

文章编号:1673-1689(2006)04-0056-03

发酵液中 L-组氨酸的定性定量测定

何俊锋, 张伟国*

(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:以组氨酸的茚三酮显色和 Pauly 特征显色为根据,研究了发酵液中 L-组氨酸的定性、定量测定。确立了以 Pauly 试剂和茚三酮试剂纸层析显色来定性测定组氨酸;茚三酮显色-分光光度法来定量测定发酵液中 L-组氨酸,并对测定条件进行了研究。

关键词:组氨酸;发酵;测定;纸层析

中图分类号:Q 815

文献标识码:A

Qualitative and Quantitative Determination of L-Histidine in Fermentation Broth

HE Jun-feng, ZHANG Wei-guo*

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

Abstract: On the basis of the chromatic reaction of histidine with pauly reagent and ninhydrin, the qualitative and quantitative determination of L-Histidine in fermentation broth was studied. In this study, a method of qualitative determination of L-Histidine by the combination of pauly reagent and ninhydrin was established. After the chromatic reaction of histidine with ninhydrin, a colorimetric method was used to quantitatively determine the content of L-Histidine, and the optimal condition of the determination was also established.

Key words: L-histidine; determination; fermentation; paper chromatography

最初, L-组氨酸的生产是从蛋白水解液中进行提取^[1], 测定其含量时其它氨基酸产生了很大的干扰。因而有人根据重氮苯磺酸与组氨酸可发生偶氮反应的原理, 设计改良了组氨酸的 Pauly 显色法测定^[2]。利用该法进行测定, 可排除其它氨基酸对其测定的影响。然而在实现发酵法生产 L-组氨酸以后, 未见到完全利用此法对发酵液中的 L-组氨酸进行测定的报道。另外鉴于茚三酮和氨基酸的特征显色, 曾有人利用茚三酮对发酵液中的 L-组氨酸进行定性测定^[3], 而且也有茚三酮显色后洗脱来定

量测定其它氨基酸的报道^[4-5]。对于发酵液中的 L-组氨酸也有人采用纸层析后荧光法鉴别, 然后洗脱 Pauly 显色后比色^[6] 也有人提及利用茚三酮和 Pauly 显色来定性测定发酵液中的 L-组氨酸, 仪器直接定量测定^[1], 但较为繁琐且均未有详尽报道。

对于成分复杂的发酵液, 能否利用 Pauly 特征显色抑或茚三酮显色完成组氨酸的定性、定量测定值得探究。因而我们以组氨酸的茚三酮显色和 Pauly 特征显色为根据, 对发酵液中 L-组氨酸的定性、定量测定进行了研究。

收稿日期: 2005-06-25; 修回日期: 2005-09-22.

基金项目: 湖北省科技攻关项目 (2004AA302A01).

作者简介: 何俊锋 (1982-), 男, 河南洛阳人, 生物工程硕士研究生; * 责任作者。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

以 L-组氨酸产生菌 AJ88(本实验室保藏菌株)为实验菌株。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 100,(NH₄)₂SO₄ 30,玉米浆 5,KH₂PO₄ 1,MgSO₄·7H₂O 0.5,CaCO₃ 20。(灭菌前 pH 7.0)

1.2 菌体培养

在装有 15 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中接入种子,在往复式摇床上 30℃,震荡培养 72 h,转速为 100 r/min。

1.3 Pauly 试剂的配制

甲液:称取 0.9 g 对氨基苯磺酸,加热溶解,加入 9 mL 浓盐酸,定容到 100 mL。使用时在 0℃下与等体积 5%亚硝酸钠水溶液相混合(不宜久置)。

乙液:10%碳酸钠水溶液。

1.4 纸层析分析

1.4.1 层析 用微量进样器吸取一定量的发酵上清液,注射在宽 15 cm 的滤纸上,离纸下端 1.5 cm,每样品间距 1.5 cm。放入层析缸上行展开至约 13 cm 处,即停止层析。

1.4.2 显色

1) Pauly 试剂显色:采用层析剂为正丙醇:0.2mol/L 氨水(V/V)=3:1^[6],展开完毕后,105℃烘干 5 min,先用 Pauly 试剂甲液涂布滤纸,然后再用乙液涂布。

2) 茚三酮显色:采用层析剂为甲醇:水:10 mol/L 乙酸:吡啶(V/V)=80:17.5:2.5:10^[3],展开完毕后,用热风吹干滤纸,用 0.5%茚三酮丙酮溶液显色,105℃烘干 5 min。

1.5 Pauly 比色分析

将发酵液在 10 000 转/min 下离心 10 min,取上清液,稀释一定倍数,分别加入甲液 1 mL,乙液 1 mL,显色 10 min,在 476 nm^[7]下进行比色测定。

1.6 茚三酮比色分析

将茚三酮显色对应的斑点剪下,放入有 3 mL 体积分数 75%乙醇:0.1%CuSO₄·5H₂O=38:2(v/v)^[4]洗脱液的试管中进行洗脱 30 min,用 721 分光光度计在 510 nm 处、光程 1 cm 进行测定。

2 结果与分析

2.1 定性检测结果

2.1.1 Pauly 试剂显色 实验发现,发酵液中除组氨酸显橘红色斑点外,还可能出现一些杂斑。这是

因为 Pauly 试剂可以同一些含有咪唑衍生物反应显色,根据前人对咪唑衍生物的 R_f 值的研究^[8],基本可以确定这些杂斑所对应的物质。如表 1 所示。

表 1 发酵液纸层析显色斑点的 R_f 值及其所对应物质

Tab.1 R_f values of histidine and imidazoles in fermentation broth on paper chromatography

物 质	颜 色	正丙醇:	正丙醇:
		0.2 mol/L 氨水 3:1	1 mol/L 醋酸 3:1/(V:V)
组氨酸	橘红色	0.22	0.12
咪唑乳酸	橘红色	0.26	0.27
鸟嘌呤橘	黄色	0.27	0.35
咪唑丙酮酸	橘红色	0.31	0.31
5-氨基咪唑酰胺	蓝 色	0.52	0.51
组氨醇	红 色	0.65	0.28

2.1.2 茚三酮显色 茚三酮显色时,关键是要选出一种能够较好的将 L-组氨酸与其它氨基酸分离的层析剂。发酵液中可能会出现、R_f 值与组氨酸相近的是谷氨酰胺和甘氨酸,丝氨酸,精氨酸及赖氨酸。经几种层析剂层析后显色结果如表 2 所示。

表 2 不同层析剂中几种氨基酸的 R_f 值

Tab.2 The R_f value of kinds of amino acids in different solvent system

氨基酸	R _f			
	①	②	③	④
谷氨酰胺	0.24	0.17	0.28	0.15
甘氨酸	0.25	0.22	0.28	0.15
组氨酸	0.25	0.16	0.22	0.16
丝氨酸	0.27	0.23	0.35	0.16
精氨酸	0.20	0.23	0.34	0.14
赖氨酸	0.12	0.18	0.33	0.12
层析时间	4.0	4.0	3.0	3.5

注:①正丙醇:0.2 mol/L 氨水(V/V)=3:1,②正丙醇:1 mol/L 醋酸(V/V)=3:1^[8],③甲醇:水:10 mol/L 乙酸:吡啶(V/V/V)=80:17.5:2.5:10,④正丁醇:乙酸:水(V/V/V)=4:1:1^[1]

由表 2 可以看出第三种层析效果较好,时间也较短,因而选用第三种层析剂进行层析。

因纸层析存在着一定的误差,且 Pauly 试剂显色和茚三酮显色中干扰物质与组氨酸的 R_f 值之间相差不是特别大,故同时采用两种显色方法对组氨酸进行定性。

2.2 定量检测结果

2.2.1 发酵液 Pauly 比色结果 实验发现,当在稀

释后的发酵液离心上清液中加入 Pauly 试剂乙液(10%碳酸钠溶液)时,溶液变浑浊,从而无法进行比色测定。经分析为碳酸根离子引起沉淀。

因碳酸钠引起沉淀,实验中将碳酸钠替换为 $\text{NH}_4\text{Cl}\text{-}\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ 缓冲溶液和 10% 的 NaNO_3 溶液^[9]。结果发现,显色后溶液偏黄。经分析溶液偏黄是由铵离子引起的。而发酵培养基中含有大量硫酸铵,虽经菌体利用,但可能还有残留的铵离子,会影响 Pauly 比色。

而且考虑到发酵液中可能会出现咪唑衍生物会影响组氨酸的比色,故不采用直接比色法测定,而采用显色后洗脱比色测定。

2.2.2 两显色剂显色洗脱后颜色比较 Pauly 显色进行洗脱(体积分数 20%乙醇)后颜色较浅,因而其灵敏度不高,而相对来说,茚三酮显色洗脱后颜色较为明显,故采用茚三酮显色后洗脱比色来定量测定发酵液中的 L-组氨酸。

表 3 两显色剂显色后洗脱液颜色
Tab.3 Color development of L-Histidine with different color reagent

	L-His 含量/ μg						洗脱液颜色
	2	4	6	8	10	12	
茚三酮显色	+	+	+	++	++	+++	紫红色
Pauly 显色	-	-	-	-	-	+	红色

注:“-”表示基本无颜色;“+”表示有颜色;“+”越多表示颜色越深

2.2.3 茚三酮比色条件的确定

1) 洗脱液最佳吸收波长的测定

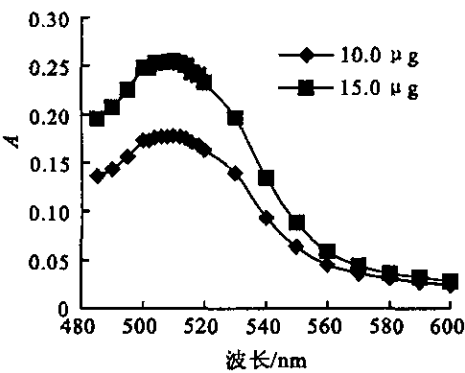


图 1 不同波长下对应的洗脱液吸光度
Fig. 1 Relationship between absorbency and absorb wavelength

从图 1 可以看出,最佳吸收波长为 510 nm,此值和其它氨基酸茚三酮显色后洗脱液最佳吸收波长^[3-4]相近。

2) 最佳洗脱时间的测定

L-组氨酸点样量为 20.0 μg ,显色洗脱后放置不

同时间,测定洗脱液的吸光度(A_{510}),实验发现,当洗脱时间为 30 min 时,吸光度达到最大值,放置时间继续延长,吸光度基本无变化。所以洗脱时间选用 30 min。

3) 线性范围的确定

将 2~20 μg 的 L-组氨酸点样显色后用洗脱液洗脱,再比色分析。实验发现,当滤纸上点样量大于 12 μg 时,洗脱液的吸光度线性较差,滤纸上的点样量为 2~12 μg 时呈现了较好的线性,因而本实验中标准曲线的测定范围在 2~12 μg 。

2.2.4 L-组氨酸标准曲线的测定 在最佳吸收波长 510 nm、洗脱时间为 30 min 的条件下,测定了 L-组氨酸的标准曲线。如图 2 所示。

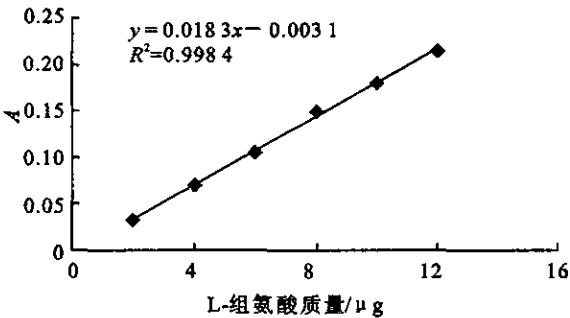


图 2 L-组氨酸标准曲线

Fig. 2 The standard curve of L-histidine

从图 2 可以得出,当纸层析斑点所含的组氨酸在 2~12 μg 时,OD 值和组氨酸含量之间有很好的线性关系。可以作为定量分析的标准曲线。

2.2.5 方法的精密度试验 对含 1.83 g/L(氨基酸分析仪测定值)的 L-组氨酸的发酵液进行了 5 次平行测定,其标准偏差为 0.015,相对标准偏差为 0.825,说明该方法精密度较好。

3 结 论

通过对发酵液中 L-组氨酸的定性、定量测定进行研究,得出了如下结论:

1) Pauly 显色可初步定性发酵液中的组氨酸,但发酵液中可能存在的咪唑衍生物会干扰其定性。而 Pauly 显色和茚三酮显色相结合可以准确地定性发酵液中的组氨酸。

2) Pauly 试剂乙的加入会使发酵液上清液产生浑浊,且铵离子对 Pauly 显色有一定的影响,因而 Pauly 比色法不适合用来定量测定发酵液中的组氨酸。

3) 定量测定发酵液中的组氨酸时采用纸层析显色后洗脱再比色。Pauly 显色洗脱后颜色较淡且不稳定,灵敏度较差, (下转第 112 页)

序列的功能特征提供新的研究方法。事实上,这种方法也适用于其它蛋白功能特征的研究。

本工作在原序列基因设计时没有加入限制性酶切位点,主要是基于两个方面的考虑:(1)用多重 PCR 扩增全基因,由于 Seq4 和 Seq5 进行延伸反应只有一个循环反应,无法提纯产物,导致最终反应体系复杂化,杂带较多。用重新设计的引物可以大大增加扩增条带的特异性。(2)在原序列中没有设计限制性内切酶位点可以使实验更加灵活。通过简单的 PCR 扩增就可以为目的片断接入不同的限制性酶切位点,这将为全基因尝试不同表达载体提

供方便。重组子的鉴定有多种方法,利用 PCR 技术鉴定重组子不仅快捷方便,而且准确性也很高,是一种非常值得推广的方法。但 PCR 容易被污染,所以在重组子鉴定时最好以双蒸水为模板设置空白对照。

基因的成功克隆为多肽表达奠定了基础,本实验计划将抗菌肽基因以融合蛋白的方式在大肠杆菌中表达,融合蛋白分离纯化后经溴化氰定点切割,除去担体蛋白后得到目的片断,最终通过对 4 条设计多肽抗菌活性的比较,研究其构效关系。有关 4 条抗菌肽基因的表达及活性研究将另文报道。

参考文献:

[1] Jaynes J M, Xanthopoulos K G, Destéfano-Beltrán L, et al. Increasing bacterial disease resistance in plants utilizing anti-bacterial genes from insects[J]. **Bioassays**,1987, 6: 263—270.

[2] Boman HG, Wade D, Boman IA, et al. Antibacterial antimalarial properties of peptide that are cecropin-mellitin hybrids [J]. **FEBS Lett**, 1989,259:103—106.

[3] 李启辉. 以天蚕素为基础的抗菌肽设计及其基因表达[D]. 无锡:江南大学,2004.

[4] Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases[J]. **Nucl Acids Res**,2000, 28, 292.

[5] 郭小兵. 毕赤酵母高效表达重组阿片生物活性肽[D]. 无锡:江南大学,2003.

[6] J. 萨姆布鲁克,D. W. 拉塞尔. 分子克隆试验手册指南(上册)[M]3 版. 黄培堂译. 北京:科学技术出版社,2002:55—138.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 58 页)

而茚三酮显色洗脱后效果较好,适合比色。比色时,最佳吸收波长为 510 nm,最佳洗脱时间为 30 min,当所点组氨酸含量在 2 ~12 μg 范围内时呈现较好的线性。

4) 以 Pauly 试剂和茚三酮试剂纸层析显色,茚三酮显色-分光光度法来测定 L-组氨酸易于实现、精密度较好,适合在菌种选育过程中定性、定量测定发酵液中的 L-组氨酸。

参考文献:

[1] Kisumi M, Nakanishi N. L-Histidine production by histidiase-less regulatory mutants of *Serratia marcescens* constructed by transduction [J]. **Appl Envi Micro**, 1977, 34(5): 465—472.

[2] Macpherson H T. The basic amino-acid content of proterins [J]. **Biochem J**, 1946, 40: 470—481.

[3] Derkos-Sojak V, Korajlija J, Vladimir Delic. Histidine production by a regulatory mutant of *Streptomyces coelicolor* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1977,34(6):621—625.

[4] 卢发,张伟国. 纸层析—分光光度法测定发酵液中 L-丝氨酸和甘氨酸的含量[J]. **食品与发酵工业**. 2005, 31(3):119—121.

[5] 李进,张伟国. 纸层析—分光光度法测定发酵液中 L-异亮氨酸[J]. **无锡轻工大学学报(食品与生物技术)**,2005,24(1):95—98.

[6] Araki K, Kato F, Arai Y, et al. Histidine Production by auxotrophic histidine analog-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Agr Biol Chem**, 1974, 38(1): 189—194.

[7] 潘军华,张星元. 比色法快速测定发酵液中组氨酸[J]. **无锡轻工大学学报(食品与生物技术)**,2002,21(3):254—258.

[8] Ames B N. The biosynthesis of histidine in neurospea grassa [D]. USA: California Institute of Technology, 1953.

[9] 林妙佳,蒙绮芳,周锡梁. 组氨酸生产中间控制方法的研究[J]. **氨基酸和生物资源**,2001,23(4):28—31.

(责任编辑:杨 萌)