

文章编号:1673-1689(2008)06-0111-04

## 发酵液中 L-谷氨酰胺的定性定量测定

王霞, 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 214122)

**摘 要:** 应用纸层析—分光光度计法对发酵液中 L-谷氨酰胺进行了定性分析和定量测定, 确立了 L-谷氨酰胺定量测定条件。研究结果表明, 该法对测定 L-谷氨酰胺含量具有较高的准确度和精密性, 而且该法操作简单, 易于掌握, 非常适合在 L-谷氨酰胺产生菌筛选中应用。

**关键词:** L-谷氨酰胺; 纸层析法; 定性定量; 测定

**中图分类号:** TS 920.1

**文献标识码:** A

## Qualitative and Quantitative Determination of L-glutamine in Broth

WANG Xia, ZHANG Wei-guo\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** A process to determine the concentration of L-glutamine in fermentation broth, by paper chromatography and spectrophotometer, was developed in this manuscript. The results showed that the method is highly accurate and precise in the determination of L-glutamine. It has been proven to be easy operate and be suitable for the screening of strains producing L-glutamine.

**Key words:** L-glutamine; paper chromatography; qualitative and quantitative; determination

L-谷氨酰胺(L-glutamine)是 L-谷氨酸  $\gamma$ -羧基酰胺化的一种氨基酸, 其分子式为  $\text{NH}_2\text{OC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ 。它具有许多特殊的功能, 被归类为条件必需氨基酸<sup>[1-2]</sup>。目前国外临床上主要将它应用于治疗精神萎靡、酒精中毒及胃和十二指肠溃疡等疾病。另外它还具有增进神经机能, 改善脑出血后的记忆障碍, 促进智力不佳儿童的智力发展, 防止癫痫发作等功能<sup>[3-4]</sup>。

目前国内外生产 L-谷氨酰胺主要采用发酵法, 因此对发酵液中 L-谷氨酰胺的测定需要简便易行、成本较低的方法。现在较常用的 L-谷氨酰胺分析

方法有: 氨基酸自动分析仪法、酸水解测氮法(纳氏试剂法)、高效液相色谱法、纸层析法<sup>[5-6]</sup>。氨基酸自动分析仪法准确、可靠, 但测定重现性差, 费时, 样品处理繁琐; 酸水解测氮法用于测定发酵液中 L-谷氨酰胺时, 不能排除培养基中的铵盐, 严重影响结果的准确性; 高效液相色谱法一般需进行柱前衍生, 且只能用于杂质较少时的测定; 纸层析法通过展开剂展开, 经显色, 洗脱后比色, 操作简单、成本较低、易于掌握, 但定量测定不够精确, 受外界环境条件的影响较大, 比较适合在 L-谷氨酰胺产生菌筛选过程对大批量的发酵液进行测定。

收稿日期: 2007-11-10.

作者简介: 王霞(1983-), 女, 山东潍坊人, 发酵工程硕士研究生。

\* 通讯作者: 张伟国(1963-), 男, 江苏张家港人, 教授, 工学博士, 博士生导师。主要从事发酵工程和代谢调控方面的研究。Email: zhangwg168@126.com

1 材料与方 法

1.1 菌种与主要仪器

L-谷氨酰胺产生菌 YG13:作者所在实验室保藏菌株;L-谷氨酰胺(色谱纯):中国科学院上海微生物研究所生产;721 分光光度计:上海第三分析仪器厂制造。

1.2 发酵培养基(组分 g/L)

葡萄糖 120,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50,玉米浆 4,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6,MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.005,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005,碳酸钙 30;pH 7.5。

1.3 溶剂

1.3.1 显色液 0.5 g 茚三酮溶于 100 mL 丙酮中。

1.3.2 洗脱液 V(体积分数 0.1%CuSO<sub>4</sub>):V(体积分数 75%乙醇)=2:38。

1.3.3 L-谷氨酰胺标准液 用分析天平准确称取 0.0500 g 色谱纯 L-谷氨酰胺溶于 5.00 mL 的蒸馏水中,配制成 1.00 g/dL 的 L-谷氨酰胺标准液。0.20,0.40,0.60,0.80 g/dL 是由质量浓度为 1.00 g/dL 的标准液稀释得到。

1.4 操作方法

1.4.1 层析操作 将 L-谷氨酰胺标准液(或发酵

液)点样于新华一号滤纸,在距离下端 1.5 cm 处点样,点距 2 cm,每种溶液点样 1 μL,放置于层析缸中,上行展开,展开约 15 cm 时停止层析。

1.4.2 显色操作 层析结束后,用电吹风吹干滤纸,均匀喷洒上显色剂,放于 105 ℃烘箱中烘干 5 min,滤纸上出现紫红色氨基酸斑点即可。

1.4.3 标准曲线的绘制 剪下 L-谷氨酰胺显色斑点于带塞的玻璃试管中(盖住试管口,防止乙醇挥发),用 5.0 mL 的洗脱液洗脱一定时间,然后在 721 分光光度计上测定吸收光度(波长 510 nm,光程 2.0 cm),绘制 L-谷氨酰胺标准曲线。

1.4.4 样品(即发酵液)测定 在测定发酵液中 L-谷氨酰胺时,需将发酵液离心,取上清液,适当稀释,点样 1 μL 展开后,吹干,显色,剪下 L-谷氨酰胺显色斑点,洗脱,测定吸光度,根据 L-谷氨酰胺标准曲线算出它们的含量。

2 结果与分析

2.1 层析展开剂的选择

实验发现,在 L-谷氨酰胺菌种选育中,利用纸层析分析时,由于 L-谷氨酰胺与 L-谷氨酸不易完全分开,所以选择合适的层析溶剂很重要。因此作者对 L-谷氨酰胺在 5 种层析系统中的展开结果进行了分析,通过测定 L-谷氨酰胺,L-谷氨酸的 R<sub>f</sub> 值和观察色斑的方法进行了比较<sup>[7]</sup>,结果见表 1。

表 1 L-谷氨酰胺在各种层析溶剂中展开结果比较  
Tab.1 The deployment results of L-glutamine in solvent systems

| 层析溶剂                                   | L-谷氨酰胺<br>(R <sub>f</sub> ) | L-谷氨酸<br>(R <sub>f</sub> ) | 结果分析                                   |
|----------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------------|
| V(正丁醇):V(冰醋酸):V(水)<br>(4:1:1)          | 0.241                       | 0.193                      | 有拖尾现象,底色深,分离不完全,不利于定性定量分析              |
| V(正丁醇):V(冰醋酸):V(水)<br>(5:2:2)          | 0.195                       | 0.177                      | 有扩散现象,R <sub>f</sub> 值低,不利于氨基酸之间的分离    |
| V(甲醇):V(水)<br>(4:1)                    | 0.483                       | 0.354                      | 显色斑点不规则,底色较深,可以用于定性分析,不适合定量分析          |
| V(正丙醇):V(氨水)<br>(5:2)                  | 0.147                       | 0.0670                     | 没有拖尾现象,L-谷氨酰胺与 L-谷氨酸能完全分开,底色浅,利于定性定量分析 |
| V(正丁醇):V(丙酮):V(乙胺):V(水)<br>(10:10:2:5) | 0.251                       | 0.182                      | 有拖尾现象,显色后底色深,不利于定性定量分析                 |

从代谢机制分析,L-谷氨酰胺是由 L-谷氨酸 γ-羧基酰胺化生成的,并且 L-谷氨酸不可能完全转化为 L-谷氨酰胺,因此这两种氨基酸会同时存在于发酵液中,所以要定性定量分析需选择理想的层析溶剂进行分离。从表 1 可知,V(正丙醇):V(氨水)=

5:2 是较理想的层析溶剂。

2.2 洗脱液最佳吸收波长的测定

剪下 L-谷氨酰胺标准液斑点于带塞的玻璃试管中,加入 5 mL 的洗脱液洗脱 40 min 后,分别在不同的波长下测定洗脱液的 OD 值,结果见图 1。

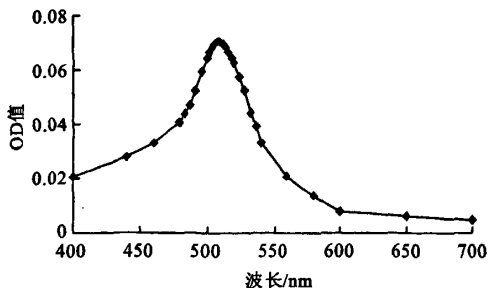


图1 不同波长下洗脱液的吸光度

Fig. 1 Relationship between absorbency and absorb wavelength

从图1可以看出,在波长510 nm处,洗脱液吸光度最大,因此测定L-谷氨酰胺时,选用的最佳吸收波长为510 nm。

### 2.3 最佳洗脱时间的测定

点L-谷氨酰胺标准溶液1  $\mu\text{L}$ ,显色洗脱后放置一段时间,测定洗脱液的吸光度( $A_{510}$ )。实验发现,洗脱20 min以后,洗脱液颜色稳定。由图2可以看出,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。

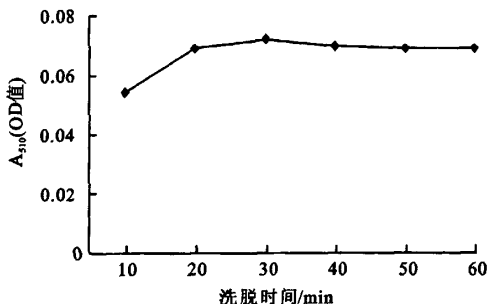


图2 不同洗脱时间对应的洗脱液吸光度

Fig. 2 Relationship between absorbency and preserving time eluent

### 2.4 L-谷氨酰胺标准曲线的测定

在最佳吸收波长510 nm,洗脱时间为30 min的条件下,测定L-谷氨酰胺的标准曲线,见图3。

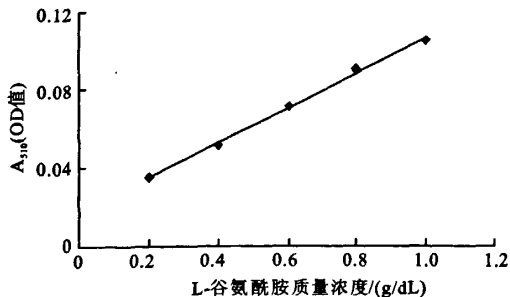


图3 L-谷氨酰胺标准曲线

Fig. 3 The standard curve of L-glutamine measurement

由图3可知:L-谷氨酰胺标准溶液质量浓度在0.2~1.0 g/dL之间时,L-谷氨酰胺的质量浓度与吸光度之间的线性关系明显。

线性回归方程 $Y=11.77X+0.00074$ 。

### 2.5 方法重复性试验

对6  $\mu\text{g}$ 的L-谷氨酰胺进行4次重复测定,分别为5.93、5.97、5.94、5.96  $\mu\text{g}$ ,标准偏差为0.0240,该方法变异系数为0.400。

### 2.6 回收试验

为了检测该方法的准确性,在点样1  $\mu\text{L}$ 稀释10倍后的发酵液的位置,再加入1  $\mu\text{L}$  0.4 g/dL的L-谷氨酰胺标准样品,并另点1  $\mu\text{L}$ 稀释10倍后的发酵液,测定发酵液中L-谷氨酰胺的含量,进行回收试验,结果见表2。5次测得的平均回收率为100.2,标准偏差为1.628。由此可以看出,该方法测定L-谷氨酰胺质量浓度的准确度较高。

表2 L-谷氨酰胺质量浓度回收试验结果

Tab. 2 The results of recovery of L-glutamine in broth

| 发酵液<br>代号 | 本底量/<br>ug | 加标量/<br>ug | 测得总量/<br>ug | 回收<br>率/% |
|-----------|------------|------------|-------------|-----------|
| 1         | 2.53       | 4.00       | 6.62        | 102.3     |
| 2         | 2.38       | 4.00       | 6.41        | 100.8     |
| 3         | 2.06       | 4.00       | 5.98        | 98.00     |
| 4         | 2.31       | 4.00       | 6.33        | 100.5     |
| 5         | 2.62       | 4.00       | 6.59        | 99.25     |

注:回收率= $\frac{\text{测得总质量}-\text{本底质量}}{\text{加标质量}} \times 100\%$

## 3 结 语

通过对纸层析-分光光度计法测定发酵液中L-谷氨酰胺的质量浓度进行研究,得出如下结论:

1)展开剂为V(正丙醇):V(氨水)=5:2时,L-谷氨酰胺与L-谷氨酸之间的分离效果最好,二者之间无重叠现象。

2)采用721分光光度计测定,最佳吸收波长选择在510 nm处有最大吸光度,对测定的准确性有利。

3)试验发现洗脱时间在20 min以后颜色稳定,30 min时洗脱液的吸光度达到最大,30 min以后吸光度趋于平衡,无明显变化,故选择30 min为最佳洗脱时间。

4)通过多次试验发现该方法重复性良好,回收率高。

5)在选用合适的测定条件的前提下,需将发酵液离心后取上清液,且要确保较少外界因素的干

扰,从而尽量减少实验误差。

## 参考文献(References):

- [1] 汪世华,白文钊. L-谷氨酰胺高产菌株的定向选育及产胺条件的研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(6): 751-754.  
WANG Shi-hua, BAI Wen-zhao. Studies on the mutation breeding of L-glutamine-producing strain and the culture conditions of the SH44 for the production of glutamine [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(6): 751-754. (in Chinese)
- [2] 杨梅,张伟国. L-谷氨酰胺高产菌株的选育和发酵条件优化[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术学报), 2004, 23(2): 82-85.  
YANG Mei, ZHANG Wei-guo. Breeding of L-glutamine hyper-producer optimization of its fermentation[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2004, 23(2): 82-85. (in Chinese)
- [3] YANG Yan-ling. Study on L-glutamine fermentation[J]. *Food Science*, 2005, 26(7): 122-124.
- [4] 张军民. 条件必需氨基酸谷氨酰胺研究进展[J]. 中国饲料, 1999, 17: 22-24.  
ZHANG Jun-min. Progress in the research of L-glutamine[J]. *China Fodder*, 1999, 17: 22-24. (in Chinese)
- [5] 汪世华,白文钊,康旭. 发酵液中 L-谷氨酰胺的测定[J]. 湖北工业大学学报, 2001, 16(1): 56-58.  
WANG Shi-hua, BAI Wen-zhao, KANG Xu. The quantitative determinations of L-glutamine in fermented liquor[J]. *Journal of Hubei Polytechnic University*, 2001, 16(1): 56-58. (in Chinese)
- [6] 贺候转. 发酵液中 L-谷氨酰胺含量的测定[J]. 山西食品工业, 1996(2), 22-23.  
HE Hong-zhuan. The quantitative determinations of L-glutamine in fermented liquor[J]. *Shanxi Food Industry*, 1996(2): 22-23. (in Chinese)
- [7] 何俊峰,张伟国. 发酵液中 L-组氨酸的定性定量测定[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4): 56-58.  
HE Jun-feng, ZHANG Wei-guo. Qualitative and quantitative determination of L-histidine in fermentation broth[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(4): 56-58. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)

## 《食品与生物技术学报》 广告费收费标准

### 彩色广告

|    |           |
|----|-----------|
| 封面 | 15000 元/期 |
| 封二 | 8000 元/期  |
| 封三 | 6000 元/期  |
| 封底 | 10000 元/期 |
| 内页 | 5000 元/期  |

### 黑白广告

|      |          |
|------|----------|
| 整版内页 | 2000 元/期 |
| 补白   | 800 元/期  |

地址:江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号 江南  
大学杂志社

邮编:214122

联系电话:0510-85913526

《食品与生物技术学报》广告部