

文章编号 :1009-038X(2002)05-0529-04

SBA 生物传感仪酶法测定谷氨酸定标值的校正

张宏建 , 段作营 , 毛忠贵

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘 要 :在味精行业中 ,目前广泛采用 SBA 生物传感仪检测 L-谷氨酸含量 .SBA 生物传感仪在检测量程下 ,定标为 100 ,但在检测谷氨酸发酵液、等电上清液、上清液的浓缩液、脱盐液以及脱色液时 ,受 NH_4^+ 的影响 ,其结果偏低 ;为此 ,其定标必须进行相应的调整 ,才能准确地检测出样品中的谷氨酸含量 .

关键词 :SBA 生物传感仪 ;谷氨酸 ;铵离子

中图分类号 :Q 51

文献标识码 :A

The Emendation of Calibrating Value of Glutamic Acid Detection Using Enzymatic Method with SBA-Biosensor

ZHANG Hong-jian , DUAN Zuo-ying , MAO Zhong-gui

(The key Laboratory of Industrial Biotechnological under Ministry of Education ,Southern Yangtze University ,Wuxi 214036 ,China)

Abstract :SBA-biosensor was widely used for measuring the content of L-glutamic acid in monosodium glutamate production nowadays . Under the detection range , the standard solution was set 100 . But when we detected the fermenting liquor , the upper liquid after equipotential point , the upper liquid of concentrates , and the desalting and decoloring liquor , the detecting system was easily interfered by ammonia and it 's result was on the low side . Thus the standard value must be adjusted accordingly , and the L-glutamic acid contents of fermenting liquor then could be exactly detected .

Key words :SBA-biosensor ; glutamic acid ; ammonia

过去谷氨酸的含量都采用华勃式呼吸器测定 ,其原理^[1]是利用谷氨酸脱羧酶在一定的温度、体积下与谷氨酸反应 ,使谷氨酸脱羧放出 CO_2 ,再用华勃式呼吸器测定放出 CO_2 的压力、体积并以一定公式换算谷氨酸的含量 ;但该方法测定时间较长 ,准确性相对较差 .为了准确、快速地检测出发酵液等料液中谷氨酸的含量 ,目前采用 SBA 生物传感仪酶法逐步取代华勃法测定谷氨酸 ,并在味精行业中得到

广泛应用 .SBA 生物传感仪酶法可通过自动记录、自动计算、分别显示 ,打印出 L-谷氨酸的含量 ,测定时间明显缩短 .但在实际应用中 ,因受 NH_4^+ 的影响 ,SBA 法在规定定标为 100 时 ,测出味精清洁生产样品中的谷氨酸含量偏低 .为此 ,实验中利用回收率来校正 SBA 酶法定标 ,同时找出 NH_4^+ 对 SBA 生物传感仪测定样品时的影响 .

收稿日期 2002-04-18 ; 修订日期 2002-06-25 .

作者简介 :张宏建 (1973-)男 ,河南信阳人 ,工学学士 ,助教 .

万方数据

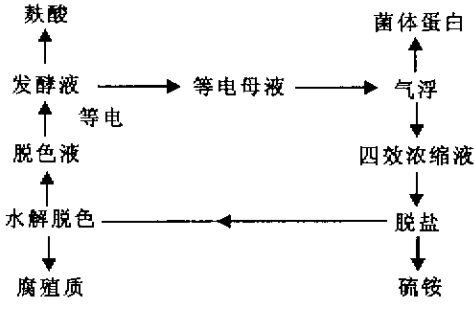
1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

SBA 生物传感仪由山东省科学院提供,华勃式呼吸仪由上海科技大学提供,旋光仪由菱花集团提供,发酵液、等电上清液、四效浓缩液、脱盐液、脱色液、味精(纯度为 99.9%)、麸酸等均由山东济宁市菱花集团提供,其余试剂为市售国产分析纯试剂。

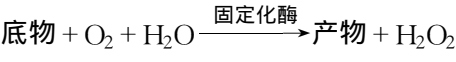
1.2 味精清洁生产流程

待测样品均来自味精清洁生产过程中,其工艺流程^[2]如下:



1.3 SBA 法测定原理

SBA 生物传感仪的原理是利用酶促反应进行定量,样品的分析原理如下:



在测定谷氨酸含量时,底物为谷氨酸,固定化酶为谷氨酸氧化酶,产物为 α -酮戊二酸和 NH_4^+ 。含有样品的底物在样品室内迅速按一定比例混合均匀,底物透过酶膜圈的外层与固定化酶层接触并反应,放出的 H_2O_2 再透过酶膜圈的内层与白金-银电极接触,产生电流信号,电流信号与底物浓度呈线性关系,经微机控制直接显示和打印。

1.4 测试方法

1.4.1 样品的稀释 发酵液、四效浓缩液稀释 100 倍,等电上清液稀释 50 倍,脱盐液、脱色液稀释 200 倍。吸取 1 mL 待测样品移入容量瓶中调 pH 至接近中性,定容后供 SBA 仪测定谷氨酸含量。

1.4.2 样品的回收率检测 在已测定的谷氨酸稀释样品中添加一定量的谷氨酸,使谷氨酸含量维持在 SBA 法定测量程范围内,再用 SBA 生物传感仪检测样品中的谷氨酸含量。

$$\text{回收率} = \frac{u_2 - u_1}{A}$$

式中: u_1 ——未添加谷氨酸时 SBA 的读数;

u_2 ——添加谷氨酸后 SBA 的读数;

A ——添加谷氨酸的量(质量浓度)。

1.4.3 SBA 法定标值的计算 利用 SBA 仪两次测

量谷氨酸的结果,可计算加入已知量的谷氨酸回收率,并以此推导出 SBA 法正确的定标值。

$$\text{定标值} = \frac{A}{u_2 - u_1}$$

式中: u_1 ——未添加谷氨酸时 SBA 的读数;

u_2 ——添加谷氨酸后 SBA 的读数;

A ——添加谷氨酸的量(质量浓度)。

2 结果与分析

在山东省菱花味精集团进行味精清洁生产测试过程中,发现 SBA 在检测发酵液、等电上清液、四效浓缩液、脱盐液及脱色液时,定标为 100,进样量为 25 μL 时测定的结果比实际值偏低,再与华勃式呼吸仪相校正也证明了这一点。在硫酸铵存在下,SBA 仪的谷氨酸氧化酶可能受到抑制。SBA 生物传感仪在测定底物时,产物为 α -酮戊二酸和 NH_4^+ ,从酶反应动力学看,很可能在一定的 NH_4^+ 质量浓度下,对反应产生抑制作用,使酶反应不充分,谷氨酸的实际测定值低于理论应测值。

2.1 SBA 法测定 Glu 线性有效质量浓度范围的确定

为了避免测定误差,在测定发酵液、等电上清液、四效浓缩液、脱盐液及脱色液时,对 SBA 仪测定 Glu 有效质量浓度范围进行校正(见表 1)。

表 1 SBA 法测定 Glu 线性有效质量浓度范围的确定
Tab. 1 The confirmation of GA linear valid concentration range using SBA method

Glu 加样量/ ($\mu\text{g/L}$)	SBA 读数	Glu 加样量/ ($\mu\text{g/L}$)	SBA 读数
20	20.1	100	100
40	40.5	120	119
80	81.0	160	150

表 1 表明,加样量在 40~120 $\mu\text{g/L}$ 范围内,测定的线性较好($R^2=0.9997$),在以后的实验中将尽量保证总加样量在这一范围内。

2.2 不同质量浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 SBA 生物传感仪测定谷氨酸含量的影响

从实验数据可以看出,硫酸铵在极低的质量浓度下就会对谷氨酸氧化膜产生抑制。在低于 0.02% 时,谷氨酸氧化酶的活力随硫酸铵的增加急剧下降,在高于 0.02% 时谷氨酸氧化膜的活力随硫酸铵质量浓度的缓慢变化接近一条水平线,可以近似认为抑制达到平衡。这说明 SBA 仪所用的谷氨酸氧化酶在 NH_4^+ 的存在下仍基本符合酶反应动力学, NH_4^+ 对酶反应有抑制作用,进而影响到仪器对样

品的测定值.

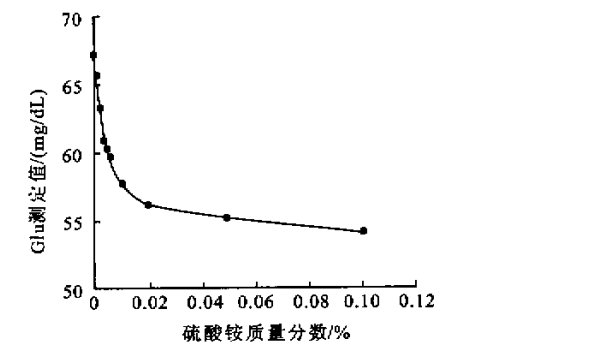


图 1 硫酸铵质量分数对 SBA 测定 Glu 的影响
Fig.1 The effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on Glu content with SBA method

2.3 SBA 法测定 Glu 定标值的校正

2.3.1 SBA 法测定发酵液中 Glu 定标值校正的测定

将发酵液稀释 100 倍 ,用 SBA 法分别测定添加谷氨酸前后 Glu 的含量 ,并计算回收率 ,推导出准确的定标值(见表 2).

表 2 SBA 法测定发酵液中 Glu 定标值的校正
Tab.2 The determination of emendating the calibrating value of Glu in fermenting liquor with SBA method

No.	SBA 读数/ u_1	添加谷氨酸量/ ($\mu\text{g/L}$)	SBA 读数/ u_2	回收率/ %
1	90.8	19.64	108.7	91.1
2	92.4	19.85	110.5	91.2
3	94.6	20.00	112.9	91.5

从表 2 可以看出 ,发酵液中谷氨酸的回收率在 91% 左右 ,回收率为 100% 时 ,定标应为 109 ,现生产上定标改为 110 有其合理性 ,因此建议定标为 108~110.

2.3.2 SBA 法测定等电母液中 Glu 定标值的校正

将等电母液稀释 50 倍 ,用 SBA 法分别测定添加谷氨酸前后的含量 ,并计算出回收率 ,推导出准确的定标值(见表 3).

表 3 SBA 法测定等电母液中 Glu 定标值的校正
Tab.3 The determination of emendating the calibrating value of Glu in upper liquor after equipotential point with SBA method

No.	SBA 读数/ u_1	添加谷氨酸量/ ($\mu\text{g/L}$)	SBA 读数/ u_2	回收率/ %
1	38.8	85	107.4	80.7
2	46.5	50	87.9	82.8
3	51.8	50	92.6	81.6

表 3 表明 ,等电母液回收率在 80% ~83% ,建议定标为 120~125.

2.3.3 SBA 法测定四效浓缩液中 Glu 定标值的校正

将四效浓缩液稀释 100 倍 ,用 SBA 法分别测定添加谷氨酸前后的含量 ,计算出回收率 ,推导出准确的定标值(见表 4).

表 4 SBA 法测定四效浓缩液中 Glu 定标值的校正
Tab.4 The determination of emendating the calibrating value of Glu in the concentrates after vaporizing four times with SBA method

No.	SBA 读数/ u_1	添加谷氨酸量/ ($\mu\text{g/L}$)	SBA 读数/ u_2	回收率/ %
1	62.5	50.0	102.7	80.4
2	57.8	46.0	95.8	82.6
3	54.5	51.5	96.6	81.7

表 4 表明 ,四效浓缩液的回收率约在 81% ~83% ,建议定标为 120~125.

2.3.4 SBA 法测定脱盐液中 Glu 定标值的校正

将脱盐液稀释 200 倍 ,用 SBA 法分别测定添加谷氨酸前后的含量 ,计算出回收率 ,推导出准确的定标值(见表 5).

表 5 SBA 法测定脱盐液中 Glu 定标值校正的测定
Tab.5 The determination of emendating the calibrating value of Glu in the desalting liquor with SBA method

No.	SBA 读数/ u_1	添加谷氨酸量/ ($\mu\text{g/L}$) A	SBA 读数/ u_2	回收率/ %
1	72.8	40.0	106.5	84.2
2	56.8	50.0	98.0	82.4
3	49.5	49.1	88.3	79.0

从表 5 看出 ,脱盐液的回收率为 80% ~83% ,建议定标应为 120~125.

2.3.5 SBA 法测定脱色液中 Glu 定标值的测定

将脱色液^[3]稀释 200 倍 ,用 SBA 法分别测定添加谷氨酸前后的含量 ,计算出回收率 ,推导出准确的定标值(见表 6).

表 6 SBA 法测定脱色液中 Glu 定标值的校正
Tab.6 The determination of emendating the calibrating value of Glu in the decoloring liquor with SBA method

No.	SBA 读数/ u_1	添加谷氨酸量/ ($\mu\text{g/L}$)	SBA 读数/ u_2	回收率/ %
2	42.6	50.0	83.3	81.4
4	48.4	50.2	89.0	80.9
6	47.4	45.2	84.7	82.5

从表 6 看出 ,脱色液回收率为 80% ~82% ,建议定标为 120~125.

2.4 SBA 法测定 Glu 定标值校正的验证

由表 6 可知 ,SBA 法测定脱盐液中 Glu 定标值校正为 125 ,稀释倍数为 200 ,对 SBA 定标值进行验证.

由表 7 看出 ,SBA 法测定脱盐液中 Glu 定标值为 125 时 ,添加谷氨酸量的回收率为 100 % ,由此说明 SBA 校正后的定标值是准确的 ,其他待测样品校正后的定标值经验证也是准确的.

表 7 SBA 法测定脱盐液中 Glu 定标值校正后的验证
Tab.7 The test of calibrating value after emendation in the determination of Glu from the desalting liquor using SBA method

No.	SBA 读数/ u_1	添加谷氨酸量/ ($\mu\text{g/L}$)	SBA 读数/ u_2	回收率/ %
1	72.0	39.3	111.4	100.3
2	66.8	49.1	116.0	100.0

另外作如下验证实验 :用 SBA 测定麸酸和味精 ,定标 100 时和旋光法基本一致 ,因为麸酸和味精都是以固体形式存在的 , NH_4^+ 几乎不存在 ,这也说明了铵根离子对 SBA 仪中的谷氨酸氧化酶膜有抑制作用.

3 结 论

用 SBA 生物传感议测定清洁生产^[4]各工段的样品时 ,因受 NH_4^+ 的影响 ,其定标都要进行相应的调整 ,除发酵液回收率在 91 % 左右外 ,其他样品回收率基本上都在 80 % ~ 83 % 左右 ,理论上将 SBA 定标校正为 120 ~ 125 ,就能较准确地测量样品中 L-谷氨酸的含量. 因此 ,味精清洁生产工艺中各样品定标建议为 :发酵液定标 108 ~ 110 ,等电母液和絮清液、四效浓缩液、脱盐液、脱色液定标均为 120 ~ 125.

参考文献 :

[1] 于信令. 味精工业手册[M]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1995. 570 – 587.
[2] 毛忠贵. 生物工业下游技术[M]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1999. 427.
[3] SMITH T J , MATHIAS L J. New methacrylate derivatives based on pyroglutamic acid[J]. **Polymer Preprints** , 2000 , 41 (2) : 1254 – 1255.
[4] 毛忠贵. 味精清洁生产技术——谷氨酸提取的闭路循环新技术[A]. 全国发酵行业环境保护和综合利用技术交流会文集 [C]. 北京 :中国发酵工业协会 ,2001. 79 – 83.

(责任编辑 杨 萌)

(上接第 518 页)

[2] OTTE S , SCHALK J , KUENEN J G. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis*[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology** , 1999 , 51 (2) : 255 – 261.
[3] GUPTA A B. *Thiosphaera pantotropha* : A sulphur bacterium capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. **Enzyme & Microbial Technology** , 1997 , 21 (8) : 589 – 595.
[4] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法(第三版) [M]. 北京 :中国环境科学出版社 ,1989.
[5] 金尚满 , 程英明 , 车喜善等. 对硝基苯胺—N , N—二甲基苯胺光度法测定痕量亚硝酸盐. 环境化学[J] , 1992 , 11 (3) : 75 – 77.
[6] YOO H , AHN K H , LEE H J , *et al.* Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor[J]. **Water Research** , 1999 , 33 (1) : 145 – 154.
[7] MULLER E B , STOUTHAMER A H , VAN VERSEVELD H W. Simultaneous NH_3 oxidation and N_2 production at reduced O_2 tensions by sewage sludge subcultured with chemolithotrophic medium[J]. **Biodegradation** , 1995 , 6 (4) : 339 – 349.
[8] JETTEN M S M. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system[J]. **Water Science Technology** , 1997 , 35 (9) : 171 – 180.

(责任编辑 杨 萌)