

重铬酸钾-DNS 比色法测定发酵液中乙醇含量

何 川, 章登政, 张 俊, 杨 肖, 苏 颖, 周蓬蓬, 余龙江*

(华中科技大学 生命科学与技术学院生物技术系, 分子生物物理教育部重点实验室, 中国湖北 武汉 430074)

摘 要: 发酵液中往往含有一些还原性物质, 如葡萄糖等, 用经典的重铬酸钾氧化比色法来测定发酵液中乙醇含量时, 往往出现结果偏大的现象. 为了测定发酵液中乙醇含量, 在经典重铬酸钾氧化比色法基础上, 使用 DNS 氧化比色法测定葡萄糖含量, 修正乙醇含量的测定结果. 统计分析发现, 经改良的重铬酸钾-DNS 比色法测定含葡萄糖的乙醇标准溶液时相对误差均值为 0.95%, 远小于传统的重铬酸钾氧化比色法的相对误差均值 18.07%, 在精密度相似情况下提高了准确度, 更适宜用于测定含葡萄糖等还原性成分的发酵液中乙醇含量.

关键词: 重铬酸钾-DNS 比色法; 定量测定; 含糖发酵液; 乙醇含量

中图分类号: O657

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2013)01-0001-04

Potassium Dichromate-DNS Colorimetric Determination of the Content of Ethanol in the Fermentation Broth

HE Chuan, ZHANG Deng-zheng, ZHANG Jun, YANG Xiao, SU Ying,
ZHOU Peng-peng, YU Long-jiang*

(Department of Biotechnology, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, Wuhan 430074, Hubei, China)

Abstract: Because the fermentation broth often contains some reducing substances, for example glucose, when we use the classic potassium dichromate oxidation colorimetric determination of the content of ethanol in the fermentation broth, the result is often too large. In order to determine the content of ethanol in the fermentation broth, using DNS oxidation colorimetric to measure the glucose content on the basis of the classic potassium dichromate oxidation colorimetric can correct the ethanol content of the measured results. The statistical analysis shows the relative average error of the improved potassium dichromate-DNS colorimetric measurement of glucose-containing ethanol standard solution is 0.95%, much smaller than 18.07%, the relative average error of the conventional potassium dichromate oxidation colorimetric. It improves the accuracy in the case of similar precision, so it's more suitable for the determination of the ethanol content in the fermentation broth containing glucose and other reducing ingredients.

Key words: potassium dichromate-DNS colorimetric; quantitative determination; sugar fermentation broth; ethanol content

(Life Science Research, 2013, 17(1): 001~004)

当今世界, 石油价格一涨再涨, 能源危机日益凸现. 在化石能源储量有限、短时间内不可再生的情况下, 许多国家更加重视生物能源的研究开

发, 生物乙醇已成为研究热点.

目前, 生物乙醇主要采用发酵工艺进行生产. 所以, 快速准确地分析发酵液中乙醇含量的方法

收稿日期: 2012-09-20; 修回日期: 2012-11-24

基金项目: 大学生创新创业训练计划项目(2010317); 国家自然科学基金资助项目(J1103514/J0106)

作者简介: 何川(1990-), 男, 江西高安人, 主要从事匹热迷能生物效应的相关研究; *通讯作者: 余龙江(1966-), 男, 湖北黄冈人, 教授, 博士生导师, 主要从事资源生物学与生物技术研究, Tel: 027-87792264-800, E-mail: yulongjiang@mail.hust.edu.cn.

非常重要. 已有的乙醇含量测量方法主要是密度计法、酒精计法、气相色谱法、重铬酸钾比色法、折射计法、莫尔氏盐法、碘量滴定法等^[1], 其中, 重铬酸钾氧化比色法作为一种常用的乙醇含量测定方法, 是利用在硫酸介质中, 乙醇可被重铬酸钾氧化, 生成三价铬, 通过在 600 nm 波长处测定吸光度计算乙醇含量, 测定乙醇的变异系数(RSD)为 3.60%, 回收率为 96.8%^[2], 具有成本低廉、操作简便迅速、不需要贵重仪器设备等优点. 但是, 该方法由于是采用重铬酸钾强氧化剂, 发酵液中存在一些还原性物质如未消耗的葡萄糖等, 也会与重铬酸钾发生氧化还原反应, 将明显影响测定结果. 为此, 针对 YPD 培养基 (yeast extract peptone dextrose medium) 发酵液中存在的主要非乙醇还原性成分葡萄糖, 本文以重铬酸钾氧化比色法测出的乙醇含量结果为粗测结果, 利用 DNS 试剂定量测定葡萄糖含量, 来修正粗测结果, 以提高测定结果的准确度.

1 材料与方法

1.1 材料

YPD 培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 5, 蛋白胨 10;

重铬酸钾溶液: 称取 5.00 g 重铬酸钾 (分析纯) 溶于 50 mL 水中, 加 10 mL 浓硫酸, 冷却后, 定容至 100 mL^[3];

DNS 试剂: 量取 750 mL 去离子水, 加热至微热后顺序加入 10 g 3, 5-二硝基水杨酸、16 g NaOH、5 g 苯酚、5 g 亚硫酸钠和 300 g 酒石酸钾钠, 溶解后定容至 1 000 mL, 棕色瓶中室温下暗处放置一周后使用^[4];

乙醇标准溶液: 称取分析纯无水乙醇 2 g 于 100 mL 容量瓶中, 定容至 100 mL;

葡萄糖标准溶液: 葡萄糖 105 °C 烘至恒重, 称取 1 g 于 2 000 mL 容量瓶中, 定容至 2 000 mL;

实验过程中选用电热恒温水浴锅、WFJ2000 型可见分光光度计、TGL-16c 台式离心机.

1.2 方法

1.2.1 发酵液乙醇含量的测定

取发酵液 10 mL, 12 000 转下离心 10 min, 取上清液作为待测液. 取 10 mL 比色管加入 2 mL 重铬酸钾溶液、1 mL 待测液, 蒸馏水定容至 10 mL, 沸水浴 10 min 后流水冷却至室温, 于波长 600 nm 测定吸光度, 根据重铬酸钾标准曲线回归方程算出乙醇粗测质量分数; 取 10 mL 比色管, 加入 1.5 mL

DNS 溶液、50 μL 待测液, 用蒸馏水定容至 10 mL, 沸水浴 5 min 后流水冷却至室温, 于波长 540 nm 测定吸光度, 根据 DNS 标准曲线回归方程算出葡萄糖质量分数, 这些葡萄糖在粗测结果中被误当作等摩尔的乙醇, 换算成乙醇即为: 乙醇误差量=葡萄糖质量分数×葡萄糖相对分子质量÷乙醇相对分子质量, 故乙醇含量的公式为:

$$\text{乙醇质量分数} = (\text{乙醇粗测质量分数} - \text{葡萄糖质量分数} \times \frac{23}{66}) \times 100\%$$

1.2.2 标准曲线制作

1.2.2.1 重铬酸钾标准曲线

取 8 支 10 mL 比色管, 分别加入 2 mL 重铬酸钾溶液以及适量乙醇标准溶液, 用蒸馏水定容至 10 mL, 沸水浴 10 min 后流水冷却至室温, 于波长 600 nm 测定吸光度, 以吸光度为横坐标, 乙醇含量为纵坐标(mL), 作标准曲线.

1.2.2.2 DNS 标准曲线

取 8 支 10 mL 比色管, 分别加入 1.5 mL DNS 试剂以及适量葡萄糖标准溶液, 用蒸馏水定容至 10 mL, 沸水浴 5 min 后流水冷却至室温, 于波长 540 nm 测定吸光度^[5], 以吸光度为横坐标, 葡萄糖含量为纵坐标(mL), 作标准曲线.

2 结果与分析

2.1 发酵液中各主要成分与两种试剂反应后的 OD 值对比

为验证 YPD 培养基中各主要成分对重铬酸钾测定和对 DNS 测定的影响, 在 10 mL 定容管中, 将 2%乙醇溶液、2%葡萄糖溶液、0.2%蛋白胨溶液、0.1%酵母粉溶液分别和 2 mL 重铬酸钾溶液、1.5 mL DNS 试剂反应, 分别在 600 nm 和 540 nm 处测定吸光度.

由表 1 可知, 在 YPD 培养基中, 对重铬酸钾法测定乙醇结果影响最大的物质为葡萄糖, 由表 2 可知乙醇、蛋白胨、酵母粉对 DNS 氧化法测定葡萄糖的结果均影响甚微, 故用 DNS 试剂将影响最大的杂质葡萄糖定量测定, 来修正重铬酸钾氧化比色法测定乙醇含量结果是可行的.

2.2 重铬酸钾氧化比色法与重铬酸钾-DNS 比色法的乙醇含量测定对比

2.2.1 重铬酸钾标准曲线及 DNS 标准曲线建立

两种测定方法的标准曲线的建立结果如图 1、图 2 所示.

表 1 各组分与重铬酸钾溶液反应后在 600 nm 处的吸光度

Table 1 The absorbance at 600 nm of every component's reaction with potassium dichromate solution

Ingredients	Water	2% ethanol solution (1 mL)	2% glucose solution (1 mL)	0.2% peptone solution (1 mL)	0.1% yeast extract solution(1 mL)
OD	0	0.514	0.290	0.028	0.069
values	0	0.512	0.293	0.027	0.066
	0	0.515	0.292	0.029	0.068

表 2 各组分与 DNS 试剂反应后在 540 nm 处的吸光度

Table 2 The absorbance at 540 nm of every component's reaction with DNS reagent

Ingredients	Water	2% ethanol solution(25 μ L)	2% glucose solution (25 μ L)	0.2% peptone solution (25 μ L)	0.1% yeast extract solution (25 μ L)
OD	0	0.009	0.375	0.003	0.005
values	0	0.008	0.377	0.003	0.004
	0	0.008	0.374	0.002	0.005

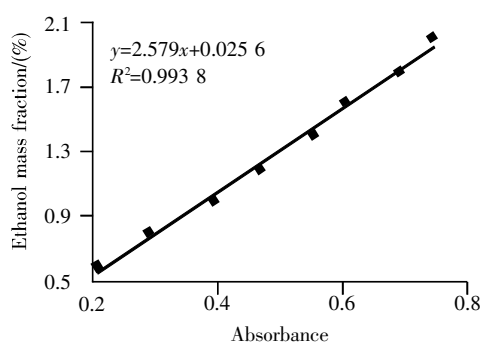


图 1 重铬酸钾标准曲线

Fig.1 Potassium dichromate standard curve

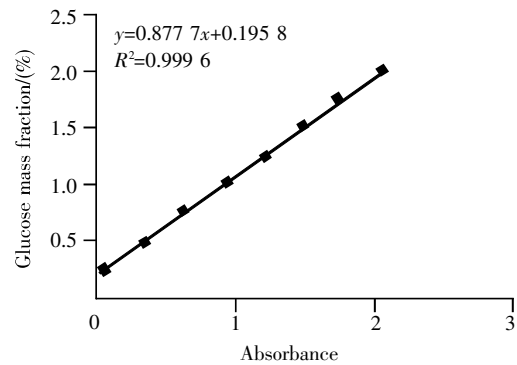


图 2 DNS 标准曲线

Fig.2 DNS standard curve

从图 1 可看出,乙醇质量分数在 0.6%~2.0% 的范围内与吸光度 A 值之间呈线性相关,线性回归方程为 $y = 2.579x + 0.0256$ ($R^2 = 0.9937$),其中 x 是吸光度, y 是乙醇质量分数。

从图 2 可知,葡萄糖质量分数在 0.25%~2.0% 的范围内与吸光度 A 值之间呈线性相关,回归方程为 $y = 0.8777x + 0.1958$ ($R^2 = 0.9996$),其中 x 是吸光度, y 是葡萄糖质量分数。两个回归方程 R^2 均大于 0.99,均可用于定量分析。

2.2.2 重铬酸钾氧化比色法与重铬酸钾-DNS 比色法的乙醇含量测定结果比较

两种方法测定乙醇含量的结果比较分析见表 3、表 4。

由表 3、表 4 可知,在测定含有葡萄糖的乙醇标准溶液时,旧法(重铬酸钾氧化比色法)回收率平均值和标准差分别为 118.07% 和 1.15%,变异系数为 0.98%,相对误差均值为 18.07%;而改良方法(重铬酸钾-DNS 比色法)回收率平均值和标准差分别为 100.44% 和 1.16%,变异系数为 1.16%,相对误差均值为 0.95%。在标准差与变异系数均相差不大的情况下,重铬酸钾-DNS 比色法测定结果的回收率比重铬酸钾氧化比色法测定结

果的回收率更接近真实值 100%,误差由 18.07% 下降至 0.95%。

2.3 测定结果的统计学检验

为了进一步验证表 3 的有效性,对表 4 两种方法的相对误差值作统计学检验,结果见表 5。

由表 3~5 可知,各组 P 值均小于 0.05,可拒绝两组数据差异来自随机误差的假设,在对 5 个不同水平的标准溶液的测定中,重铬酸钾氧化比色法误差均值均明显高于重铬酸钾-DNS 比色法的误差均值。由此可见,重铬酸钾-DNS 比色法的准确度明显优于重铬酸钾氧化比色法。

3 结论

经过改进后的新方法——重铬酸钾-DNS 比色法测定乙醇含量,由于排除了还原性物质葡萄糖的干扰,使测量误差减小,准确度上升,尤其在葡萄糖含量较高的发酵前期的发酵液中,该法可以替代原来的重铬酸钾氧化比色法更准确地测定发酵液中的乙醇含量。

由于发酵液中可能还存在葡萄糖以外的其他还原性物质,尽管有时含量很低,也会带来一定的测量误差。如果要进一步排除葡萄糖以外的其

表 3 两种方法测定乙醇的结果比较

Table 3 The result of two ethanol determination methods

Constituency	True mass fraction of ethanol	True mass fraction of glucose	OD		Mass fraction of glucose	Rough measurement	Corrected mass fraction of ethanol	Recovery rate of the old method	Recovery rate of this method	Relative error of the old method	Relative error of this method
	/(%)	/(%)	600	540	/(%)	of ethanol/(%)	/(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	0.40	0.20	0.155	0.021	0.214	0.482	0.407	120.51	101.84	20.51	1.84
1	0.40	0.20	0.153	0.020	0.213	0.478	0.403	119.40	100.81	19.40	0.81
1	0.40	0.20	0.149	0.021	0.214	0.469	0.394	117.17	98.51	17.17	1.49
1	0.40	0.20	0.149	0.017	0.211	0.469	0.395	117.17	98.82	17.17	1.18
2	0.80	0.40	0.369	0.232	0.399	0.957	0.818	119.66	102.26	19.66	2.26
2	0.80	0.40	0.362	0.229	0.397	0.942	0.803	117.72	100.43	17.72	0.43
2	0.80	0.40	0.366	0.231	0.399	0.951	0.812	118.83	101.47	18.83	1.47
2	0.80	0.40	0.371	0.227	0.395	0.962	0.824	120.21	103.01	20.21	3.01
3	1.20	0.60	0.571	0.464	0.603	1.406	1.196	117.16	99.64	17.16	0.36
3	1.20	0.60	0.574	0.460	0.600	1.413	1.204	117.71	100.30	17.71	0.30
3	1.20	0.60	0.570	0.465	0.604	1.404	1.193	116.97	99.43	16.97	0.57
3	1.20	0.60	0.577	0.469	0.607	1.419	1.208	118.27	100.63	18.27	0.63
4	1.60	0.80	0.783	0.689	0.801	1.877	1.598	117.29	99.86	17.29	0.14
4	1.60	0.80	0.783	0.686	0.798	1.877	1.599	117.29	99.91	17.29	0.09
4	1.60	0.80	0.780	0.691	0.802	1.870	1.590	116.88	99.40	16.88	0.60
4	1.60	0.80	0.792	0.685	0.797	1.897	1.619	118.54	101.18	18.54	1.18
5	2.00	1.00	1.008	0.910	0.995	2.376	2.030	118.82	101.49	18.82	1.49
5	2.00	1.00	0.999	0.908	0.993	2.356	2.010	117.82	100.52	17.82	0.52
5	2.00	1.00	0.993	0.912	0.996	2.343	1.996	117.15	99.79	17.15	0.21
5	2.00	1.00	0.990	0.905	0.990	2.336	1.991	116.82	99.57	16.82	0.43

注: 回收率为测定结果与真实值的比值, 回收率越接近 100% 表示结果越准确. 相对误差的计算方法为: 误差 = |回收率 - 100%|.

Notes: The recovery is the ratio of the measurement results and the true value, which is closer to 100%, the result is more accurate. The calculation method of relative error: error = |recovery - 100%|.

表 4 两种方法回收率的统计量描述

Table 4 The statistics description of the two recovery determination methods

	The minimum number of samples	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard deviation	Mean value of error	Coefficient of variation
Recovery of the old method	20	116.82	120.51	118.07	1.15%	18.07%	0.98%
Recovery of this method	20	98.510	103.01	100.44	1.16%	0.95%	1.16%

表 5 两种误差值的分组方差分析

Table 5 The variance analysis of two error values

Consti tuency	Summary				Variance analysis								
	Category	Sum	Mean	Variance	Differences source	SS	df	MS	F	P-value	F crit		
1	Error of old method	74.25	18.56	2.79	Between groups	593.918	1	593.918	398.118	5	1.03E ⁻⁰⁶	5.987	
	Error of this method	5.32	1.33	0.19	In groups	8.950	6	1.491	8				
2	Error of old method	76.42	19.11	1.17	Between groups	599.445	3	599.445	3	500.638	1	5.21E ⁻⁰⁷	5.987
	Error of this method	7.17	1.79	1.22	In groups	7.184	2	1.197	4				
3	Error of old method	70.11	17.53	0.34	Between groups	582.257	8	582.257	8	3155.94	2	2.14E ⁻⁰⁹	5.987
	Error of this method	1.86	0.47	0.03	In groups	1.106	98	0.184	5				
4	Error of old method	70	17.50	0.52	Between groups	577.83	1	577.83	1491.639	2	2.01E ⁻⁰⁸	5.987	
	Error of this method	2.01	0.50	0.26	In groups	2.324	3	0.387	4				
5	Error of old method	70.61	17.65	0.78	Between groups	577.320	2	577.320	2	1049.498	5	5.75E ⁻⁰⁸	5.987
	Error of this method	2.65	0.66	0.32	In groups	3.300	6	0.550	0				
Total	Error of old method	361.39	18.07	1.33	Between groups	2930.602	1	2930.602	3027.367	7	7.66E ⁻³⁸	4.098	
	Error of this method	19.01	0.95	0.61	In groups	36.785	4	0.968	0				

他还还原性物质对乙醇含量测定的影响, 还需要借助本文的改良思路, 进一步针对该还原性物质建立相应的标准曲线来修正测定结果.

目前, 测定乙醇含量多用气相色谱法, 其方便快速、精密准确的优点被绝大部分实验者所接

受, 但要在没有相应仪器设备的情况下测定发酵液中乙醇含量, 重铬酸钾-DNS 法在具备经典的重铬酸钾氧化比色法成本低廉、操作简便迅速等优点基础上, 具有更高的准确度, 更适宜作为乙醇含量的测定手段. (下转第 10 页)