

毛细管电泳测定乳酸发酵液中有机酸*

唐 萍^{1,2} 田 晶^{1,3} 苑广志^{1,3} 高 鹏¹ 许国旺¹

1(中国科学院大连化学物理研究所国家色谱研究分析中心,大连,116011) 2(大连理工大学化工学院,大连,116021)

3(大连轻工业学院,大连,116034)

摘 要 运用毛细管区带电泳模式,在磷酸缓冲液中成功地分离了苹果酸、甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、草酸 9 种有机酸。研究了缓冲液浓度、pH 值、电泳电压、检测波长等因素对分离的影响,并对实际发酵液进行分析测定,加标回收率为 97.5%~107.1%。该方法简便、快速、准确,适于整个发酵过程条件的优化及发酵产物的监控工作。

关键词 毛细管电泳,发酵液,有机酸,乳酸

微生物发酵过程中有机酸的形成是细胞代谢活动的结果,在发酵过程中,测定这些有机酸的成分及含量对于高产菌株的构建和发酵过程条件的优化进而对于确定菌体内的代谢通量分布都具有重要意义^[1]。

有机酸的分析最早采用纸色谱法及薄层色谱法,它们只是半定量法,而且需要冗长的浓缩和皂化操作来进行大量样品的处理,操作十分繁琐。用气相色谱法测定有机酸,虽然较前 2 种方法大大改进,但样品需要经过衍生化处理才能检测^[2]。液相色谱虽灵敏度较高,但操作麻烦^[3,4]。毛细管电泳^[5~8]是近年来新开发的一种分析技术,该方法具有高自动化、无污染、样品用量少等优点,受到广大分析工作者的喜爱。本实验建立了 1 种毛细管电泳方法,可实现对乳酸发酵液中有机酸的准确测定,且可用于大量样品的在线分析,方法测定时间短,灵敏度高,适于整个发酵过程条件的优化及发酵产物的监控工作。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

仪器:P/ACE MDQ 毛细管电泳仪(Beckman 公司,美国),配有二极管阵列检测器;熔融石英毛细柱:40 cm(有效长度为 37 cm)×50 μm I.D(河北永年光学纤维厂);pHS-25 型酸度计(上海精科仪器);TJL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

试剂:磷酸(大于 85%)(分析纯)、十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)(上海化学试剂公司)、苹果酸、琥珀酸、草酸、柠檬酸、酒石酸、甲酸、乙酸、丙酸、乳酸,以

上各有机酸均为国产分析纯。实验用水为去离子水。

1.2 操作条件

分离电压:负电压,8 kV;压力进样:0.5 psi,时间 6 s;柱温:25℃;紫外检测波长:200 nm;为优于进样,2 次进样之间用 0.5 mol/L NaOH 水溶液冲洗 2 min,再用水冲洗 2 min,最后用磷酸缓冲液冲洗 2 min。

1.3 样品的预处理

将发酵液在 3 000 r/min 下离心 15 min,除去其中的菌体及蛋白大分子,然后用 0.22 μm 的滤膜过滤后直接进样。

1.4 缓冲液配制

配制 500 mmol 磷酸溶液,加入 0.5 mmol 十六烷基三甲基溴化胺(CTAB),用 0.5 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值为 6.25。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

在全波长范围内扫描发现,9 种有机酸在 200 nm 左右都有吸收,为得到均衡的灵敏度,实验中选择 200 nm 为检测波长。

2.2 操作电压的选择

从 6~12 kV 改变电压,9 种有机酸的迁移时间逐渐减少。此外,随着电压的增大,电泳电流增加,各峰峰形变得尖锐,分离效率提高,但产生的焦耳热增多,导致区带增宽,分离度下降。因此选择电压为 8 kV。

2.3 缓冲液浓度对有机酸分离的影响

分别用不同浓度(400、500、600 mmol/L)的磷酸缓冲液对 9 种有机酸进行分离,实验中发现,3 种浓度的缓冲液对迁移时间的影响不大,但当浓度增大为 600 mmol/L 时,9 种有机酸的分离效果不太理想,

* 第一作者:硕士研究生(田晶为本文通讯作者)。

* 国家 973 计划(2003CB716003,2004CB719605)项目及中科院创新基金项目(K2002A12)资助

收稿日期:2005-09-26,改回日期:2005-12-12

苹果酸、甲酸重合在一起,没有分离开,而且柠檬酸在此浓度下没有信号。而在 400 mmol/L 和 500 mmol/L 浓度条件下,9 种有机酸分离较好。因此,实验中选择缓冲液浓度为 500 mmol/L。

2.4 缓冲液 pH 值对有机酸分离的影响

有机酸为弱酸,其 pKa 值大多在 2~6 之间,因此有机酸的有效迁移率的大小在很大程度上取决于缓冲液的 pH 值。在缓冲液 pH 值分别为 5.50, 5.75,6.00,6.25,6.50 的条件下,对 9 种有机酸进行分离,实验发现,pH 值的变化对有机酸分离的影响很大,pH 相差 0.5 就会产生完全不同的分离效果,当 pH 值为 6.25 时,9 种有机酸分离效果比较理想,如图 1 所示。因此,实验中选择 6.25 为缓冲液的最佳 pH 值。

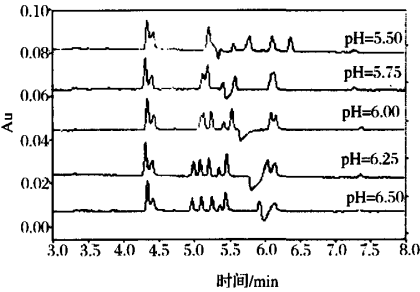
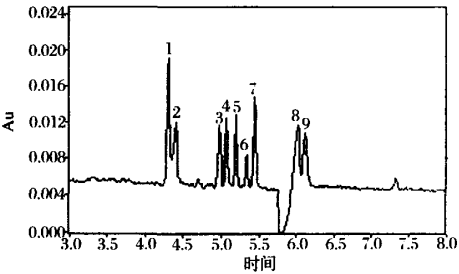


图 1 九种有机酸在不同 pH 条件下的分离谱图

2.5 九种有机酸的分离

在优化的实验条件下,9 种有机酸在 8 min 内得到了较好的分离,分离效果如图 2 所示。



1-苹果酸;2-甲酸;3-琥珀酸;4-草酸;
5-酒石酸;6-柠檬酸;7-乙酸;8-丙酸;9-乳酸。

图 2 九种有机酸标准分离谱图

2.6 定量分析特征

2.6.1 线性范围、检出限、精密度

在 1.2 的操作条件下,以各有机酸的峰面积 A 对浓度 C 进行线性回归,得到各物质的线性回归方程及线性范围、相关系数、检出限见表 1,并将同一样品重复测定 5 次,计算出迁移时间和峰面积标准偏差见表 1。可见无论从定量精度还是灵敏度均可满足要求。

表 1 各有机酸的定量参数

有机酸	线性范围	线性相关方程	r	检出限	RSD/% (n=5)	
					t _R	A
甲 酸	0.020~0.80	A=326 72C+1022	0.999 8	0.012	0.18	2.97
乙 酸	0.020~0.40	A=68 992C+1324.9	0.999 4	0.010	0.23	2.01
丙 酸	0.020~0.40	A=98 079C+1525.7	0.999 9	0.010	0.25	2.56
草 酸	0.025~1.00	A=66 673C+257.46	0.999 8	0.018	0.21	1.91
柠檬酸	0.025~1.00	A=76 281C-606.16	0.999 1	0.010	0.20	4.62
苹果酸	0.025~0.25	A=138 691C+1277	0.999 7	0.010	0.14	2.12
琥珀酸	0.025~1.00	A=60 592C+342.86	0.999 9	0.016	0.20	3.34
酒石酸	0.025~1.00	A=54 569C-457.06	0.999 7	0.018	0.20	2.68
乳 酸	0.020~0.40	A=64 317C+548.64	0.999 4	0.010	0.24	2.11

t_R:迁移时间;A:峰面积;C:浓度,mg/mL。

2.6.2 样品测定及回收率

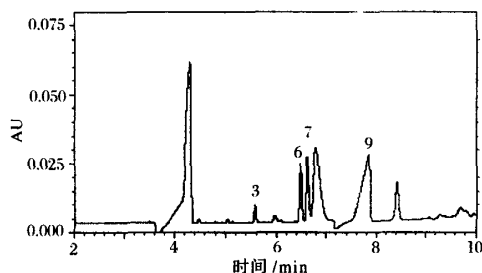
用 48 h 乳酸发酵液为样品,测定其中有机酸成分及含量,乳酸的标准曲线在浓度范围为 1~25mg/mL 时为:Y=25 649X+11 472,R=0.999 5。并用本方法对其进行回收率实验,结果见表 2,48 h 发酵液的毛细管电泳分离谱图见图 3。

研究发现,不同时间段的发酵液采用此法进行检测,谱图均有明显的变化,经加入标准品对比后,在 48 h 乳酸发酵液中可检测到琥珀酸、柠檬酸、乙酸、

乳酸等有机酸。加标回收率范围在 97.5%~107.1%。

表 2 添加有机酸的方法回收率测定结果(n=4) mg/mL

样品组分	样品含量量	加入标准酸量	测得总酸量	回收率/%
琥珀酸	0.04	0.10	0.15	107.1
柠檬酸	0.25	0.10	0.34	97.5
乙 酸	0.23	0.20	0.42	97.8
乳 酸	8.89	2.00	11.14	102.3



3-琥珀酸;6-柠檬酸;7-乙酸;9-乳酸

图3 48 h 乳酸发酵液的电泳谱图

参考文献

- 1 金海如, 诸葛健. 产甘油假丝酵母在丙三醇发酵过程中的有机酸种类及其变化[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(3): 205~208
- 2 天津轻工业学院编著. 工业发酵分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1994. 346~348
- 3 白冬梅, 赵学明, 胡宗定. 应用 HPLC-反相色谱法测定米根霉乳酸发酵液中的有机酸[J]. 工业微生物, 2001, 31: 8~11
- 4 Hang Y D, Hamamci H, Woodams E E. Production of L (+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gels[J]. Biotechnol Lett, 1989, 11(2): 119~120
- 5 Klampfl C W, Wolfgang B, Haddad P R. Determination of organic in food samples by zone electrophoresis[J]. J Chromatography A, 2000, 881: 357~364
- 6 Valdemar I Esteves, Susans S F Lima, et al. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acid in port wine[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 513: 163~167
- 7 Saavedra L, Garcia A. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice[J]. J Chromatography A, 2000, 881: 395~401
- 8 Veronica Galli, Coral Barbas. Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee[J]. J Chromatography A, 2004, 1032: 299~304

3 结论

发酵液经离心等简单的处理后, 采用磷酸缓冲液, 负电压 8 kV, 波长 200 nm 条件下用毛细管电泳进行检测, 实验结果证明, 该方法能将发酵液中的有机酸分离并能准确定量, 该方法具有前处理简单, 分析时间快、灵敏度高等优点, 且能实现大量样品的快速测定, 无论在发酵初期条件的优化还是后期目标产物的测定中都发挥了重要的作用。可用于整个发酵过程条件的优化及发酵产物的监控工作。

Determination of Organic Acid in Fermentation Broth by Capillary Electrophoresis

Tang Ping^{1,2} Tian Jing^{1,3} Yang Guangzhi^{1,3} Gao Peng¹ Xu Guowang¹

1(National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Dalian 116011, China)

2(College of Chemistry, Dalian University of Technology, Dalian 116021, China)

3(Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116034, China)

ABSTRACT The profile of organic acid is investigated by capillary electrophoresis(CE). The nine organic acids (malic acid, formic acid, succinic acid, oxalic acid, tartaric acid, citric acid, acetic acid, propionic acid, lactic acid) of fermentation liquid were well separated by using 500 mmol/L phosphoric acid running buffer. The concentration and pH of the buffer solution, voltage and wave for analytical were investigated in details. The proposed method was applied to the determination of organic acid in fermentation liquid products and the recoveries were in the range of 97.5%~107.1%. This method is simple, rapid, accurate and is suitable for optimizing condition of experiment in the course of ferment and monitoring products of fermentation.

Key words capillary electrophoresis, fermentation liquid, organic acid, Lactic acid

市场动态

2 种新型环保塑料瓶投放市场

Cargill Dow 公司新开发生产了一种以玉米为原料的可分解性塑料聚合乳酸制造的饮料用塑料瓶“BIOTA Brands of Amerca and Natwrrally Works PLA”。由于这种塑料瓶用后不久可自行分解在土壤中, 故对环境保护十分有利。这种新型塑料饮料瓶使用周期短, 是适宜冷罐装充填的透明瓶。该瓶的优点是可以回收, 成为再生资源。最近, 生物分解协会(BPI)已经批准将该瓶用于饮料生产。据 BPI 介绍, 这种生物分解型包装产品在市场上流通使用是安全的, 也是该协会最先批准承认的生物分解型塑料瓶。