

异羟肟酸比色法测定 *D*-核糖发酵液中葡萄糖酸的含量

张宗玉 李志敏 叶 勤

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海, 200237)

摘 要 对异羟肟酸比色法测定葡萄糖酸含量的方法进行了改进。通过考察不同葡萄糖浓度对异羟肟酸比色法测定葡萄糖酸的影响, 得出葡萄糖浓度对葡萄糖酸测定影响的干扰方程, 据此计算得到的葡萄糖酸量可以排除葡萄糖的影响, 使得检测结果更为准确。方法适用于 *D*-核糖发酵液中葡萄糖酸的测定。

关键词 葡萄糖酸, 异羟肟酸比色法, 葡萄糖

D-核糖发酵过程中伴随各种副产物的产生, 如葡萄糖酸、乙酸、3-羟基丁酮和 2,3-丁二醇等^[1, 2], 其中, 葡萄糖酸占相当大的比例^[3]。准确测定 *D*-核糖发酵液中葡萄糖酸的含量, 有助于深入研究 *D*-核糖发酵中枯草芽孢杆菌的代谢变化, 提高 *D*-核糖的转化率。

葡萄糖酸的测定方法有很多种, 有化学法、酶法^[4]、HPLC 法等^[5]。化学法有异羟肟酸比色法^[6]和高碘酸氧化法^[7]。异羟肟酸比色法对仪器的要求不高、操作简单方便。但是由于 *D*-核糖发酵液中含有大量的葡萄糖, 会对葡萄糖酸的测定产生很大的影响。本文研究考察了葡萄糖酸测定中葡萄糖的影响, 对异羟肟酸比色法测定葡萄糖酸的方法进行了改良。新方法能够减小误差, 较准确地测定 *D*-核糖发酵液中葡萄糖酸的含量。

1 材料与方法

1.1 原理^[6]

葡萄糖酸在酸性条件下发生内酯化, 形成的内酯与羟胺碱反应, 生成异羟肟酸。异羟肟酸与 FeCl_3 能生成有色络合物, 从而可通过分光光度比色法定量分析葡萄糖酸的含量。

1.2 试剂

标准溶液: 用葡萄糖酸钠配制 0.100 mol/L 的标准溶液储备液。使用时根据需要稀释至不同浓度的标准葡萄糖酸溶液。

4 mol/L 盐酸羟胺溶液, 4 mol/L 的 NaOH 溶液。

使用时, 将等体积的盐酸羟胺和 NaOH 混合, 混合后 pH 值为 8.0。配制的溶液应在 4 h 内使用。

FeCl_3 试剂: FeCl_3 和 HCl 的混合溶液, 其中 FeCl_3 和 HCl 分别为 0.37 mol/L 和 0.1 mol/L。

1.3 方法

在 10 mL 带有磨口塞的试管中各加入 0.5 mL 标准溶液或者样品, 再加入 0.5 mL 去离子水, 混合均匀后, 沸水浴中加热 20 min, 冷却至室温。然后顺序加入 2 mL 盐酸羟胺和 NaOH 混合试剂、1 mL 4 mol/L HCl 和 1 mL FeCl_3 试剂, 混合均匀, 这时反应混合物的 pH 为 1.2 ± 0.2 。放置 10 min 后比色(波长 505 nm), 以空白管(用 0.5 mL 去离子水替代样品溶液, 其余试剂用量与前相同)校零, 读取各管的吸光度 OD_{505} 值。测定工作在 10 min 内完成。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的绘制

分别配制 0、1、2、4、8 mmol/L 的葡萄糖酸钠溶液, 按照前述的方法测定其吸光度 (OD_{505}) 值, 作出葡萄糖酸与 OD_{505} 的标准曲线, 见图 1(相关系数为 0.9978)。

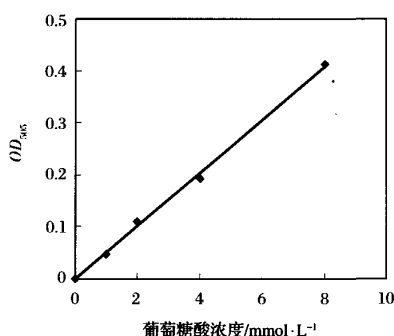


图 1 葡萄糖酸的标准曲线

由图 1 可知, 葡萄糖酸浓度在 0~8 mmol/L 范围内与 OD_{505} 值成线性关系。当葡萄糖酸浓度 > 8 mmol/L 时, 线性关系不好(图中未显示)。

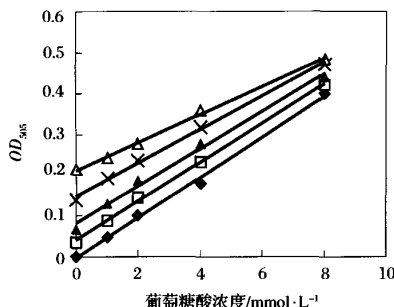
2.2 葡萄糖对葡萄糖酸测定的影响

由于发酵液里含有大量的葡萄糖, 而且还有很多

第一作者: 硕士(叶勤为通讯联系人)。

收稿日期: 2005-01-11, 改回日期: 2005-06-13

发酵产物,可能会影响测定。按照本测定方法的原理,不仅葡萄糖酸会内脂化,与羟氨碱、 FeCl_3 反应,葡萄糖也会有类似反应。这跟葡萄糖对 D -核糖的测定影响相似^[8]。虽然在只含有葡萄糖酸的溶液中,吸光度 OD_{505} 与葡萄糖酸成线性关系,但是在葡萄糖酸和葡萄糖的混合液中, OD_{505} 与葡萄糖酸浓度呈复杂的对应关系。为了确定在葡萄糖酸和葡萄糖的混合液中,吸光度与葡萄糖酸和葡萄糖浓度之间的关系,配制了不同浓度葡萄糖与葡萄糖酸标准溶液组合,用异羟肟酸法测定生色反应后的吸光度,结果见图 2。



◆0mol/L; □0.0556mol/L; ▲0.111mol/L;
×0.222mol/L; △0.278mol/L

图2 不同葡萄糖浓度对吸光度的影响

由图 2 可以看到,葡萄糖对葡萄糖酸的测定影响比较大,当葡萄糖酸浓度在 0~8 mmol/L 范围内,同一葡萄糖浓度下 OD_{505} 与葡萄糖酸浓度成直线关系。但是,葡萄糖酸浓度相同而葡萄糖浓度不同时,测定的 OD_{505} 有明显差异,特别是当葡萄糖酸浓度较低时, OD_{505} 的差异更显著。

对图 2 的数据采用 Linest 函数进行回归分析,得吸光度的公式为:

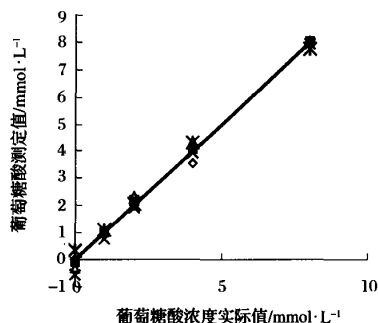
$$A = 0.724X_1 + 49.98X_2 - 48.29X_1X_2 \quad (1)$$

其中 A 为吸光度 OD_{505} , X_1 为葡萄糖浓度 (mol/L); X_2 为葡萄糖酸浓度 (mol/L), 经 F 检验, $F = 1484 > F_{0.99}(3, 22) = 4.8$, 所以回归分析显著。

由计算式(1)得出葡萄糖酸浓度 X_2 的计算式为:

$$X_2 = (A - 0.724X_1) / (49.98 - 48.29X_1) \quad (2)$$

根据不同葡萄糖酸和葡萄糖浓度组合的溶液及其 OD_{505} 值,由式(2)计算葡萄糖酸,与实际值比较,得到的计算值与实际值之间能较好吻合,见图 3。可以看到,除了葡萄糖酸浓度为 0 的溶液误差稍大,其余溶液的计算结果误差都较小 ($< 2.5\%$)。全部样品计算的平均误差为 4%。



◇0mol/L; ■0.0556mol/L; △0.111mol/L; ×0.222mol/L;
* 0.278mol/L 葡萄糖

图3 葡萄糖酸测定值与实际值的关系

2.3 D -核糖对葡萄糖测定的影响

在含有 5 mmol/L 的 100 mL 葡萄糖酸溶液中加入 1 g 核糖,用上述方法测定溶液混合后的葡萄糖酸浓度,3 次测定的计算结果与实际值的最大相对误差为 1.3%,见表 1,说明核糖对此方法测定葡萄糖酸影响不大。

表1 D -核糖对葡萄糖酸测定的影响 mmol/L

葡萄糖酸 实际值	葡萄糖酸测定值			
	1	2	3	平均值
5	4.96	4.95	5.05	4.99

2.4 发酵液中葡萄糖酸的测定

在含有 20 g/L 葡萄糖的发酵液(经测得发酵液中含有 0.24 g/L 的葡萄糖酸和 0.45 g/L 核糖)中加入 5 mmol/L (0.97 g/L) 的葡萄糖酸,采用本方法进行测定,结果表明,3 次测定结果的最大相对误差为 2.8%(表 2),因此本方法可用于 D -核糖发酵液中葡萄糖酸测定。

表2 葡萄糖酸测定的重复性 mmol/L

葡萄糖酸 实际值	葡萄糖酸测定值			
	1	2	3	平均值
5	4.87	4.96	5.13	4.98

2.5 发酵过程中葡萄糖酸的变化

发酵过程中,跟踪葡萄糖酸的浓度变化,有助于了解枯草芽孢杆菌在 D -核糖发酵中代谢的变化。采用本方法测定了 D -核糖发酵过程中葡萄糖酸浓度的变化,结果见图 4。其中葡萄糖测定采用上海生物制品研究所生产的葡萄糖试剂盒。可以看出,随着 D -核糖发酵过程的进行,副产物葡萄糖酸不断积累,未被进一步代谢,发酵结束葡萄糖酸达到 32.8 mmol/L (6.37 g/L)。葡萄糖酸的积累,反映了代谢通路的不畅,可能是磷酸戊糖途径氧化阶段产生的 NADPH

不能有效氧化为 NADP 所致。通过改进发酵工艺,减少副产物葡萄糖酸的生成,可能会提高核糖的转化率,改善核糖的发酵生产效率。

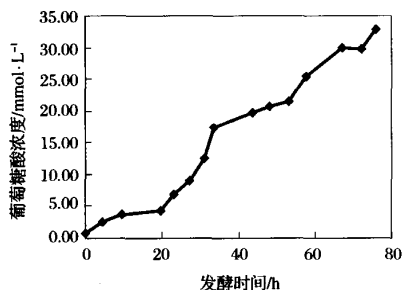


图4 D-核糖发酵过程中葡萄糖酸的变化

3 结论

葡萄糖对异羟肟酸比色法测定葡萄糖酸有干扰,采用式(2)所示方程能排除葡萄糖的影响,适用于D-核糖发酵液中葡萄糖酸的测定。

参考文献

1 De Wulf P, W Soetaert, D Schwengers, et al. Optimization

of D- ribose production with a transketolase-affected *Bacillus subtilis* mutant strain in glucose and gluconic acid-based media[J]. Journal of Applied Microbiology, 1997,83:25~30

2 De Wulf P, W Soetaert, D Schwengers, et al. D- Glucose does not catabolite repress a transketolase-deficient D- ribose-producing *Bacillus subtilis* mutant strain[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1996, 17:104~109

3 Kishimoto, Kintaka, Uchiyama. Production of D- ribose. US 4904587, 1990

4 Inés Mato, José F Huidobro, M Pilar Sánchez, et al. Enzymatic Determination of Total D- Gluconic acid in Honey[J]. J Agric Food Chem, 1997,45:3550~3553

5 林 峰,张汉英,张莉琼. HPLC 测定葡萄糖酸盐的研究[J]. 分析测试学报,1997,16(1):68~71

6 朱则善,严志森,赵崇涛,等. 异羟肟酸比色法测定电解混合液中葡萄糖酸的含量[J]. 福建师范大学学报,1991,7(4):45~48

7 秦含章. 葡萄酒分析化学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1991.361~366

8 彭彦峰,吴兆亮,李英杰. 分光光度法测定微生物发酵液中D-核糖浓度及其机理[J]. 分析化学,2002,30(8):975~977

Determination of Gluconate Concentration in Broth of D-ribose Fermentation Using the Hydroxamate Method

Zhang Zongyu Li Zhimin Ye Qin

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai, 200237, China)

ABSTRACT Glucose interferes with gluconate measurement using the hydroxamate colorimetric method. This study focused on the effect of glucose on the measurement of gluconate. Through measuring a series of solutions containing different amount of glucose and gluconate, a formula for calculating gluconate concentration was obtained, with which the interference caused by glucose could be eliminated. This method was applied to determination of gluconate concentration profile during D- ribose fermentation.

Key words gluconate, hydroxamate colorimetric method, glucose

日本拟实施新版进口食品安全卫生标准

据商务部消息,从2003年起,日本厚生省根据修订后的《食品卫生法》,准备在3年内逐步引入食品中残留农药、兽药及饲料添加剂“肯定列表”(PositiveList)制度,并已公布了该制度草案内容。

该制度草案待获得日本厚生省药物食品卫生审议会审议通过,并在向世贸组织通报备案后于2006年5月正式实施。

日方称其在制定“暂行标准”时,参照了有关标准。“肯定列表”草案第二稿中对669种农药、兽药及饲料添加剂设定了1万多个最大允许残留限量标准,即“暂定标准”;对尚不能确定具体“暂定标准”的农药、兽药及饲料添加剂,将设定0.01mg/kg的“一律标准”,一旦食品中残留物含量超过此标准,将被禁止进口或流通。