

分光光度法测定乳酸菌发酵体系中甘露醇的含量*

蒋 华 陈 卫 赵建新 张 灏

(江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 无锡, 214036)

摘 要 建立了一种比较简便和精确的分光光度分析法,用以测定乳酸菌发酵体系中的甘露醇含量。通过与盐酸共热脱水反应去除发酵体系中果糖对甘露醇分析测定的干扰和影响。精密度试验和回收率试验表明,此法准确可靠。

关键词 甘露醇, 果糖, 分光光度法, 发酵, 乳酸菌

甘露醇(*D*-mannitol)又名甘露糖醇,广泛存在于自然界植物的叶、茎和根中,被广泛地应用于医药、食品、化工等行业^[1]。甘露醇的生产方法较多,如提取法、合成法、发酵法、电解还原法等。其中比较典型的是提取法和合成法^[2],但这2种方法都存在一定的局限性。生物转化法,尤其是利用乳酸菌以果糖为底物生产甘露醇的方法,条件温和,副产物少,转化率高,易于精制,日益受到人们的重视^[3]。

甘露醇的分析测定方法主要有容量法、旋光法等,这些方法都对所分析样品的纯度有较高要求。由于乳酸菌发酵体系中成分复杂,对产物的测定有着不同程度的干扰。离子色谱、高效液相色谱可以进行快速准确地分析定量,但是样品处理繁琐,不利于快速检测。高碘酸氧化比色法测定有着较高的灵敏度,并且一些单糖(如半乳糖、葡萄糖、甘露糖)、蔗糖对甘露醇的干扰很小^[4]。但是,若在发酵体系中残留有一定量的果糖则会对甘露醇测定产生较大的干扰。因此,建立一个简单、快速、准确的实验室方法,来定量分析乳酸菌发酵体系中的甘露醇,对于研究开发生物转化法制取甘露醇具有较大的应用价值。

1 试验材料与方法

1.1 仪 器

UNICO 2000 可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司。其他均为试验室常用仪器。

1.2 试 剂

甘露醇,果糖,高碘酸钠,*L*-鼠李糖,醋酸铵,冰乙酸,乙酰丙酮均为国产分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 高碘酸氧化测定甘露醇

取样液 1 mL 于具塞刻度试管中,然后加入 1

mL 高碘酸钠溶液(0.015 mol 高碘酸钠溶于 0.12 mol/L HCl 溶液中)混匀,室温放置 10 min,加 2 mL 0.1% *L*-鼠李糖溶液,混合后加 4 mL 新配制的 Nash 试剂(75 g 醋酸铵加 1 mL 冰乙酸,加 1 mL 乙酰丙酮,定容至 500 mL)53℃水浴加热 15 min 呈色,冷却,在 412 nm 测定试样吸光度^[5]。

1.3.2 脱水处理

取样液 2 mL 于具塞刻度试管中加入浓 HCl 3 mL,沸水浴加热 10 min,冷却,稀释至一定浓度。

1.3.3 糖的测定

取样液 1 mL 于具塞刻度试管中,加入 3,5-二硝基水杨酸溶液(DNS)2 mL,置沸水浴中煮 2 min 进行显色,然后以流水迅速冷却,用水定容到 25 mL,摇匀,在 540nm 处测定吸光度^[6]。

2 结果与讨论

2.1 脱水处理的作用效果

为了考察脱水处理在甘露醇分析测定中的作用,分别将甘露醇含量一定并且果糖浓度不同的糖溶液经盐酸脱水处理后,稀释 50 倍,高碘酸氧化测定吸光度;同时,将果糖溶液,经同样稀释度稀释后,直接用高碘酸氧化反应测定吸光度。结果如图 1。

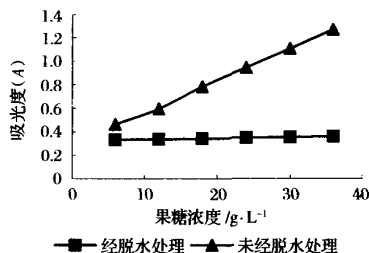


图 1 脱水处理效果比较图

甘露醇、果糖都可以参与高碘酸氧化反应呈色,且在 412 nm 处有重叠。若直接用高碘酸氧化法测定体系中甘露醇的含量,乳酸菌发酵体系中残留的果糖会对测定结果产生较大的干扰。而果糖在与浓盐

第一作者:硕士研究生(张灏为本文责任作者)。

* 江苏省高新技术研究计划项目(课题编号 BG2004322)

收稿日期:2005-01-25, 改回日期:2005-03-22

酸共热作用下,脱水生成糠醛及其衍生物等一系列物质,这些物质不能参与高碘酸氧化反应呈色,因此可以通过对样品进行脱水处理以降低反应体系中果糖对甘露醇测定的干扰。经过脱水处理后,果糖对甘露醇测定的干扰明显降低,含 36 g/L 的果糖溶液经脱水处理后的吸光度降低到未经处理的 28.47%。

2.2 脱水处理后稀释度的确定

将含果糖 80 g/L 的 MRS 培养基(葡萄糖含量为 20 g/L),预先稀释 4 倍,用 HCl 进行脱水处理,稀释至不同稀释度,与高碘酸进行氧化反应,测不同稀释度所对应的高碘酸氧化反应前后的吸光度,结果如图 2。

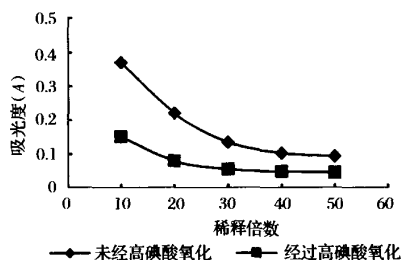


图2 脱水处理后的稀释效果

图2表明,当脱水处理后的样液被稀释到50倍左右时,其他干扰(培养基,糖)可以被极大地降低,稀释到50倍时的吸光度为10倍稀释度的30.46%;并且随着稀释度的进一步增大,吸光度变化不大,稀释度由50降低到40时,吸光度仅增加了6.25%。由此,稀释度可以确定为50倍。

为了考察该稀释度所对应的甘露醇的线性范围,将质量浓度分别为3,5,7,9和11g/L的甘露醇标准溶液,经脱水处理并稀释后,用高碘酸氧化法进行测定,吸光度与质量浓度的关系可用回归方程1表示。

$$Y = 0.0722 X - 0.0243 \quad (1)$$

$$R^2 = 0.9998$$

式中, X 为甘露醇质量浓度(g/L), Y 为吸光度 OD_{412} 。

脱水处理后稀释50倍时,甘露醇线性范围落在3~12 g/L内。

2.3 脱水处理产生的干扰因素

经过脱水处理后,大大降低了发酵体系中果糖对甘露醇测定的干扰。但是由于培养基基质本身以及培养基中所含的其他糖类,也可以与浓 HCl 发生脱水反应,使得体系颜色变深。为了考察糖类物质所带来的干扰影响,将质量浓度为 10,20,30,40 和 50 g/L 的果糖、葡萄糖、乳糖、蔗糖溶液,经脱水反应处理并稀释后进行高碘酸氧化反应,测 412 nm 处的吸光度,糖质量浓度与吸光度值的关系曲线如图 3 所示。

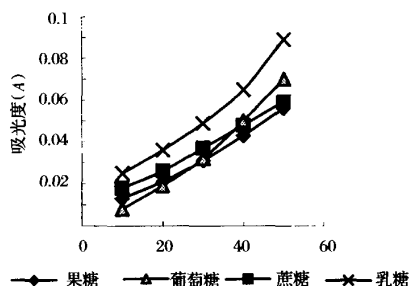


图3 不同糖脱水后对反应的影响

发酵体系中的糖类物质主要为果糖(蔗糖)和少量的葡萄糖,从图2中可以看出,不同糖对高碘酸氧化反应产生的影响并不大(在5%以内),所以糖类干扰可以以果糖为基准来计算。果糖的曲线多项式回归方程为:

$$Y = 0.9 \times 10^{-5} X^2 + 0.0006 X + 0.0064 \quad (2)$$

$$R^2 = 0.9999$$

式中, X 为果糖质量浓度(g/L), Y 为吸光度 OD_{412} 。

为了考察培养基对测定的干扰,将不添加糖的 MRS 培养基稀释4倍后进行脱水反应,再稀释至不同稀释度,高碘酸氧化测吸光度,结果如图4。

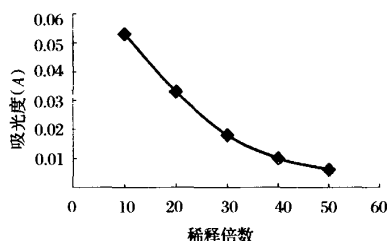


图4 纯培养基基质干扰图

培养基在经过稀释 4×50 倍后,基本无明显的干扰,吸光度最大为0.006,所以可以将培养基的干扰看作是定值来加以消除。

所以,本方法的分析过程如下,(a)将发酵液预稀释4倍作为待分析样品,考虑到在整个发酵过程中糖浓度约在250g/L以下,经过预稀释可以将待分析的样品中糖浓度控制在60g/L以下以保证HCl脱水反应的完全。(b)然后用DNS法测定分析样品中总糖含量,根据公式(2),计算出脱水处理后糖的吸光度 $Y_{糖}$ 。(c)用浓盐酸进行脱水处理,稀释50倍后,再通过高碘酸氧化反应测定412nm处的吸光度 Y 。

$$Y_{校正} = Y - Y_{糖} - Y_{基质} \quad (3)$$

根据式(1)算出校正后的甘露醇质量浓度,然后换算成发酵液中甘露醇的质量浓度。

2.4 精密度试验

用本方法对 2 批次的甘露醇发酵液分别进行 3 次测定,结果见表 1。

表 1 发酵液中甘露醇含量的测定结果

发酵样品	甘露醇质量浓度			平均值	标准偏差	变异系数
	测定值/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	/%	/%
1	6.28	6.3	6.25	6.28	0.03	0.40
2	10.46	10.45	10.42	10.44	0.02	0.20

由表 1 可知,标准偏差分别为 0.03% 和 0.02%,

表 2 回收率试验结果

发酵样品	原液甘露醇量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	加入甘露醇量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	3 次实测值/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			回收率/%			平均回收率/%
1	8.3	5.1	13.26	13.31	13.22	97.25	98.24	96.47	97.32
2	5.3	5.1	10.63	10.58	10.72	104.51	103.53	106.27	104.77

由表 2 可知,平均回收率分别为 97.32% 和 104.77%,说明该方法准确度是比较高的。

2.6 测定方法验证

利用高效液相色谱法分析发酵样品,分析条件:柱为 Sugarpak1 6.5 $\text{m}\times 30\text{ mm}$;流动相为纯水,流速 0.4 mL/min ;柱温为 80℃;进样体积 10 μL 。与分光光度法测定结果的比较见表 3。

表 3 发酵液中甘露醇的含量

样品	分光光度法/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	HPLC/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	相对误差/%
1	6.68	6.26	6.29
2	25.04	23.53	6.03
3	6.96	6.5	6.61

对 2 种方法的测定结果进行比较分析,说明该方法是相对准确可靠的。

3 结 论

直接用高碘酸氧化法测定体系中的甘露醇含量时,乳酸菌发酵体系中残留的果糖会对测定结果产生较大的干扰。而果糖与浓 HCl 共热,脱水生成糠醛及其衍生物等一系列物质,该物质不能参与高碘酸氧

变异系数分别为 0.40% 和 0.20%,这说明该方法精密度是比较高的。

2.5 回收率

为了考察本方法的准确度,对 2 批次的发酵液进行回收率试验。测得发酵批次 1 的果糖和甘露醇质量浓度分别为 48.5 g/L 和 8.3 g/L ,发酵批次 2 的果糖和甘露醇质量浓度分别为 8.5 g/L 和 11.2 g/L ,然后加入甘露醇标准物,按上述校正方法进行测定校正,每批次样品平行测定 3 次,结果见表 2。

化显色反应,因此可以通过对样品进行脱水处理以减少反应体系中果糖对甘露醇测定的干扰。

从精密度试验和回收率试验以及与 HPLC 测定结果相比较来看,用文中方法测定乳酸菌发酵体系中甘露醇质量浓度是比较准确的。与高效液相法相比,采用此方法可以直接对发酵液进行分析测定,不需要昂贵的仪器分析设备,也不需要发酵液进行去除蛋白、有机酸、糖等预处理,仅需要离心除去细胞,对于批量测定发酵液样品,该方法是准确可靠的。

参 考 文 献

- 周日尤,伍玉碧. 甘露醇制取的提取法与合成法比较[J]. 广西轻工业,1999,(4):5~9
- 王瑞芝. 甘露醇的研究进展[J]. 河北化工,2001,(2):4~6
- Niklas von Weymarn, Mervi Hujanen, ect. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacterial[J]. Process Biochemistry, 2002, (37): 1 207~1 213
- Song Hae Bok, Arnold L. Demain an improved colorimetric assay for polyols[J]. Biochem, 1977,81:18
- 李雪芹,包天桐,王 雁,等. 比色法测定冬虫夏草中甘露醇的含量[J]. 中草药,1999,30(1):19~21
- 大连轻院等编. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994. 173~174

Quantitative Analysis of Mannitol in Lactic Acid Bacteria Broth with a Spectrophotometric Method

Jiang Hua Chen Wei Zhao Jianxin Zhang Hao

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi, 214036, China)

ABSTRACT A Spectrophotometric method for the determination of mannitol in lactic acid bacteria broth was studied. The influence of fructose in broth was eliminated by dehydration with hydrochloric acid. The accuracy test and the recovery test showed that the method presented in this paper was accurate and reliable.

Key words mannitol, fructose, Spectrophotometry, fermentation, lactic acid bacteria