

单酶法快速测定发酵液中的 L -乳酸^{*}

陈 碧 娥

(华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362000)

摘要 介绍一种简便、快速测定发酵液中 L -乳酸的新方法. 采用不依赖 NAD 的 L -乳酸脱氢酶(L -LDH), 以菲咯啉铁复合物(O -phenanthroline- Fe^{3+}) 作为其电子受体, 吸收波长 510 nm, 在 751 分光光度计上直接测定发酵液中的 L -乳酸.

关键词 L -乳酸, L -乳酸脱氢酶, 测定

分类号 TQ 921.3

发酵液中乳酸含量的定量方法, 有比色法^[1]、EDTA 滴定法^[2]、HPLC 分析法^[3]和酶法等. HPLC 法仪器昂贵; 比色法测定耗时多, 误差大; EDTA 法虽快速, 但测定的是发酵液中的总酸. 同时, 比色法及 EDTA 法均不能用于 D 型、 L 型乳酸的分别定量, 因此, 酶法测定格外引起人们的重视. 国内, 目前有关酶法测定 L -乳酸^[4,5] 采用的是依赖 NAD 的 LDH, 需要高纯度的 NAD, 而且要有 L -LDH、 D -LDH 及 GPT(谷氨酸丙酮酸转氨酶) 3 种酶的参与. 本文采用不依赖 NAD 的 L -LDH 测定米根霉发酵液中的 L -乳酸的含量, 仅需 L -LDH. 方法简便、快速, 灵敏度高. 其原理, 是由酵母提取的 L -LDH 能特异性地作用于 L -乳酸. 该酶的天然电子受体是细胞色素 C, 某些化学药剂可以作为其人工的电子受体. 本方法以菲咯啉铁复合物作为其电子受体. 反应式为 $L(+)-Lactate + 2[Fe(phenanthroline)_x]^{3+} \xrightarrow{L-LDH} pyruvate + 2[Fe(phenanthroline)_x]^{2+}$, O -phenanthroline- Fe^{3+} 复合物是黄色的, 经反应后 O -phenanthroline- Fe^{2+} 是桃红色的, 在 510 nm 处被强烈地吸收, 由其消光值可以算出发酵液中的 L -乳酸的含量.

1 材料与方法

1.1 材料

L -乳酸(结晶)标准品和酵母 L -乳酸脱氢酶(L -LDH), 均为 Sigma 公司产品; 其余化学试剂均为国内生产. L -乳酸发酵液样品, 由米根霉摇瓶发酵所得.

1.2 方法

1.2.1 试剂的制备 (1) 缓冲液. 由于 L -LDH 进行酶促反应的最适 pH 值为 8.4, 因此采用硼酸-硼砂缓冲液. 取 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼酸溶液 27.5 mL 与 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼砂溶液 22.5 mL 相混合得 50 mL 硼酸-硼砂缓冲液. (2) 显色液. A 液: $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $FeCl_3$ 饱和溶液; B 液:

0.008 mol · L⁻¹ 菲咯啉, 此溶液在 4 至少 7 d 内可保持稳定. 使用前将 A 液稀释 300 倍, 取 B 液 25 mL 与稀释后的 A 液 3 mL 相混合, 用水定量至 50 mL, 即为显色液. 显色液必须现配现用. (3) L-LDH 溶液. 原装 6 mL 共 25 u, 使用前用 pH= 8.7 的硼酸-硼砂缓冲液稀释至所需的浓度.

1.2.2 测定方法 (1) 测定条件. 波长 510 nm, 光程 1 cm, 温度 35~37 , pH= 8.4. 酶促反应时间为 15 min. 以蒸馏水为对照在 751 分光光度计上读取 OD 值, 样品最高测定浓度为 2.5 mmol · L⁻¹ 的 L-乳酸. (2) 标准曲线方程. L-乳酸标准溶液(2.5 mmol · L⁻¹) 用蒸馏水配制. (使用前新鲜制备). 各种试剂及酶的添加量见表 1. 以 OD 的值为 y, 以 L-乳酸浓度为 x, 对所得数据进行线性回归得标准曲线方程 $y = - 0.06 + 0.3532x$. (3) 样品的测定. 发酵液加热后滤去菌体, 得澄清的滤液. 稀释滤液, 使 L-乳酸的浓度在 0.17~2.5 mmol · L⁻¹. 取样品 1.0 mL 与 1.0 mL 且 pH= 8.7 的硼酸-硼砂缓冲液混合后, 加入 1.0 mL 的显色液, 空白用蒸馏水代替样品. 其余试剂同样加入. 两支试管同时放入恒温水浴, 待水温升至 37 加入适量的 L-LDH 酶 0.15 mL, 使酶与样品中乳酸量比约为 0.15 u 1 mmol · L⁻¹. 保温 15 min 后, 在 510 nm 处读取 OD 值, 查标准曲线后乘以稀释倍数即得到 L-乳酸的含量.

表 1 制作标准曲线时各种试剂的添加量及测定结果

添加物	L-乳酸的含量/mmol · L ⁻¹									
	0.5		1.0		1.5		2.0		2.5	
	试样	空白	试样	空白	试样	空白	试样	空白	试样	空白
2.5 mmol · L ⁻¹ 的 L-乳酸/ mL	0.2	0	0.4	0	0.6	0	0.8	0	1	0
蒸馏水/ mL	0.8	1	0.6	1	0.4	1	0.2	1	0	1
显色液/ mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
缓冲液/ mL	1.07	1.07	1	1	0.92	0.92	0.85	0.85	0.77	0.77
1 u · mL 的酶液/ mL	0.08	0.08	0.15	0.15	0.23	0.23	0.30	0.30	0.38	0.38
OD ₅₁₀ 值	0.82		0.261		0.589		0.643		0.774	

2 结果与讨论

2.1 显色液浓度对消光值的影响

在一定范围内, 显色液的浓度对消光值有较大的影响, 如表2所示. 显色液浓度太高, 增加

表 2 不同浓度的显色液对 OD 值的影响

添加物	显色液浓度/ mmol · L ⁻¹					
	0.006	0.007	0.008	0.009	0.010	0.0125
1 mmol · L ⁻¹ 的 LA/ mL	1	1	1	1	1	1
显色液/ mL	1	1	1	1	1	1
缓冲液/ mL	1	1	1	1	1	1
1 u · mL 的酶液/ mL	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
OD ₅₁₀ 值	0.209	0.258	0.291	0.275	0.233	0.202

空白值; 显色液浓度太低, 则可能造成反应不完全. 同样, 取 1 mmol · L⁻¹ 的 L-乳酸样品 1 mL, 缓冲液与酶液的加入量也相同. 添加不同浓度的显色液(表 2), 由表可以看出当 phenanthroline 的浓度为 0.008 mol · L⁻¹ 时, 溶液有最大吸收值.

2. 2 测定结果考察

在发酵液中, 添加一定量的 *L*-乳酸, 测定其回收量. 由表 3 可以看出, 其回收率均比较高.

表 3 单酶法定量 *L*-乳酸的回收率

试样	加放量/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	测定值/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	回收量/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率(%)
1	0	1.10		
2	0.60	1.69	0.59	98.3
3	0.80	1.88	0.78	97.5
4	1.00	2.08	0.98	98.0

利用酵母 *L*-LDH 酶测定发酵液中的 *L*-乳酸, 专一性强, 不受其他有机酸的干扰. 但由于其灵敏度高, 测定范围为 $0.17 \sim 2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 则发酵液中的 *L*-乳酸的含量往往比较高. 当发酵终点浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右, 稀释倍数较高, 对准确性有一定的影响. 本方与其他酶法相比较, 明显的优点是快速、简便, 可用于发酵过程的中间测定.

参 考 文 献

1 化学工业部上海医药工业研究所. 抗菌素工业分析. 北京: 化学工业出版社, 1960. 189 ~ 190
2 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(第二部). 北京: 化学工业出版社, 1985. 239 ~ 300
3 Hang Y D. Direct fermentation of corn to *L*(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters* 1989, 11(4): 299 ~ 300
4 波林格生化试剂公司编. 酶法食品分析. 胡学智等译, 上海: 上海科学技术文献出版社, 1985. 85 ~ 91
5 张利奋. 国际饮料分析方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992. 140 ~ 145

Single Enzyme Method for Rapidly Determining *L*-Lactic Acid in Fermentation Liquid

Chen Bie

(Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract A new handy method is presented for rapidly determining *L*-lactic acid in fermentation liquid. By adopting NAD-independent *L*-lactic acid dehydrogenase, and also Fe^{3+} -phenanthroline as electron acceptor, *L*-lactic acid in fermentation liquid can be directly determined in 751 spectrophotometer, with an absorption wavelength at 510 nm.

Keywords *L*-lactic acid, *L*-lactic acid dehydrogenase, determination