

离子色谱法检测解磷微生物发酵液中有机酸的方法研究

胡春明^{1*}, 姚波^{1,2}, 张远¹, 于涛¹, 席北斗¹, 魏自民^{1,3}

1. 中国环境科学研究院, 北京 100012

2. 中国科学院力学研究所, 北京 100190

3. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

【摘要】提出了采用高效离子交换色谱的方法测定不同时期的解磷菌发酵液中苹果酸等小分子有机酸的方法。在所选色谱条件下, 有机酸浓度和峰高呈现良好线性关系, 线性相关系数在 0.996 以上。各有机酸相对标准偏差在 1.07%-1.81%, 精密度良好。发酵液样品中几种酸的平均回收率在 95.76%-110.13%之间。在发酵过程中 5 种有机酸的总量呈先上升后趋于平缓的趋势, 发酵第 12d 的时候总量最高, 达 609.03mg/L。该方法用于定性和定量测定解磷菌发酵液中常见小分子有机酸的快速、有效方法。

【关键词】有机酸; 离子色谱; 发酵液; 变化趋势

Methodology of Determination of Organic Acids in the Fermentation Broth of Phosphate-solubilizing Microorganisms via Ion Chromatography

HU Chun-ming^{1,2}, XI Bei-dou¹, ZHAO Yue², WEI Zi-min^{2*}, YAO Bo^{1,3}

1. Chinese Research Academy of Environmental Science, Beijing 100012, China

2. Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

3. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

【Abstract】 The methodology of determination of small molecule organic acids such as malic acid in the fermentation broth of different fermentation stages of phosphate-solubilizing microorganisms via high performance ion-exchange chromatography was studied. And it is indicated that under the selected chromatographic conditions, the organic acid concentration and peak height showed a good linear relationship and precision, with linear correlation coefficients above 0.996 and relative standard deviations between 1.07% -1.81% of all organic acids under studies. The average recoveries of the organic acid under studies in the fermentation broth sample were between 95.76% -110.13%. The results suggested that the total amount of the five kinds of organic acids exhibited an initial increase and a subsequent flattening trend during the fermentation period, and attained a maximum of 609.03mg/L after 12 days' fermentation. It is suggested that the method is a fast and effective way for

qualitative or quantitative determination of small molecule organic acids in phosphate- solubilizing microorganism fermentation liquid.

【Key words】 organic acids; ion chromatography; fermentation broth; trends

目前,解无机磷微生物广泛应用于磷矿粉溶解及土壤固定态磷释放等领域。通常微生物解无机磷存在多种机制,多数研究者认为,其转化机理主要靠分泌有机酸溶解难溶性磷,因此,了解无机磷微生物分泌有机酸的强度对于评价其解磷能力具有十分重要的意义。由于有机酸的来源不同,其测定方法也存在明显的差异^[1-6]。综合来看,有机酸的测定方法主要有比色法^[7]、分光光度法^[8]及色谱法^[9]。由于比色法、分光光度法的灵敏度较差,分离效率低,近年来应用报道较少。而色谱法是近几十年来发展最快的一种分离分析手段,也是分离与检测有机酸的最有效的方法^[10-11]。通常在小分子有机酸的检测方面,液相色谱和气相色谱的应用较多,但这两种方法对所测物质的要求高,同时受干扰程度较大^[12]。离子色谱法是近年来应用较多的一种有效方法,其优点在于样品前处理简单,灵敏度高,可多组分同时测定,运行费用低,无需特殊试剂,淋洗液在线发生器与自动再生抑制器结合,只需高纯水就可完成分析,使分析结果的精密度和准确度明显提高^[13]。目前,采用离子色谱法检测解无机磷微生物发酵液中小分子有机酸的方法鲜有报导。因此,试验采用离子色谱法对解磷微生物发酵液中常见的小分子有机酸进行定性和定量描述,得到了满意的效果,所优化的条件为今后有机酸的分离和测定在应用上提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与主要试剂

ICS-2000 离子色谱仪(美国 Dionex 公司),配有 IonPac ASII-HC 阴离子分离柱(4mm), IonPac AGII-HC 阴离子保护柱(4mm), Dionex-ultra(4mm)电化学自再生抑制器, ED40 电化学检测器, ED40 淋洗液发生器。0.45 μ m 滤膜。

有机酸标准样品:乙酸(acetic acid)、琥珀酸(succinic acid)、苹果酸(malic acid)、草酸(oxalic acid)、柠檬酸(citric acid),均为分析纯。所有溶液均用 18.2 Ω 超纯水配制。

1.2 发酵菌剂

由中国环境科学研究院水环境系统研究室提供,采用均匀设计的方法获得的优化菌剂,由 4 株解磷菌和 2 株纤维素降解菌组合而成。

1.3 发酵培养基及发酵条件

发酵培养基:葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, NaCl 0.3g, KCl 0.3g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g, $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 0.03g, 磷矿粉 5g, pH 7.0-7.2, 蒸馏水 1000mL。

发酵条件:以不接种菌剂为对照,在 55 $^\circ\text{C}$ 、120r/min 条件下,摇床培养。

1.4 色谱条件

以 KOH 溶液为单一淋洗液,由 ED40 淋洗液发生器加 18.2 Ω 超纯水在线产生,浓度为 40mM,

流速为 1mM/min, 进样量为 10 μ L, 抑制器采用外加水电抑制。

1.5 有机酸标准曲线的制作

准确称取 0.2000g 苹果酸、琥珀酸、草酸、柠檬酸, 同时吸取乙酸 0.2000mL, 都用超纯水溶解, 定容至 1000mL 容量瓶中, 相当于 0.2g/L 混合标准溶液。在从中分别取 5、10、15、20、25、30、35、40mL 于 100mL 容量瓶中, 配成 10mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L、50 mg/L、60 mg/L、70 mg/L、80 mg/L 的标准系列溶液。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 建立方程。

1.6 样品预处理

分别取第 0、5、9、12、17、21、27 天的解磷菌剂发酵培养基(分别命名为 F₀、F₅、F₉、F₁₂、F₁₇、F₂₁、F₂₇), 加上未接菌的对照培养基, 于 10000r/min 的转速离心 10min, 取上清液经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 稀释 50 倍后直接进样。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择及标准图谱

离子色谱分离是基于淋洗离子和样品离子之间对树脂有效交换容量的竞争, 为了得到有效的竞争, 样品离子和淋洗离子应有相近的亲合力。像乙酸等小分子有机酸的分离应选用较弱的淋洗离子, 常用的弱淋洗离子有 HCO₃⁻、OH⁻等, 但当 OH⁻吸收了空气中 CO₂, 会变成 CO₃⁻, CO₃⁻淋洗强度较 HCO₃⁻和 OH⁻大^[14-15]。因此在淋洗液的选择上, 为解决 CO₂ 等对 OH⁻的干扰问题, 本离子色谱采用淋洗液在线发生器与自动再生抑制器相结合, 只需高纯水就可完成分析, 这样就可消除淋洗液以外其他杂质和空气中 CO₂ 的干扰, 同时排除由于在溶液配制过程中的人为操作等所引起的误差, 能明显提高分析结果的精密度和准确度^[13]。

又由于本离子色谱仪没有安装梯度淋洗插件, 所以对淋洗液的应用不能进行梯度淋洗。为了使每种有机酸的色谱图很好的分离, 因此在对 5 种标准品进行扫描时做了多次试验, 摸索最适条件, 最后试验对标准曲线的制作采用: 流动相为 40mM KOH, 流速为 1mL/min, 扫描时间 15min。在该淋洗条件下, 5 种有机酸于一次进样均可得到基线分离。

以峰面积定量, 以每个组分的保留时间定性, 采用混标加入法, 以标准品加入量为横坐标, 峰面积为纵坐标做标准曲线。混合标液标准曲线的色谱图(10mg/L)见图 1。

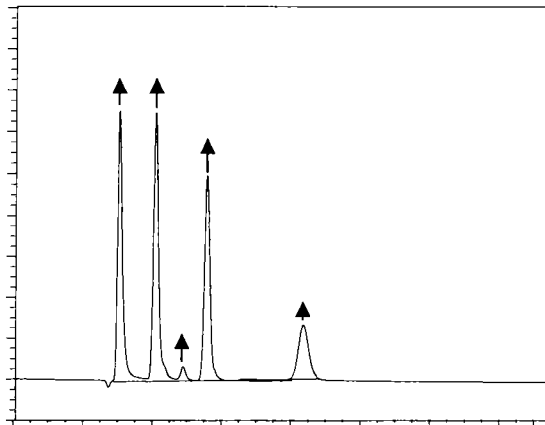


图 1 标准曲线的离子色谱图(10 mg/L)

Fig. 1 The iron chromatogram of the standard curve (10mg/L)

注: 1、乙酸 (10mg/L); 2、琥珀酸 (10mg/L); 3、苹果酸 (10mg/L); 4、草酸 (10mg/L); 5、柠檬酸 (10mg/L)

2.2 标准品的标准曲线及其线性范围、线性方程、线性相关系数、精密度及检出限

通过对 5 种有机酸混合标准溶液的 3 次平行测定, 得到各离子的线性方程, 并在各自的线性范围内计算出各待测有机酸组分的相关系数。取标准工作液 (50mg/L) 连续进样 5 次, 计算测定结果的相对标准偏差 (精密度); 取最小浓度 (10 mg/L) 混合标准液连续测定 5 次, 计算标准偏差, 以标准偏差的 2 倍计算检出限 (S/N=3), 具体结果见表 1。

表 1 5 种有机酸的线性范围、线性方程、线性相关系数、精密度及检出限

Table 1 Linear ranges, equations, correlation coefficients, precision and detection limit of the 5 organic acids

有机酸	线性范围 (mg/L)	线性方程	线性相关系数 (r)	RSD(%) (n=5)	检出限(μg/L) (S/N=3)
乙酸	10--80	$y = 0.0431x + 0.5787$	0.9968	1.62	0.015
琥珀酸	10--80	$y = 0.0956x + 0.8704$	0.9984	1.81	0.017
苹果酸	10--80	$y = 0.0026x - 0.0168$	0.9989	1.17	1.024
草酸	10--80	$y = 0.1161x + 0.4267$	0.9996	1.07	0.397
柠檬酸	10--80	$y = 0.0677x + 0.1906$	0.9996	1.21	0.143

5 种有机酸的浓度和峰高呈现良好线性关系, 线性相关系数均达 0.996 以上。各有机酸相对标准偏差最大为 1.81% (小于 2%), 说明精密度良好。检出限在 0.015-1.024μg/L 之间。

2.3 发酵液中有机酸含量的变化情况

根据浓度与峰面积的线性关系, 结合标准品有机酸的回收率及样品稀释倍数, 换算出利用离子色谱法测定的以上 7 组解磷菌发酵液样品中 5 种有机酸的含量, 见表 2。

表 2 每组发酵液样品中 5 种有机酸的含量

Table2 Amounts of the five organic acids in each fermentation broth(mg/L)

样品	乙酸	琥珀酸	苹果酸	草酸	柠檬酸	合计
F ₀	0	0	12.56	89.52	15.72	117.80
F ₅	0	0	192.76	79.02	47.85	219.63
F ₉	67.30	89.46	219.37	68.65	98.07	542.85
F ₁₂	93.55	129.93	234.60	57.60	93.35	609.03

F ₁₇	118.30	175.15	160.30	43.07	66.40	563.22
F ₂₁	111.90	181.00	154.10	31.43	99.37	577.80
F ₂₇	128.78	203.40	122.30	22.68	79.55	556.71

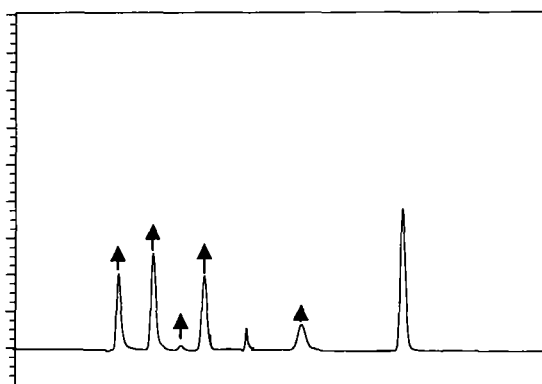


图 2 样品 F₁₂ 的离子色谱扫描图

Fig.2 The ion chromatogram of sample F₁₂

注：1.乙酸；2.琥珀酸；3.苹果酸；4.草酸；5.柠檬酸

从有机酸总量变化趋势的曲线图（图 3）我们可以看出，在发酵过程中有机酸的总量呈先上升后平缓下降的趋势，在发酵培养第 12d 的时候含量最高，达 609.03mg/L。这可能与解磷菌剂的菌株数量及活性有关，在发酵第 12d 时，组合菌株生长最旺盛，总体活性最强，所以所分泌的有机酸量就最多。同时与未接菌剂的对照组相比，有机酸总量随发酵时间的延长有明显增加（每个测定时期约增加 3 倍多），充分说明了接种菌剂对有机酸分泌的影响。

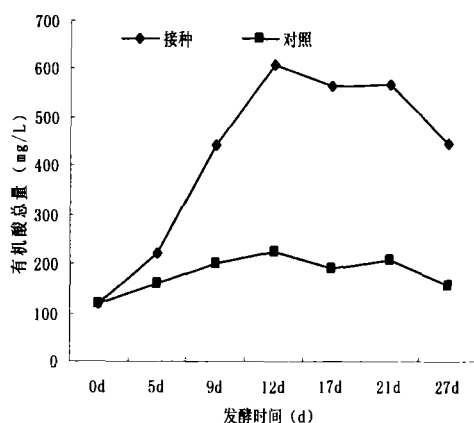


图 3 发酵液中有有机酸总量的变化趋势

Fig.3 Trends of total amount of organic acids in the fermentation broth

2.4 发酵液有机酸回收率的计算

连续测定F₅样品3次，取平均值作为样品中的离子浓度，然后在此样品中加入不同浓度的含有上述5种有机酸的标准溶液，连续测定此混合溶液的各有机酸浓度3次，取平均值作为实测值，计算各有机酸的回收率。结果如表3所示，样品回收率在95.76%-110.13%之间，可见此分析方法

以及该方法用于实际样品的测定均是可靠的。

表 3 离子色谱法测定 F₅ 样品中有机酸的回收率 (n=3)
Table 3 Recoveries of organic acids in sample F₅ determined by ion chromatography method (n=3)

有机酸	样品含量 (mg/L)	加标量 (mg/L)	测得量 (mg/L)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
乙酸	0	10.000	10.8093	108.093	103.54
		20.000	20.3364	101.682	
		30.000	30.2530	100.8433	
琥珀酸	0	10.000	11.7146	117.146	110.12
		20.000	22.3011	106.5055	
		30.000	32.0177	106.7257	
苹果酸	3.8552	10.000	13.0972	94.52913	95.76
		10.000	13.5530	97.81887	
		10.000	13.1533	94.93403	
草酸	1.5804	10.000	11.1577	96.34987	98.30
		20.000	21.6002	100.0917	
		30.000	31.0929	98.45632	
柠檬酸	0.9570	10.000	10.7843	98.42384	99.59
		20.000	20.9817	100.1179	
		30.000	31.0241	100.2168	

3 结论

应用离子色谱仪 ICS2000 对解磷菌发酵液中有机酸进行定性和定量描述的过程中,确定了最佳的淋洗条件,有力的揭示了解磷菌在不同发酵时间有机酸的变化情况,得到了满意的效果。该方法具有分离效果好、回收率高、定性及定量准确、分析时间较短等优点,对于解磷菌中其他菌剂发酵液中有机酸等物质的分离有着很好的参考价值。因此,用离子色谱测定解磷菌发酵液中的小分子有机酸是一种更为简单、快捷、准确的分析方法。

参考文献

- [1] 努尔古丽,冉竹叶,赵小峰,等. 高效液相色谱法定量测定采油微生物发酵液中的有机酸[J]. 分析测试技术与仪器, 2007, 13(2): 136-140.
- [2] 贾洪锋,贺雅非,李洪军,等. 高效液相色谱法测定发酵辣椒中的有机酸[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 374- 379.
- [3] 屈锋,刘克纳,牟世芬,等. 离子色谱法同时测定柠檬酸发酵液中无机阴离子和有机酸[J]. 环境化学, 1995, 14(5): 465- 470.
- [4] 邢宝立,王莉娜,林智平,等. 啤酒酿造过程中有机酸变化规律的分析研究[J]. 啤酒科技, 2007, 111(3): 17-22.
- [5] 王莉娜,邢宝立. 抑制型离子色谱法同时测定啤酒中有机酸与无机阴离子[J]. 啤酒科技, 2005, (7):28-31.
- [6] 徐伟,于刚,薛长湖,等. 抑制型离子色谱同时测定分离检测鱼酱油中的九种有机酸[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 306- 309.
- [7] KASAI Y, TANIMURA T, TANURA Z. Spectrophotometric determination of carboxylic acids by the formation of hydroxamic acids with dicyclohexylcarbodiimide[J]. Anal Chem, 1975, 47(1): 34-41.
- [8] FIGENSCHOU D L, MARAIS J P. Spectrophotometric method for the determination of microquantities of lactic

acid in biological material[J]. *Anal Biochem*, 1991, 195(2): 308-313.

- [9] 吴玉萍,宋春满,雷丽萍,等. 梯度淋洗离子色谱法测定烟草中的苹果酸、柠檬酸和阴离子[J]. *分析试验室*, 2006, 25(7): 31- 34.
- [10] 史亚利,刘京生,蔡亚岐,等. 离子交换色谱法同时测定啤酒中有机酸和无机阴离子[J]. *分析化学*, 2005, 33(5): 605- 608.
- [11] 林华影,林风华,盛丽娜,等. 淋洗液自动发生-离子色谱法同时测定食品中的21种有机酸[J]. *色谱*, 2007, 25(1): 107- 111.
- [12] 闫巍,焦霞,叶明立,等. 离子色谱法测定威力酸中的有机酸[J]. *分析试验室*, 2008, 27(2): 38- 40.
- [13] 傅彤,刘庆生,范志影,等. 应用离子色谱测定青贮饲料中有机酸含量的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2005, 32(5): 16- 17.
- [14] 牟世芬,刘克纳,丁晓静,等. 离子色谱方法及应用(第二版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005, 202-283.
- [15] 胡静,曹顺安,等. 分析有机酸与无机阴离子的梯度离子色谱法[J]. *分析测试学报*, 2003, 22(4): 83-85.