

发酵液中色氨酸含量的快速测定*

王 健 陈 宁 徐咏全 杨海军 张克旭

(天津科技大学食品科学与生物工程学院,天津 300222)

摘 要 报道了一种利用分光光度法快速测定发酵液中色氨酸的新方法。该方法基于在硫酸存在下,色氨酸与对二甲氨基苯甲醛缩合生成蓝色化合物,该产物在 600nm 处有吸收峰,对色氨酸测定的范围为 0~100 μ g/mL,工作曲线方程为 $C = 23.56A$, C 为色氨酸, A 为吸光度。相关系数为 $R^2 = 0.9972$ 。

关键词 色氨酸,对二甲氨基苯甲醛,分光光度法

发酵液中 L-色氨酸的测定是发酵法生产色氨酸中不可缺少的步骤,它的定性和定量测定方法有纸层析法、薄层分析、比色法、高效液相色谱法、氨基酸分析仪测定法等^[1~4]。比色法有对二甲氨基苯甲醛比色测定法及荧光测定法等^[2~4]。对二甲氨基苯甲醛是 L-色氨酸的特异性显色剂,在实验室常用此法进行 L-色氨酸的定量分析。已报道的对二甲氨基苯甲醛比色测定法测定时间较长,文中对该方法进行了改进,在硫酸介质中,色氨酸与对二甲氨基苯甲醛发生缩合反应生成的希夫碱在 600 nm 处有吸收峰。通过实验讨论了上述缩合反应的条件、反应时间及发酵液中副产氨基酸对测定的影响。

1 材料与方法

1.1 仪 器

752 紫外分光光度计。

1.2 试 剂

色氨酸储备液(1 g/L):准确称取 L-色氨酸(天津德宇生物技术公司)0.100 0 g(105℃烘 1 h)于 50 mL 烧杯中,加入适量蒸馏水溶解,然后移入 100 mL 容量瓶中,以蒸馏水定容,使用时稀释加入。

对二甲氨基苯甲醛储备液(3 g/L):准确称取对二甲氨基苯甲醛 0.300 0 g,溶于 100 mL 1:

1 H₂SO₄ 中,使用时直接取用。

亚硝酸钠溶液(2%):准确称取亚硝酸钠 0.200 g 于烧杯中,然后移入 10 mL 容量瓶中,以蒸馏水定容,新鲜配制。

1.3 实验方法

准确量取不同浓度的色氨酸溶液 1 mL 与对二甲氨基苯甲醛 9 mL 混合,移入比色管中沸水加热 2 min,加入亚硝酸钠 1 滴,再继续加热 3 min,冷水浴冷却,以试剂作空白,用 1 cm 比色皿在 600 nm 处测定吸光值。

2 结果与讨论

2.1 反应条件的确定

2.1.1 反应时间的确定

对于分光光度法,必须使显色反应进行完全才能进行 OD 值的测定,而在不影响结果的前提下,时间越短则该法应用起来越方便。

2.1.1.1 一次加热时间的确定

将色氨酸储备液稀释至 40 μ g/mL,准确量取稀释液 1 mL 和对二甲氨基苯甲醛 9 mL,移入比色管中,沸水浴加热,每 2 min 取出 1 支比色管,加入亚硝酸钠 1 滴,振荡,冷却后移入比色皿中测量,结果见表 1。

由表 1 可见,加热时间超过 2 min 后,OD 值已变化不大,故 1 次加热时间确定为 2 min。

2.1.1.2 二次加热时间的确定

第一作者:博士研究生。

* 天津市科委攻关项目(No. 983113711)

收稿时间 2003-04-01

表 1 一次加热时间对显色反应的影响

反应时间/min	OD ₆₀₀	反应时间/min	OD ₆₀₀
2	0.164	6	0.165
4	0.166	8	0.160

将比色管放入沸水浴中加热 2 min 后 ,加入亚硝酸钠 1 滴 ,再继续加热 ,每 1 min 取出 1 支比色管进行测定 ,结果见表 2。

表 2 二次加热时间对显色反应的影响

反应时间/min	OD ₆₀₀	反应时间/min	OD ₆₀₀
0	0.195	3	0.166
1	0.189	4	0.164
2	0.173	5	0.167

表 2 的结果表明 ,2 次加热时间以 3 min 为最佳。

2.1.2 显色反应产物的稳定性

测定反应产物放置不同时间后的 OD 值 ,以确定其稳定性 ,结果见表 3。

表 3 反应产物的稳定性

静置时间/min	OD ₆₀₀	静置时间/min	OD ₆₀₀
5	0.164	30	0.167
10	0.163	60	0.162

由表 3 可见 ,显色反应产物较稳定 ,具有很强的实用价值。

2.2 色氨酸浓度范围的选择

将色氨酸储备液稀释至 20、40、60、80、100、120、150、200 μg/mL ,准确量取不同浓度稀释液 1 mL ,按实验方法测定吸光值。色氨酸的浓度与吸光度之间的关系如图 1 所。图 1 的结果表明 ,为保证工作曲线的良好线性关系 ,色氨酸含量在 0~100 μg/mL 为最佳。

表 4 其他氨基酸对色氨酸测定结果的影响

干扰试剂	无	苯丙氨酸	酪氨酸	丙氨酸	组氨酸	缬氨酸	亮氨酸	异亮氨酸
吸光值	0.169	0.171	0.173	0.168	0.170	0.172	0.163	0.167

表 4 结果表明 ,以上氨基酸对此法检测色氨酸含量的结果基本无影响 ,可在这几种物质存在时直接用此法检测色氨酸含量。

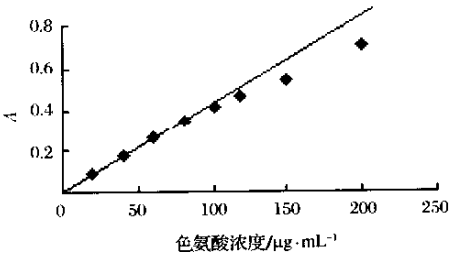


图 1 色氨酸的浓度与吸光度的关系

2.3 工作曲线的绘制

用已稀释了 10 倍的发酵液将色氨酸储备液稀释至 20、40、60、80、100 μg/mL ,分别量取 1 mL 各浓度下的色氨酸溶液 ,以加入稀释 10 倍的培养基溶液 1 mL 作空白 ,按实验方法测定吸光值 ,测定结果如图 2 所示。由该结果得到的工作曲线方程为 $C = 23.56A$,式中 C 为色氨酸 , A 为吸光度。相关系数为 $R^2 = 0.9972 (n = 5)$ 。

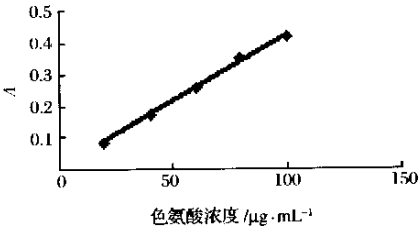


图 2 色氨酸的工作曲线

2.4 发酵液中其他氨基酸的干扰

准确量取稀释至 40 μg/mL 色氨酸稀释液 1 mL ,分别加入发酵液中常见的几种氨基酸 ,苯丙氨酸、酪氨酸、丙氨酸、组氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸 ,浓度为 5×10^{-4} mol/L ,各 1 mL ,按实验方法操作 ,结果如表 4 所示。

3 结 语

在文中所述测定条件下 ,标准曲线的线性回归方程 : $C(\text{色氨酸}) = 23.56A$ (A 为吸光

度 λ 相关系数为 $R^2 = 0.9972$ ($n = 5$) ,测定色氨酸的浓度范围为 $0 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 。

用该法测定色氨酸的含量 ,具有很高的准确度 ,且简单、快速 ,对仪器的要求不高 ,适合于工业生产中发酵液中色氨酸的快速测定。

参 考 文 献

1 杜连祥等.工业微生物学实验技术[M]. 天津 :天津

科学技术出版社 ,1992

2 黄伟坤等. 食品检验与分析[M]. 北京 :中国轻工出版社 ,1989

3 Katsumata R ,Ikeda M.[J] Bio/Tech. 1993 ,11 :921

4 高景芝 房 华. 对二甲氨基苯甲醛缩合光度法测定色氨酸的研究[J]. 首都师范大学学报 ,1999 ,20 :48

Quick Determination of *L*-Tryptophan in Fermented Broth

Wang Jian Chen Ning Xu Yongquan Yang Haijun Zhang Kexu

(College of Food Science and Bioengineering , Tianjin University of Science and Technology , Tianjin 300222)

ABSTRACT A new spectrophotometric method to determine *L*- tryptophan in fermented broth is reported. Tryptophan can be condensed with *p*- dimethylamino-benzaldehyde in the presence of sulfuric acid and a blue complex is formed. The maximum absorption of the complex is at 600nm. The linear scale is $0 \sim 100 \mu\text{g/mL}$,and the equation of the standard curve is $C(\text{Tryptophan}) = 23.56A$, where *A* represents absorbance. Coefficient of correlation R^2 is 0.9972.

Key words *L*-tryptophan , *p*-dimethylamino-benzaldehyde , spectrophotometry

德国生态食品消费上升



据德国《世界报》报道 ,在德国 ,生态食品的消费量呈上升趋势 ,接受生态食品的消费者数量在增加。

2003 年德国生态食品市场营业额比 2002 年增加 1% ,营业额上升到 30 亿欧元。据德国纽伦堡生态食品博览会举办者估计 ,今后几年内 ,随着生态食品大量进入普通食品超市 ,生态食品的消费量将明显上升。

从全球范围看生态食品市场稳定增长。据业内人士估计 ,2003 年全球生态食品的营业额约为 230 亿欧元 ,欧洲的营业额为 106 亿欧元。在欧洲 ,德国位居英国和意大利之前 ,是生态食品最大的零售市场。

日本开发锯末提取酒精技术

日本农业水产省最近决定与雪国蘑菇公司联合开发从栽培过蘑菇的锯末中提取酒精的技术。据估计 ,该项目约需投入 10 亿日元并争取在 5 年后将该技术投入“ 实用阶段 ”。这是日本农林水产省首次利用农业废弃物进行生物资源开发。

雪国蘑菇公司每天产生大约 200t 的废锯末 ,目前的处理方法是简单地焚烧或制成肥料 ,而从生物资源中提取酒精有利于减少 CO_2 地排放量 ,有利于保护大气环境。农林水产省计划在 5 年内开发出在锯末中加入微生物 ,使锯末产生糖分 ,然后再添加酵母使之发酵后制成酒精的技术。据悉 ,这类生物资源还包括稻草、甘蔗榨糖后的渣滓等植物废弃物 ,以及家禽的粪便等动物废弃物。