharkar M B. Process development for production of pure apple juice in natural colour of choice[J]. *J Food Sci Technol*, 2001, 38(6): 587-592.
- [3] Weemaes C, Ludikhuyze L, Van D B, *et al.* High pressure inactivation of polyphenoloxidases[J]. *J Food Science*, 1998, 63(5): 873-877.
- [4] Anh L Q, Francois L, Joseph M. Acceleration of pH variation in cloudy apple juice using electrodialysis with bipolar membranes [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 2160-2166.
- [5] Genovese D B, Elustondo M P, Lozano J E. Color and cloudy stabilization in cloudy apple juice by steam heating during crushing[J]. *J Food Science*, 1997, 62(6): 1171-1175.
- [6] 钟葵, 廖小军, 梁楚霖, 等. 脉冲电场和热处理对鲜榨苹果汁贮藏期品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2004, 8: 49-54.
- [7] Tan B K, Harris N D. Maillard reaction products inhibit apple polyphenoloxidase[J]. *Food Chemistry*, 1995, 53: 267-273.
- [8] 赵光远, 王璋, 许时婴. 浑浊苹果汁加工中苹果PPO热失活条件的研究[J]. 食品科技, 2003, (7): 84-87.
- [9] 赵光远, 王璋, 许时婴. 浑浊苹果汁加工过程中的酶促褐变及其防止的研究[J]. 食品工业科技, 2003, (10): 57-61.

L-精氨酸(L-Arg)中的侧链胍基在碱性介质中可与 α -萘酚和2,3-丁二酮的混合液反应生成紫红色物质,且此物质的吸收度(A)在一定波长范围内与精氨酸浓度呈线性关系。本实验对各种测定条件进行了详细研究,建立了用坂口试剂 α -萘酚和2,3-丁二酮定量测定L-Arg水溶液和发酵液中L-Arg含量的方法。在所选定的最佳测量条件下,得到了理想的结果。

1 材料与方法^[1-4]

1.1 主要仪器与试剂

756G分光光度计(上海光谱);L-Arg(生化试剂);L-Arg显色剂: α -萘酚(50 g/L);2,3-丁二酮-正丙酮溶液(0.002 5 mL/L)。

1.2 测定步骤

25 mL比色管中,加入8 mL NaOH溶液,再加入已知浓度的L-Arg标准溶液1 mL,另在1支对照比色管中加蒸馏水1 mL,然后每管加入L-Arg显色剂1 mL,摇匀,立即水浴显色15 min,取出于室温下(20.5 °C)一定时间内测 $A_{525\text{nm}}$ 值。各试剂用量及显色时间等参数均通过实验确定。

1.3 发酵液中L-Arg的定量测定

发酵液经离心去除菌体,稀释至0~0.1 mg/mL,按上述测定步骤测定 $A_{525\text{nm}}$ 值,按L-Arg含量的计算公式 $X=0.39 \times A \times N$ (N为稀释倍数),计算L-Arg含量。

2 结果与讨论

2.1 NaOH浓度的确定

α -萘酚虽然仅溶于碱性溶液中,但NaOH的浓度过大会使显色剂中 α -萘酚析出,溶液变得浑浊。所以需要确定NaOH浓度,使反应液保持澄清,便于使用分光光度法进行测定。对不同的NaOH浓度进行实验,NaOH浓度对A的影响如图1所示,NaOH浓度在15 g/L时A值最大。因此,确定NaOH浓度为15 g/L。

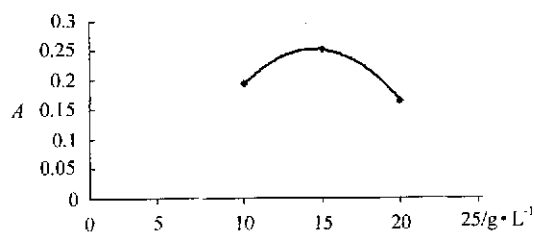


图1 NaOH浓度 - 吸收度曲线

2.2 测定波长的确定

L-Arg与 α -萘酚和2,3-丁二酮的反应液在一定的波长下有最大吸收峰,采用756G分光光度计进行扫描,结果如图2,最大吸收波长为525 nm,因此,采用525 nm作为反应液的测定波长。

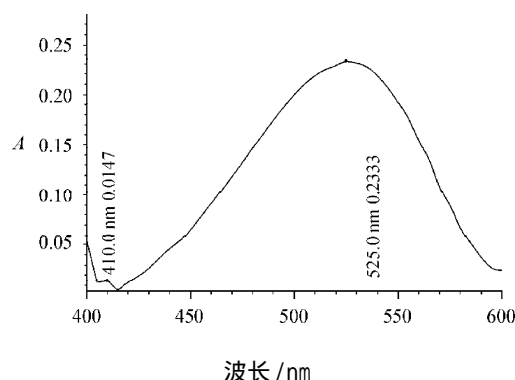
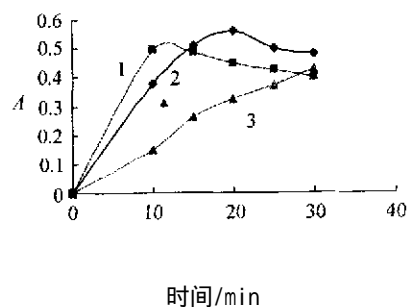


图2 波长 - 吸光度扫描曲线

2.3 反应时间和温度的确定

在碱性条件下,精氨酸显色液在室温下摇匀后就能显色,但显色完全需反应时间较长,颜色也不稳定。水浴加热可以较快的得到稳定的A值。考察了在20, 30, 40 °C时的反应时间与A值的变化关系,结果如图3所示。20 °C反应较慢,40 °C反应10 min后A值开始迅速下降。因此以30 °C作为反应温度较为合适。显色随时间不同而变化,在15~20 min内A值稳定且最高。这是因为随着时间的延长反应逐渐完全,彻底。但时间太长,A值也会呈下降趋势。因此,显色时间可定为15~20 min。采用吸收度达最大的时间作为水浴时间,可能会减少反应所代来的偏差。实验比较了15min和20 min显色时的标准曲线,如图4所示,结果表明,反应时间为15 min时有较好的线性关系。



1. 40 °C; 2. 30 °C; 3. 20 °C

图3 反应温度 - 时间

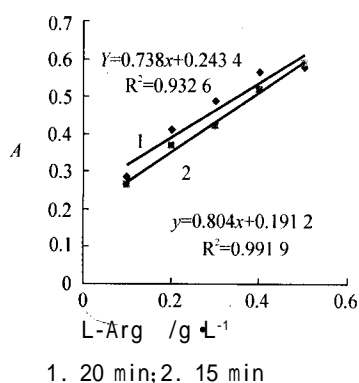


图4 反应温度-标准曲线

2.4 L-Arg标准曲线的测定

按1.2节测定步骤测L-Arg标准曲线,结果如图5。由于发酵液中葡萄糖和硫酸铵对显色反应有一定的影响,因此测定了发酵60 h时发酵液中葡萄糖和硫酸铵含量,结果为葡萄糖约6%,硫酸铵约4%。由于发酵液L-Arg含量测定需稀释100倍进行,因此测定了含0.06%葡萄糖和0.04%硫酸铵的L-Arg溶液标准曲线,结果见图6。比较图5、图6,斜率K值变化不大,所以葡萄糖和硫酸铵对标准曲线的影响较小,此方法可用来定量测定发酵液L-Arg的含量。

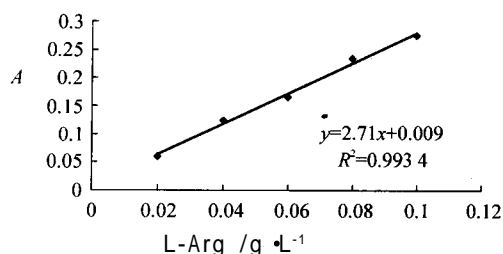


图5 L-Arg标准曲线图

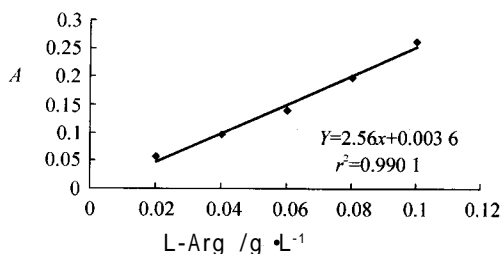


图6 发酵液L-Arg标准曲线图

2.5 显色反应稳定性研究

在一段时间内,用分光光度计对反应液进行扫描,结果见图7,20.5℃条件下,反应液仅变化0.001,1 h内仅变化0.005。说明反应液很稳定。

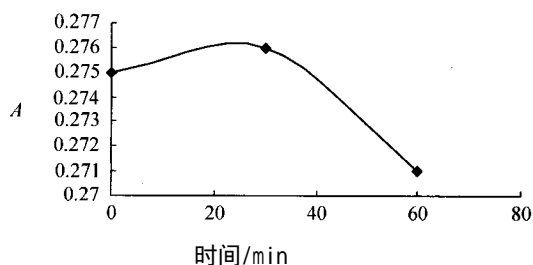


图7 吸光度-时间

2.6 重复性试验

共进行了5次平行测定,实验结果如表1。根据每次测定的标准曲线的斜率K计算出标准偏差S为0.010,说明这种检测方法重复性好,能用于L-Arg的定量检测。

表1 标准曲线的斜率K和标准偏差S

	K_1	K_2	K_3	K_4	K_5	K'	S
标准曲线斜率	2.71	2.69	2.72	2.67	2.68	2.70	0.010

参考文献

- [1] 郝刚,钱和. 发酵液中L-精氨酸的定量检测方法[J]. 加工技艺, 2004, 5 (6): 56-57.
- [2] 蒙绮芳,赖碧清,周锡梁. 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.
- [3] 李瑜,江勇,李爽. 反相高效液相色谱法测定发酵液L-精氨酸含量[J]. 工业微生物, 2004, 34 (3): 32-34.
- [4] 文江平. 芳香族氨基酸的检测进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2002, 23 (6): 359-361.