



ϵ -聚赖氨酸测定方法的改进

曹伟锋, 谭之磊, 袁国栋, 贾士儒

(天津科技大学生物工程学院, 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

摘要: 研究了甲基橙法测定 ϵ -聚赖氨酸的试验条件, 得出结论: 甲基橙从水中重结晶后, 溶于pH6.6、0.1 mol/L磷酸钠缓冲液中, 终浓度为1 mmol/L; 将2 mL ϵ -聚赖氨酸溶液与2 mL 1 mmol/L 甲基橙溶液混合; 混合物在30°C条件下剧烈振荡30 min, 4000 r/min离心15 min; 取1 mL上清液稀释50倍, 在465 nm波长下测吸光度, 计算 ϵ -聚赖氨酸含量。

关键词: 甲基橙; ϵ -聚赖氨酸; 比色法

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-6510(2007)02-0009-03

Improvement of the Assay Method for ϵ -polylysine

CAO Wei-feng, TAN Zhi-lei, YUAN Guo-dong, JIA Shi-ru

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The conditions of detecting ϵ -polylysine (ϵ -PL) concentration by the methyl orange were studied in the paper. The results were as follow. After recrystallization from water, methyl orange was dissolved in 0.1 mol/L sodium phosphate buffer (pH6.6) at a final concentration of 1 mmol/L. Then 2 ml ϵ -PL solution was mixed with 2 ml methyl orange solution. The mixtures were vigorously reacted on a reciprocal shaker at 30°C for 30 min and then centrifuged for 15 min at 4000 r/min. The absorbance of the supernate diluted 50-fold was read at 465 nm and the ϵ -PL content was calculated.

Keywords: methyl orange; ϵ -polylysine; colorimetric method

1972年 Itzhaki^[1]根据甲基橙与聚赖氨酸间形成复合物的特性, 建立了用甲基橙测定聚赖氨酸含量的方法. 1973年 M.hatano^[2]研究了聚-L-赖氨酸-甲基橙反应体系中的旋光性, 证实依靠甲基橙分子磺酸基上阴离子与聚赖氨酸氨基阳离子间形成的离子对, 在pH3~10范围内聚赖氨酸能和甲基橙形成复合物, 且形成的离子对发生在一个或两个甲基橙分子与聚赖氨酸一个氨基残基上. 1977年日本学者 S.shima^[3]和 H.sakai 从放线菌培养过滤液中提取出一种含有25~30个赖氨酸残基的同型单体聚合物, 这种赖氨酸聚合物是赖氨酸残基通过 α -羧基和与另一赖氨酸残基的 ϵ -氨基形成酰胺键连接而成^[4], 称为 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL), ϵ -PL的测定按照 Itzhaki 在1972年建立的测定方法进行. 在国内, 董惠钧^[5]和姜俊云^[6]首先借鉴 Itzhaki 的方法, 用甲基橙测定 ϵ -PL, 但由于发酵液成

分的复杂性, 造成测定结果重现性差. 因此, 本文通过研究测定条件及发酵液中存在因素对 ϵ -PL测定的影响, 确定了甲基橙法测定 ϵ -PL的条件.

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

甲基橙, 天津市凯通化学试剂有限公司; 聚赖氨酸标准品, Sigma公司.

752紫外光栅分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司.

1.2 方法^[6]

将从水中重结晶甲基橙(methyl orange, MO)配成不同浓度, 分别与不同浓度的 ϵ -PL在30°C反应, 剧烈震荡; 反应30 min, 4000 r/min离心15 min, 取上清液1

收稿日期: 2006-10-30; 修回日期: 2007-01-17

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2004BA713B05-061); 天津科技大学自然科学基金资助项目(20060207)

作者简介: 曹伟锋(1981—), 男, 河南人, 硕士研究生.

mL稀释至50mL, 在465 nm^[1]下测定稀释液的A₄₆₅; 反应体系含甲基橙溶液2 mL, ε-PL溶液2 mL.

2 结果

2.1 甲基橙浓度的影响

将重结晶甲基橙配成不同浓度的水溶液, 测定其A₄₆₅, 以蒸馏水为对照, 结果如表1. 当甲基橙浓度为0.08 mmol/L时, 达到最大量程. 因此, 用分光光度计测定甲基橙的浓度应小于0.08 mmol/L.

表1 甲基橙浓度的影响
Tab.1 Effect of methyl orange concentration

甲基橙/mmole·L ⁻¹	A ₄₆₅
0.001	0.044
0.004	0.111
0.006	0.165
0.010	0.272
0.020	0.560
0.040	1.058
0.060	1.536
0.080	-

取不同浓度甲基橙溶液, 分别加入同体积同浓度的ε-PL溶液, 反应后的上清液用蒸馏水稀释, 至甲基橙浓度为0.1 mmol/L, 测定结果见图1.

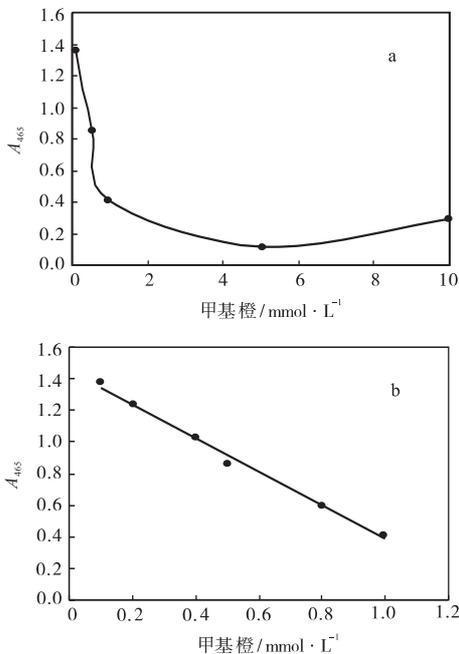


图1 不同甲基橙浓度下的上清液 A₄₆₅ 的变化
Fig.1 Variation of A₄₆₅ of supernatants with methyl orange concentration

不同浓度甲基橙与ε-PL反应的程度存在差别, 表现为离心后形成的ε-PL-甲基橙复合物量上的多寡,

或上清液A₄₆₅不同(图1a). 甲基橙浓度0.1~1mmol/L(图1b), A₄₆₅变化与之成线性(R²=0.99). ε-PL的测定是以甲基橙A₄₆₅的减少值来换算的. 当用1 mmol/L甲基橙溶液反应时A₄₆₅为0.410, ε-PL与甲基橙稍有反应, 即可使其反应后上清液的A₄₆₅升高, 处于线性区.

2.2 pH的影响

已知甲基橙水溶液中的变色间隔为pH3.1~4.4, pH小于3.1时, 甲基橙呈红色; pH 3.1~4.4, 则呈橙色; pH大于4.4时, 甲基橙呈黄色^[7], pH对甲基橙水溶液的影响情况见表2. 当pH大于4.4, pH对甲基橙溶液A₄₆₅值影响不大. 采用pH 6.6, 0.1 mol/L磷酸钠缓冲液(用35.8 g/L Na₂HPO₄·12H₂O溶液调节15.6 g/L NaH₂PO₄·2H₂O溶液pH至6.6)来维持pH的稳定是合理的.

表2 pH的影响
Tab.2 Effect of pH

pH	4.6	5.5	6.6	8.0
A ₄₆₅	1.309	1.309	1.294	1.312

注: 甲基橙浓度为0.05 mmol/L.

2.3 磷酸钠缓冲液对ε-PL与甲基橙反应的影响

甲基橙测定ε-聚赖氨酸主要表现在其与ε-PL氨基阳离子间的反应^[2], 磷酸钠缓冲液可能影响ε-PL结构变化, 这里考察磷酸钠缓冲液对ε-PL测定的影响. 将ε-PL溶于磷酸缓冲液中, 并稀释成不同浓度进行比色测定, 考虑到ε-PL结构的变化可能不是瞬间完成, 因此持续观察7d, 观察磷酸钠缓冲液对ε-PL测定的影响, 试验期间配成的溶液在4℃冰箱保存. 由表3可知, 测定所用磷酸钠缓冲液对甲基橙法测定ε-PL无影响.

表3 磷酸钠缓冲液对ε-PL测定 A₄₆₅ 的影响

Tab.3 Effect of sodium phosphate buffer on estimatom A₄₆₅ of ε-PL

时间/d	ε-PL/g·L ⁻¹			
	0.10	0.08	0.06	0.04
1	0.190	0.204	0.222	0.236
2	0.192	0.204	0.222	0.238
3	0.188	0.205	0.224	0.236
4	0.190	0.202	0.224	0.231
5	0.190	0.204	0.220	0.236
6	0.191	0.205	0.225	0.237
7	0.191	0.206	0.220	0.236

2.4 发酵液成分对1 mmol/L甲基橙溶液的影响

2.4.1 MgSO₄·7H₂O的影响

ε-PL发酵培养基^[8]中主要的二价阳离子为Mg²⁺, 因此考察MgSO₄·7H₂O浓度对甲基橙溶液A₄₆₅的影响. 由图2b中可知, 当MgSO₄·7H₂O浓度小于0.06 g/L时, MgSO₄·7H₂O浓度对甲基橙的影响可忽略不计. 随

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度的增大,甲基橙与 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 反应且使 A_{465} 急剧减小(图2a)。因此,用甲基橙测定 ϵ -PL时, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度应小于 $0.06 g/L$ 。

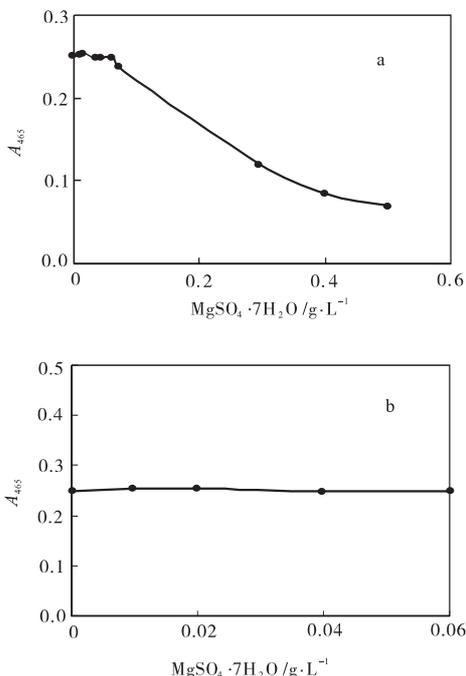


图2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的影响
Fig.2 Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

2.4.2 $(NH_4)_2SO_4$ 的影响

ϵ -PL发酵培养基^[8]中主要的一价阳离子为 NH_4^+ ,这里考察 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度对甲基橙溶液 A_{465} 的影响。由表4可知, $(NH_4)_2SO_4$ 浓度对比色测定 ϵ -PL含量无影响。

表4 $(NH_4)_2SO_4$ 的影响
Tab.4 Effect of $(NH_4)_2SO_4$

$(NH_4)_2SO_4/g \cdot L^{-1}$	1	2	4	6	8	10
A_{465}	0.247	0.250	0.249	0.252	0.245	0.252

注: A_{465} 平均值为0.249,相对偏差为0.125%。

2.4.3 葡萄糖的影响

ϵ -PL发酵培养基^[8]中的碳源为葡萄糖,由表5可知,葡萄糖对比色测定 ϵ -PL含量无影响。

表5 葡萄糖的影响
Tab.5 Effect of glucose

葡萄糖/ $g \cdot L^{-1}$	10	20	30	40	50
A_{465}	0.252	0.260	0.257	0.259	0.260

注: A_{465} 平均值为0.258,相对偏差为0.93%。

2.5 L-赖氨酸的影响

L-赖氨酸为 ϵ -PL的单体,考察L-赖氨酸是否与甲基橙反应。由表6可知,L-赖氨酸与甲基橙不反应。

表6 L-赖氨酸对甲基橙的影响

Tab.6 Effect of L-lysine on methyl orange

赖氨酸/ $g \cdot L^{-1}$	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
A_{465}	0.239	0.240	0.242	0.245	0.242	0.248	0.238

注: A_{465} 的平均值为0.242,相对偏差为1.06%。

将L-赖氨酸溶液添加到含 ϵ -聚赖氨酸($0.058 g/L$)溶液中,与不加赖氨酸的 ϵ -聚赖氨酸样品溶液作对照,观察赖氨酸是否对 ϵ -聚赖氨酸样品测定有影响。由表7可知,L-赖氨酸对 ϵ -PL测定无影响。

表7 L-赖氨酸对 ϵ -PL测定的影响

Tab.7 Effect of L-lysine on the estimation of ϵ -PL

赖氨酸/ $g \cdot L^{-1}$	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
A_{465}	0.186	0.185	0.185	0.186	0.189	0.185	0.186

注: A_{465} 的平均值为0.186,相对偏差为0.46%。

2.6 验证

综合以上试验结果,用甲基橙测定 ϵ -PL的测定过程如下:甲基橙从水中重结晶,并干燥至恒重,实验前溶于 $0.1 mol/L$ 磷酸钠缓冲液中($pH 6.6$);将 ϵ -聚赖氨酸的标准品用 $0.1 mol/L$ 磷酸钠缓冲液配成不同浓度的溶液;将 $2 mL$ 标准品溶液与 $2 mL 1 mmol/L$ 甲基橙溶液混合;所得混合物在 $30^\circ C$ 条件下剧烈振荡,反应 $30 min$;然后 $4000 r/min$ 离心 $15 min$,除去产生的 ϵ -PL与甲基橙形成的复合物。取上清液 $1 mL$ 用磷酸钠缓冲溶液稀释至 $50 mL$,在 $465 nm$ 处测吸光度。标准曲线如图3。

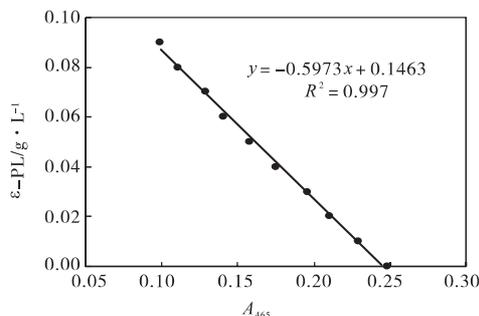


图3 ϵ -PL测定的标准曲线

Fig.3 Calibration curve for estimation of ϵ -polylysine

用新建的方法测定发酵液中的 ϵ -聚赖氨酸含量,得其 ϵ -PL含量为 $2.263 g/L$ 。向发酵液中加入标准品,配成标准品终浓度为 $2 g/L, 4 g/L, 6 g/L, 8 g/L$ 和 $10 g/L$ 的发酵液,用新建的方法测定新配成的发酵液中 ϵ -PL的含量(减去已知原发酵液中 ϵ -PL含量),得其浓度为 $1.996 g/L, 3.991 g/L, 6.003 g/L, 7.992 g/L$ 和 $10.011 g/L$ 。比较用新建方法所测得数值与已知加入的标准品量可知,新建的方法是准确可靠的。

(下转第32页)