

文章编号 :1009 - 038X(2002)03 - 0254 - 05

比色法快速测定发酵液中组氨酸

潘军华 , 张星元

(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 :对发酵液中组氨酸的快速测定方法——分光光度法进行了系统研究 ,确定测定时的最大吸收波长为 476 nm、组氨酸的检测范围为 3.9 ~ 31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,应用该法测定某动物蛋白质水解液中组氨酸的含量 ,并以氨基酸分析仪所测定结果作为参照 ,其相对偏差小于 5% .

关键词 :L-组氨酸 ;分光光度法 ;Paullly 反应

中图分类号 :Q 517

文献标识码 :A

The Colorimetric Method for Quick-Estimation of L-Histidine in the Fermentation Broth

PAN Jun-hua , ZHANG Xing-yuan

(The Key Lab of Industrial Biotechnology under Ministry of Education , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract :Based on several forerunners ' work on the colorimetric estimation of histidine , some critical parameters in this method are discussed comprehensively in this paper. The wavelength where the product of Paullly reaction displays maximum absorption was determined as 476 nm. The linear range of histidine amount suited for this method was 3.9 ~ 31.2 μg . The interference of temperature and reaction time could be neglected in this way. Under the conditions we adopted , the product of Paullly reaction was stable over 6 hrs. The interference of other amino acids which frequently existed in fermentation broth was permissible. This method , when applied to the determination of histidine in a sample of animal protein hydrolysates , gave the results well consistent with those obtained by other amino acids analyzer , and the relative error was below 5% .

Key words :L-Histidine ;colorimetric estimation ;paullly reaction

组氨酸是唯一通过 HMP 途径合成的氨基酸。其发酵法生产的研究即便是在国外也较少且进展缓慢 ,日本于 20 世纪 70 年代中期曾进行这方面的研究 ,但在 80 年代后就未见新的报道 ,国内对此研究也较少。

研究组氨酸生物合成法不仅填补了其发酵法生产的空白 ,而且在理论上 ,对于深入了解 HMP 途

径及该途径上关键节点的刚性、HMP 途径与 EMP 途径代谢流量分配的关系 ,以及如何从 HMP 途径的中间产物获得人们感兴趣的目的产物 ,也是相当重要的。组氨酸测定方法的研究是组氨酸微生物合成法的必备条件之一。为此 ,作者在前人研究的基础上 ,对发酵液中组氨酸的快速测定方法进行了一些初步的探讨 ,并对某些操作条件和参数进行了适

收稿日期 2001 - 11 - 06 ; 修订日期 2001 - 12 - 20.

作者简介 :潘军华 (1976 -) 男 ,湖北武汉人 ,发酵工程硕士研究生。

万方数据

当的改良.

1 材料与方法

1.1 仪器

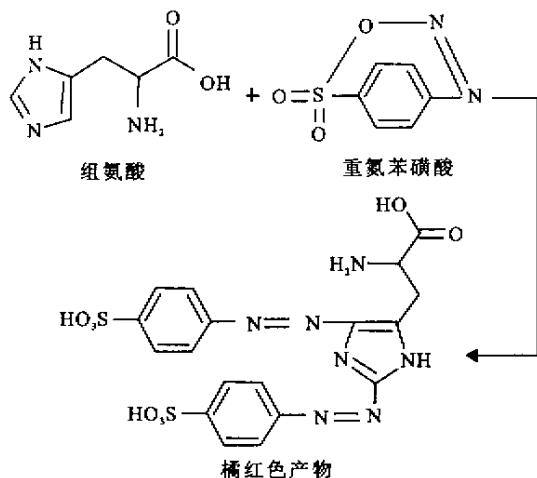
721 分光光度计,上海精密科学仪器有限公司产品;Himac CF7D2 型高速冷冻离心机,日立公司产品;U-3000 紫外-可见扫描仪,日立公司产品;超级恒温水浴槽,上海跃进医疗器械厂产品;电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;日立 835 氨基酸分析仪,日立公司产品.

1.2 试剂

各种氨基酸,层析纯,中科院上海生化所产品;对氨基苯磺酸,AR,上海第三试剂厂产品;动物蛋白质,中科院动物所提供;磺基水杨酸,AR,济宁市化学工业研究所提供;酸性蛋白酶,作者所在实验室自制;其他试剂均为分析纯.

1.3 原理

当有过量酸存在时,对氨基苯磺酸和亚硝酸钠可发生重氮化反应生成重氮苯磺酸,在弱碱性条件下,后者可与组氨酸发生偶联反应(Pauly 反应)^[6,7,9],形成橘红色的偶氮化合物.



重氮盐正离子作为亲电试剂,还可与酚类物质发生芳环上的亲电取代,生成偶氮化合物^[7,9].酪氨酸带有酚基侧链,它也可与重氮化的对氨基苯磺酸反应形成橘黄色化合物^[9].因此,在 20 种氨基酸中,酪氨酸最有可能直接干扰该方法的测定结果.

1.4 方法

1.4.1 比色法测定组氨酸的测定步骤 移取适当稀释的 His 溶液至 5 mL 的比色管中,加入 0.2 mL 1% 对氨基苯磺酸溶液和 0.2 mL 5% NaNO_2 溶液,混匀后使其反应 15 min,用刻度吸管快速吹入 10% 的 Na_2CO_3 溶液 0.6 mL,振荡 10 s 后,加入 2 mL

20% 乙醇溶液,混匀,同时盖上瓶塞室温下静置 5 min,定容至 5 mL,在 721 分光光度计上于 510 nm 处比色.

1.4.2 与氨基酸分析仪所测结果的对照

精确称取 1.0000 g 动物蛋白质,用 0.05 mol/L 的乳酸-乳酸钠缓冲液(pH 为 2.5 或 3.5)定容至 100 mL,0.1 MPa 灭菌 20 min.

取以上溶液 5 mL,加入作者所在实验室自制酸性蛋白酶液 5 mL,在超级恒温水浴槽中,40 °C 下,恒温反应 24 h,立即添加 10 mL 7% 的磺基水杨酸溶液终止酶反应.在高速冷冻离心机上,以 7 000 r/min 离心 5 min,用乳酸-乳酸钠缓冲液定容至 50 mL,并用氨基酸分析仪测定各种游离氨基酸的含量.

运用本法测定以上动物蛋白质水解液样品中组氨酸的含量,所得结果与氨基酸分析仪的测定结果进行对照.

2 结果与讨论

1920 年,有人依据重氮苯磺酸与组氨酸可发生偶氮反应的原理^[1],设计了组氨酸的比色测定法,但该方法颜色消退很快,并且需要烦琐的冰浴处理,碱浓度的变化对测定结果有较大影响.随后许多人对这种方法进行了广泛的研究.1942 年,H. T. Macpherson^[5]用对氨基苯磺酸和亚硝酸钠代替不稳定的重氮苯磺酸,以碳酸钠取代氢氧化钠调节反应体系至弱碱性,研究发现,加入 20% 乙醇有利于反应产物颜色的稳定.

2.1 Pauly 显色反应

2.1.1 最大吸收波长的确定

Hanke 与 Koessler 及其以前的研究者在研究该法时,都是通过滤光片获得透射光^[14,5];H. Fraenkel-Conrat 等使用的波长为 510 nm^[1];Pauly 反应产物在可见光范围内的吸收情况及最大吸收波长未见详尽报道,一般都认为在 510 nm 附近.为此,作者对此进行了一些探讨,结果如图 1 和图 2 所示.

经 UV3000 扫描分析,Pauly 反应产物在 476 nm 处具最大吸收峰.从图 1 可见,当显色剂的量一定时,加入不同量的组氨酸,可见光波长范围内扫描后都得两个吸收峰,一个在 476 nm,另一个则在偏紫外的 365 nm 附近,预计后者可能是由过量的组氨酸或是重氮化的对氨基苯磺酸吸收的.

图 2 是在 721 分光光度计上得到的 OD— λ 关系,可见,显色反应产物亦在 470 ~ 480 nm 间具有

最大吸收值.由此确定 ,Paully 反应产物的吸收波长为 476 nm.

由图 3 和图 4 可见 ,显色剂与组氨酸在偏紫外的波长范围内有很大的吸收 ,特别是显色剂 ,其过量很有可能影响测定样品的吸收.此外 ,显色步骤中先做纸层析 ,然后加 10% Na₂CO₃ 溶液显色 ,并未观察到 R_f 值不同的其他橘红色斑点(结果未列出).故而可以认为过量的显色剂或 His 对 475 nm 处吸收的影响都是可以接受的.

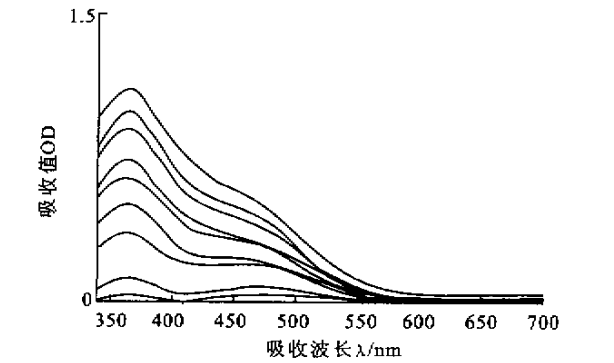


图 1 Paully 反应产物的 U-3000 扫描图
Fig.1 Scanning chart of products of Paully Reaction by U-3000 Scanner

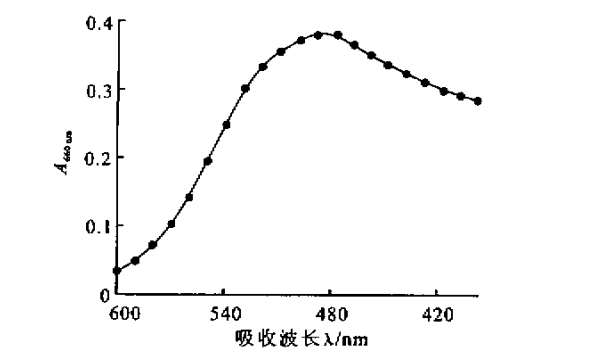


图 2 721 分光光度计上 OD—λ 关系
Fig.2 Relation of OD value and the wavelength of 721 Colorimeter

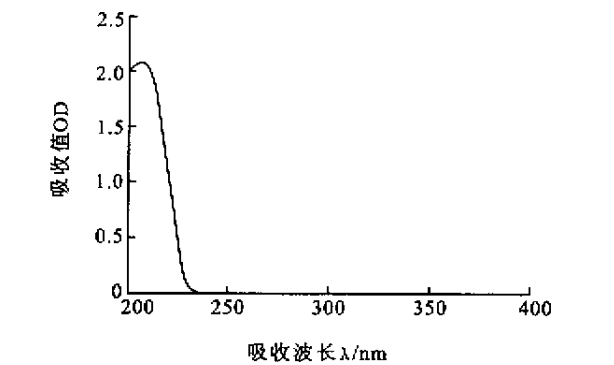


图 3 组氨酸的 U-3000 扫描图
Fig.3 Scanning chart of histidin by U-3000 Scanner

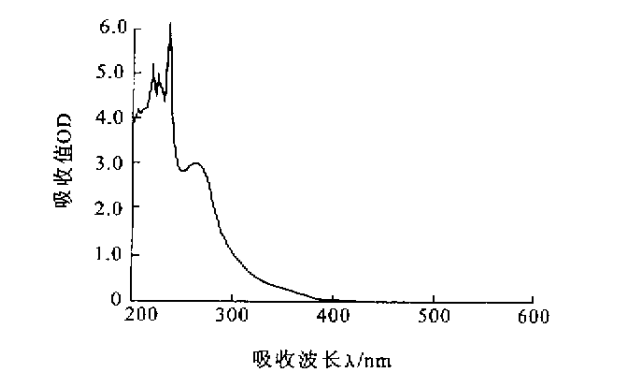


图 4 Paully 显色剂的 U-3000 扫描图
Fig.4 Scanning chart of Paully Reagent by U-3000 Scanner

2.1.2 反应时间对显色作用的影响及反应时间的确定

对于分光光度法 ,必须使显色反应反应完全才能进行 OD 值的测定 ,而在不影响结果的前提下 ,时间越短则该法应用起来越方便.

经过研究发现 ,反应 5 ~ 30 min 后进行比色 ,其结果差异不大 ,结果见表 1.

表 1 反应时间对显色反应的影响			
Tab.1 The effect of reaction time on the Paully reaction			
反应时间/min	OD _{476nm}	反应时间/min	OD _{476nm}
1	0.134	30	0.262
3	0.200	60	0.255
5	0.256	120	0.250
10	0.256	360	0.250

由表 1 可见 ,反应时间超过 5 min 后 OD 值已变化不大 ,超过 10 min 后基本持平 ,故而确定反应时间为 10 min.

2.1.3 温度对显色反应的影响 前人在进行比色法测定组氨酸的研究中 ,发现温度对显色反应有较大影响 ,一般在冰浴条件下较稳定 ,而温度高的时候显色反应的产物会不稳定 .H. T. Macpherson^[5] 发现 ,通过加入乙醇可以使所形成的颜色在室温 (25 ℃) 下保持稳定 .而作者在研究中发现 ,温度及乙醇的加入量对显色反应影响都不大 ,而在反应后按 1.4.1 中加入 20% 乙醇时的结果较稳定 .为方便起见 ,反应温度为室温即可 .

2.1.4 显色反应产物稳定性的研究

以前研究者遇到的问题就是偶氮化合物不稳定 ,所产生的橘红色会很快消退^[1,3,5,7] .作者测定了反应产物放置不同时间后的 OD 值以确定其稳定性 ,结果见表 2.

表 2 Paully 反应产物的稳定性

Tab.2 Stability of the products of Paully reaction							
静置 时间 <i>t</i>	His 质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)						
	0	7.8	15.6	23.4	31.2	39.0	46.8
10 s	0	0.140	0.238	0.414	0.500	0.679	0.708
15 min	0	0.146	0.238	0.418	0.514	0.708	0.710
1 h	0	0.140	0.240	0.415	0.520	0.702	0.712
6 h	0	0.116	0.250	0.399	0.499	0.675	0.708

由表 2 可见 ,显色反应还是比较稳定的 ,褪色现象也不明显 ,6 h 后仍能基本维持原来的 OD 值 ,而经过 10 s 的振荡就可进行 OD 值的测定了 .并且 ,不同质量浓度的组氨酸与显色剂反应后 ,其产物都比较稳定 .

2.1.5 其他氨基酸对该分析方法的影响

前已述及 ,Tyr 对该显色反应最可能产生干扰 ,而其他杂环氨基酸也是潜在的干扰源 ,发酵液中常见的几种氨基酸特别是含羟基或巯基的氨基酸如 Glu、Lys、Thr、Leu、Trp 对显色是否有影响也必须确定 ,实验结果见表 3 .

表 3 其他氨基酸对组氨酸比色测定法的影响
Tab.3 The effects of other amino acids on the colorimetric estimation of histidine

氨基酸	OD _{476nm}			OD _{476nm} (另加 5 $\mu\text{g/mL}$ 组氨酸)			相对 干扰 强度/ %
	0.5	5	50	0.5	5	50	
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	
Glu	0.002	0.003	0.004	0.406	0.412	0.452	1.98
Lys	0.006	0.010	0.040	0.405	0.408	0.420	0.99
Thr	0.002	0.004	0.008	0.404	0.410	0.440	1.49
Leu	0.002	0.006	0.010	0.402	0.408	0.418	0.99
Trp	0.010	0.102	0.181	0.408	0.452	0.500	11.9
Tyr	0.016	0.120	0.224	0.410	0.502	0.522	24.3

有研究表明 ,大量精氨酸存在的情况下(组氨酸质量浓度的 20 倍以上)对结果没有影响 ,由表 3 可见 ,赖氨酸、谷氨酸、苏氨酸、亮氨酸、色氨酸等在一定质量浓度范围内对测定也没有明显的影响 ,当质量浓度偏高时对曲线的线性相关系数则有轻微影响^[5] .色氨酸、酪氨酸一般在发酵液中质量浓度极低 ,而酪氨酸在水中的溶解度更是很低 ,其对测定的影响也在可允许的范围内 .

2.1.6 线性范围的确定

经过以上研究和分析 ,作者认为 Paully 反应可作为低含量组氨酸快速测定方法的依据 ,故而对该显色反映的线性范围进行了研究 ,结果如图 5 所

示 .

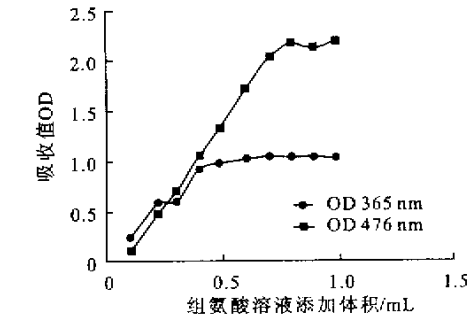


图 5 His 测定线性范围的确定

Fig.5 The linear range of colorimetric estimation of histidine

当组氨酸溶液添加量为 0.1 ~ 0.8 mL 时 ,OD_{476nm}与组氨酸的量之间呈直线关系 ,组氨酸添加量大于此值 ,则 OD_{476nm}值趋于平稳 ,故而初步确定该测定方法的线性范围为 3.9 ~ 31.2 $\mu\text{g/mL}$.推测为杂质峰的 OD_{365nm}在组氨酸溶液添加量至 0.5 mL 后 OD 值基本趋于平稳 .

2.1.7 标准曲线的制作

分别取组氨酸标准溶液 0 ,0.2 ,0.4 ,0.6 ,0.8 ,1.0 ,1.2 mL ,按 1.4.1 所述方法测定 OD_{476nm} ,所得结果列于表 4 ,作标准曲线如图 6 所示 .

表 4 比色法测定组氨酸的标准曲线
Tab.4 The standard curve for colorimetric estimation of histidine

His 质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)		His 质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	
OD _{476nm}		OD _{476nm}	
0		31.2	
7.8		39.0	
15.6		46.8	
23.4			

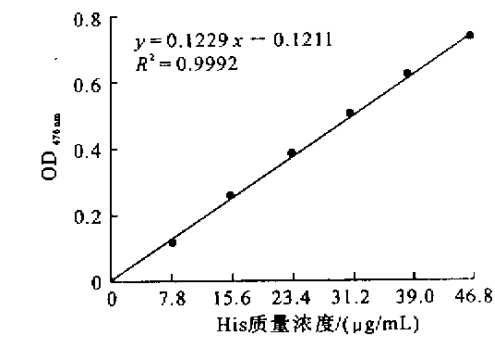


图 6 比色法测定组氨酸的标准曲线

Fig.6 The standard histidine curve

由图 6 可见 ,在 0 ~ 46.8 $\mu\text{g/mL}$ 范围内 ,OD_{476nm}与组氨酸质量浓度呈线性关系 ,其线性相关系数为 0.9992 ,基本满足发酵液中组氨酸的测定要

求.

2.2 与氨基酸分析仪分析结果的比较

动物蛋白质水解液的氨基酸组成比较复杂(氨基酸分析结果未列出),可模拟实际应用时的测定样品,作者运用本法测定了其中组氨酸的含量,并以氨基酸分析仪的分析结果作为参照进行比较,以检验本法的实际应用性.动物蛋白质水解液以氨基酸分析仪和以本法测定的结果对照见表 5.

表 5 参照分析方法与比色法测定结果的对照

Tab.5 Comparison of this method with the control

水解液样	组氨酸质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)		相对偏差/ %
	比色法	参照方法	
1	1.98	1.91	3.66
2	6.01	5.93	1.35
3	7.76	7.52	3.19
4	15.05	13.22	1.38

由表 5 可见,比色法与氨基酸分析仪的分析结果相比,相对偏差不超过 5%,基本上可满足实际应用的要求.

3 结 语

Paullly 反应产物的最大吸收峰在 476 nm 处.室温下添加 20%的乙醇溶液,显色产物稳定,静置 6 h 以上 OD 值没有明显衰减,因此测定可在室温下进行.在本文所述测定条件下,Paullly 反应产物吸光值在 0.1 ~ 0.8 的范围内与组氨酸质量浓度呈线性关系,其线性相关系数为 0.9992.比色法测定结果与氨基酸分析仪所测定的结果相比较,相对偏差不超过 5%.

运用比色法测定组氨酸的含量,简单、快速,准确性也比较好,对仪器的要求不高,适合于工业生产中发酵液中组氨酸的快速测定.

参考文献：

[1] FRAENEL-CONRAT H , SINGER B. A new technique for the analysis of histidine , tyrosine , methionine and arginine in protein hydrolysates[J]. **Arch Biochem Biophys** , 1956 , 65 : 296.

[2] RORBINS. Methods of Biochemical Analysis[M]. New York :John wileg & Sons LTD ,1969.

[3] DARBRE A. Practical protein chemistry ——a handbook[M]. New York :John Wiley & Sons LTD , 1986.

[4] MACPHERSON H T. The basic amino-acid content of proteins[J]. **Biochem J** , 1946 , 40 : 470.

[5] MACPHERSON H T. Modified procedures for the colorimetric estimation of arginine and histidine[J]. **Biochem J** , 1942 , 36 : 59.

[6] BLACKBURN S. Amino acid determination[M]. New York :Marcel Dekker Inc , 1978.

[7] 邢其毅.基础有机化学(下册)[M].北京 :高等教育出版社 ,1994.

[8] 吴显荣.氨基酸[M].北京 :北京农业大学出版社 ,1988.

[9] 花文廷.杂环化学[M].北京 :北京大学出版社 ,1990.

(责任编辑 杨 萌 朱 明)

《冷饮与速冻食品工业》杂志征订、征稿、征求广告启事

《冷饮与速冻食品工业》杂志是经国家新闻出版总署批准出版、国家教育部主管、江南大学主办、面向国内外公开发行的国家级专业技术类刊物,是冷饮与速冻食品行业广大基层决策者、科研人员、生产经营者研究开发新品、开拓产品市场的良师益友。邮发代号 :28 - 190,全国各地邮局均可办理订阅。欢迎各界人士订阅、赐稿、惠登广告。

邮政编码 :214063 ; 联系地址 :江南大学龙山校区 160 信箱 ;
联系电话 :0510 - 5512561 ; E - mail :csbfj@sytu.edu.cn。