

文章编号:1009-038X(2005)01-0095-04

纸层析-分光光度法测定发酵液中 L-异亮氨酸

李进, 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: 鉴于在菌种选育工作中必须准确测定菌株产酸水平, 要求有可行的测定方法, 对简单易行的纸层析-分光光度法测定发酵液中 L-异亮氨酸质量进行了系统的研究, 研究发现: 选用合适的显色剂、层析溶剂及洗脱剂的同时选择最佳吸收波长、最佳洗脱时间及适宜的点样量, 可以提高该测定方法的准确度和精密度, 从而在菌种筛选过程中准确地测定发酵液中 L-异亮氨酸质量。

关键词: 纸层析法; L-异亮氨酸; 显色剂; 层析溶剂; 最佳吸收波长; 最佳洗脱时间

中图分类号: O 657.7

文献标识码: A

Dertermination of the Isoleucine in Broth by Paper Chromatography-spectrophotometry

LI Jin, ZHANG Wei-guo*

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

Abstract: The level of amino acid production with mutant strains requires accurate and feasible measurement, The method of simple paper chromatography was studied systematically in this paper, to measure the content of L-Isoleucine in broth. The results could be summarized as follows: the accuracy and performance of the method depend on the appropriate selection of color reagent, solvent system and eluent solution, as well as the proper selection of the optimum absorb wavelength, suitable time of eluent, and L-Isoleucine does amount. The content of L-Isoleucine in broth can be measured using this method in the course of screening mutant stains.

Key words: paper chromatography; L-Isoleucine; color reagent; solvent system; optimum absorb wavelength; suitable time of eluent

L-异亮氨酸属于人体 8 种必须氨基酸之一, 主要用于食品和医药卫生方面, L-异亮氨酸能治疗神经障碍、食欲减退和贫血, 能增加身体的免疫功能, 在肌肉蛋白质代谢中极为重要^[1]。

关于 L-异亮氨酸测定方法的报道很少, 相关的综述和评论性文章也不多见, 虽然可以通过氨基酸

自动测定仪、高压液相色谱或酶法等来准确测定 L-异亮氨酸质量, 但由于在菌种选育中需要测定的样品很多, 上述方法并不适合于菌种选育工作^[2]。作者对纸层析法-分光光度法测定发酵液中 L-异亮氨酸质量进行了系统地研究^[3-5], 这对于 L-异亮氨酸产生菌的筛选具有重要的意义。

收稿日期: 2004-05-20; 修回日期: 2004-06-22.

作者简介: 李进(1979-), 男, 江苏大丰人, 氨基酸发酵专业硕士研究生; * 责任作者。

1 材料与方 法

1.1 溶 剂

显色剂:0.5 g/dL 茛三酮丙酮溶液;层析溶剂: $V(\text{正丁醇}):V(\text{冰醋酸}):V(\text{水})=12:3:5$;洗脱剂: $V(\text{体积分数 } 75\% \text{ 乙醇}):V(0.2 \text{ g/dL } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})=38:2$;L-异亮氨酸标样:30 g/L.

1.2 操作方 法

层析操作:采用单向上行层析,在距下端 1.5 cm 处点样,点距 2 cm,展开约 15 cm 停止层析.

显色操作:层析结束热风吹干滤纸,0.5 g/dL 茛三酮丙酮溶液显色,105 °C 烘干 5 min,滤纸上出现紫红色氨基酸斑点即可.

测定操作:将对应的斑点剪下,放入有 5 mL 洗脱剂的试管中洗脱(盖住试管口,防止乙醇挥发)40 min,用 721 分光光度计在 506 nm 处测定.

2 结果与讨论

2.1 显色剂的选择

将点有不同 L-Ile 质量的滤纸在层析溶剂中展开,分别用茛三酮、吡啶酮显色(吡啶酮显色后需褪去底色),显色情况见表 1.

表 1 不同显色剂与 L-异亮氨酸显色情况

Tab. 1 Color Development of L-Isoleucine with Different Color Reagent

	L-Ile 质量/ μg						色斑 颜色
	1	2	3	4	5	6	
茛三酮显色	+	+	++	+++	++++	+++++	紫红色
吡啶酮显色	-	-	-	-	-	+	红色

注:“-”表示无显色反应;“+”表示有显色反应;“+”越多表示颜色越深.

表 2 L-异亮氨酸在各种层析溶剂中展开结果比较

Tab. 2 The Deployment Result of L-Isoleucine in Solvent Systems

层析溶剂/ $(V:V:V)$	R_f 值			结果分析
	亮氨酸	异亮氨酸	缬氨酸	
正丁醇:冰醋酸:水=12:3:5	0.665	0.623	0.490	没有拖尾及扩散现象,显色后底色浅,利于定性定量分析
正丁醇:冰醋酸:水=4:1:1	0.636	0.617	0.475	有扩散及拖尾现象,显色后底色浅,利于定性定量分析
正丁醇:冰醋酸:水=5:2:2	0.489	0.453	0.284	有扩散现象, R_f 值低,不利于与其他氨基酸分离
正丙醇:氨水=5:2	0.713	0.673	0.567	显色后底色太深,不利于定性定量分析
正丁醇:丙酮:乙胺:水=10:10:2:5	0.570	0.558	0.418	有脱尾现象,显色后底色太深,不利于定性定量分析
正丁醇:浓氨水=13:3	0.325	0.312	0.188	有拖尾及扩散现象, R_f 值太低,不利于与其他氨基酸分离

虽然吡啶酮与各种氨基酸显色差别较大,有利于氨基酸的鉴别,但从表 1 结果可知,吡啶酮显色的灵敏度比茛三酮低,吡啶酮显色需要点样量大于 6 μg 才可检出,而采用茛三酮显色可以检出发酵液中微量的 L-Ile,当点样量大于 1 μg 就可检出,这有利于 L-异亮氨酸产生菌的筛选.而且,用吡啶酮显色,褪色后的滤纸较脆,不能通过剪纸洗脱法进行定量分析^[2].所以,选用茛三酮作为显色剂比较理想.

2.2 层析溶剂的选择

实验发现,是否选用合适的层析溶剂对测定结果影响较大,因此本实验对 L-异亮氨酸在所述 6 种层析系统中的展开结果进行了考察,通过测定 3 种支链氨基酸的 R_f 值和观察色斑的方法进行了比较^[6-10],结果见表 2.

在 L-异亮氨酸菌种选育中,利用纸层析法分析时,由于亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸这 3 种支链氨基酸 R_f 值接近,难于分离,所以选用合适的层析溶剂很重要.从代谢机制分析,一般支链氨基酸产生菌株都存在复杂的共用酶调节关系(非上述某种支链氨基酸的缺陷型),即这 3 种支链氨基酸菌株都会产生,由于发酵液中有 3 种支链氨基酸的存在,所以,要定性定量分析需选择理想的层析溶剂进行分离^[11].从表 2 可知, $V(\text{正丁醇}):V(\text{冰醋酸}):V(\text{水})=12:3:5$ 是较理想的层析溶剂.

2.3 最佳吸收波长的确定

显色后的色斑用剪纸洗脱法进行定量分析时,是否选用合适的吸收波长对测定准确性影响很大.点样量分别为 10, 15, 20 μg L-Ile,洗脱后选用不

同的吸收波长测定其吸光度的变化情况, 结果见图 1. 从图 1 可知, 随着吸收波长的变化, 点样量为 10, 15, 20 μg L-Ile 有相同变化规律, 在光密度为 506 nm 时有最大吸光度, 所以测定时选用吸收波长在 506 nm 较为合适^[2].

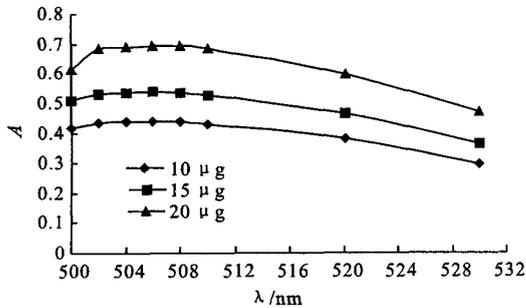


图 1 吸收波长与吸光度关系测定

Fig. 1 Relationship Between Absorbency and Absorb Wavelength

2.4 颜色稳定性测定

点样量分别为 12, 24, 36 μg L-Ile, 洗脱后放置不同时间, 测定洗脱液的吸光度 (A_{506}), 结果见图 2.

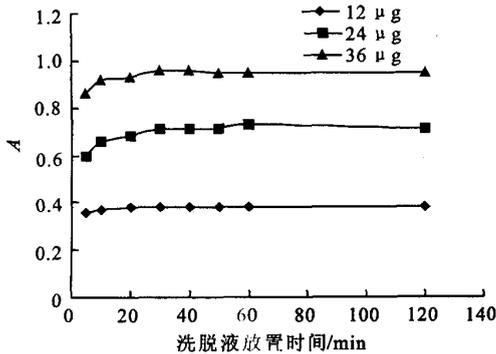


图 2 洗脱液放置时间与吸光度的关系

Fig. 2 Relationship Between Absorbency and Preserving Time Eluent

由图 2 可知, 茚三酮与 L-Ile 反应物在放置 30 min 后, 已完全洗脱下来, 在 30~120 min 内, 吸光度并没有下降而趋于稳定, 这有利于测定的准确性, 不会因为测定时间的延长而导致测定值的下降, 说明了茚三酮与 L-Ile 反应物洗脱后颜色稳定性很好. 但实验也发现, 当洗脱液放置 24 h 后, 不同含量的 L-异亮氨酸吸光度都有不同程度的下降, 所以, 建议最佳洗脱时间选择 40 min 为宜.

2.5 吸光度与 L-异亮氨酸质量关系的测定

将点有不同质量 (3~60 μg) 的 L-异亮氨酸, 以 V(正丁醇) : V(冰醋酸) : V(水) = 12 : 3 : 5 为层

析溶剂, 茚三酮为显色剂, 用 V(体积分数 75% 乙醇) : V(0.2 g/dL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) = 38 : 2 洗脱液洗脱 40 min 后, 在吸收波长 506 nm 处进行比色, 结果见图 3.

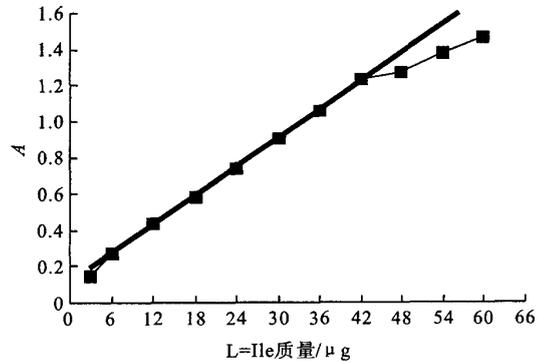


图 3 吸光度与 L-异亮氨酸含量的关系

Fig. 3 Relationship Between L-Isoleucine Content and Absorbency

由图 3 可知, 当滤纸上点样量大于 42 μg 时, 洗脱液的吸光度偏低, 即此时就不能准确测定出 L-异亮氨酸质量, 而当滤纸上点样量小于 6 μg 时, 洗脱液的吸光度也偏低, 也不利于测定, 因此, 采用纸层析法来定量测定 L-异亮氨酸, 滤纸上的点样量在 6~42 μg 较为合适.

2.6 L-异亮氨酸标准曲线的绘制

根据图 3 结果, 可以绘制 L-异亮氨酸质量为 6~36 μg 的标准曲线, 结果见图 4.

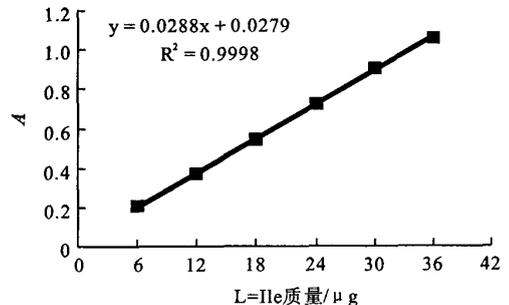


图 4 L-异亮氨酸测定标准曲线

Fig. 4 The Standard Curve of L-Isoleucine measurement

2.7 准确度与精密度的测定

为了确定此方法的准确性, 将含有不同含量 L-异亮氨酸的发酵液点在滤纸上, 再点入 L-Ile 标样 12 μg , 测定其回收率, 结果见表 3. 由表可知, 4 次测定的平均回收率在 99.25%, 标准偏差为 1.54, 这说明了该方法测定 L-异亮氨酸准确性好.

为确定该方法的精密度, 对含 9.45 g/LL-Ile (氨基酸分析仪测定) 的发酵液进行了 10 次平行测

定,结果见表4.

表3 纸层析法测定L-异亮氨酸的回收率

Tab.3 Recovery of L-Isoleucine Content by Paper Chromatography

发酵液样	本底质量/ μg	加标质量/ μg	测得总质量/ μg	回收率/%	平均回收率/%
1	7.47	12.0	19.64	101.4	
2	9.45	12.0	21.28	98.6	99.25
3	8.06	12.0	19.96	99.2	
4	9.38	12.0	21.12	97.8	

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

表4 纸层析法测定L-异亮氨酸精密度

Tab.4 Precision measurement of L-Isoleucine with Paper Chromatography

发酵液中L-异亮氨酸 质量浓度/(g/L)					标准 偏差	变异 系数/%
9.38	9.50	9.37	9.38	9.52	0.073	0.772
9.50	9.38	9.50	9.45	9.58		

注:变异系数 = $\frac{\text{标准偏差}}{\text{平均值}} \times 100\%$.

由表4可知,该方法测定L-异亮氨酸精密度较高,即重现性好(测定方法的精密度由变异系数表示,当变异系数小于10%,说明此方法的精密度高).

3 结论

通过对纸层析-分光光度法测定发酵液中L-异亮氨酸含量的系统研究,得出如下结论:

(1)选用茚三酮显色比吡啶醌显色的灵敏度高,更利于洗脱测定;(2)选用层析溶剂:V(正丁醇):V(冰醋酸):V(水)=12:3:5较为理想,有利于各种氨基酸的分离以及进行洗脱测定;(3)采用721分光光度计测定,最佳吸收波长选择在506 nm处有最大吸光度,对测定的准确性有利;(4)研究发现洗脱时间在30~120 min颜色较为稳定,故洗脱时间选择40 min较为理想;(5)适宜的点样范围在6~42 μg范围内比较符合线性,可以确保测定的准确性;(6)在选用合适的测定条件的前提下,需将发酵液离心取上清液,且要确保减少外在因素的干扰从而尽量减少实验的误差.

参考文献:

- [1] 张伟国. L-异亮氨酸高产菌选育及发酵优化的研究[D]. 无锡:无锡轻工大学,1999.1-19.
- [2] 方杰. L-亮氨酸产生菌的选育及发酵条件优化[D]. 天津:天津轻工业学院,2000:23-27.
- [3] 宋文军,陈宁,魏春. L-异亮氨酸产生菌的选育及发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业,2003,(29):34-37.
- [4] 刘志祥,王国华,姜素萍. 纸层析-分光光度法测定肌苷别剂的含量[J]. 现代应用药学,1994,11(3):31-32.
- [5] 孟芹,马克坚,洪兵. 纸层析-紫外分光光度法测定杜仲中氯原酸的含量[J]. 云南中医学院学报,1994,17(4):21-22.
- [6] 汪世华,白文钊,康旭生. 发酵液中L-谷氨酸胺的测定[J]. 湖北工学院学报,2001,16(1):56-58.
- [7] Olle Karlstrom. Methods for the production of mutants suitable as amino acid fermentation organisms[J]. *Biotech Bioeng.* 1965,7:245-268.
- [8] 来彩霞,陈炜,刘党生,等. L-异亮氨酸产生菌的定向育种[J]. 沈阳药科大学学报,1998,15:47-50.
- [9] Kazumi Araki, Hiroyuki Ueda, Shigeru Saigusa. Fermentative production of L-Leucine with Auxotrophic Mutants of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Agr Biol Chem.* 1974,38(3):565-572.
- [10] Tomoki Azuma, Toshihide Nakanishi, Hiroshi Hagino. Properties of revertants appearing in L-leucine fermentation culture broth[J]. *Agr Biol Chem.* 1987,51(12):3245-3249.
- [11] Hiroshi Kase, Kiyoshi Nakayama. L-Isoleucine Production by analog-resistant mutants derived from threonine-producing strain of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Agr Biol Chem.* 1977,41(1):109-116.

(责任编辑:杨萌)