

比色法快速测定发酵液中 γ -聚谷氨酸含量

刘鹏丽, 刘 萍, 黄 琛, 殷志敏

(南京师范大学生命科学学院, 生物化学与生物制品研究所, 江苏省分子医学重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 建立了发酵液中 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)含量快速测定的比色检测方法. 其原理为 γ -聚谷氨酸可以与亚甲基蓝溶液发生反应, 并且使亚甲基蓝溶液颜色发生变化. 配制不同浓度的 γ -PGA 标准品溶液, 使其与亚甲基蓝溶液形成反应体系, 并对亚甲基蓝溶液浓度、反应温度以及反应时间对反应体系的影响分别进行对比优化. 结果显示, 亚甲基蓝溶液质量浓度为 10 mg/L, 反应温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间为 5 min, 线性回归方程 $y = 0.0024x + 0.3289$, $R^2 = 0.9965$, 空白加标平均回收率为 106.8%, 平均 RSD 值为 1.51%, 发酵液中加标平均回收率为 118.3%, 平均 RSD 值为 1.89%. 利用比色法测定发酵液中 γ -PGA 的含量简便快捷、重现性好、灵敏度较高、准确度好, 可用于发酵液中 γ -PGA 浓度的检测.

[关键词] γ -聚谷氨酸, 亚甲基蓝, 比色法, 定量分析

[中图分类号] Q5-33 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2019)02-0105-04

Colorimetric Method for Efficient Determination of Poly- γ -glutamic Acid in Fermentation Broth

Liu Pengli, Liu Ping, Huang Chen, Yin Zhimin

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products, Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: A colorimetric method for the rapid determination of γ -PGA in fermentation broth was established. The principle is that poly- γ -glutamic acid can react with the methylene blue solution and change the color of the methylene blue solution. Different concentrations of γ -PGA standard solutions were prepared to form a reaction system with methylene blue solution, and the effects of methylene blue solution concentration, reaction temperature, and reaction time on the reaction system were compared and optimized. The results showed that the mass concentration of methylene blue solution was 10 mg/L, the reaction temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$, the reaction time was 5 min, the linear regression equation was $y = 0.0024x + 0.3289$, $R^2 = 0.9965$, and the blank average recovery rate was 106.8%. The average RSD value was 1.51%, the average recoveries in the fermentation broth were 118.3%, and the average RSD was 1.89%. The determination of γ -PGA in fermentation broth by colorimetry is simple and rapid, with good reproducibility, high sensitivity and good accuracy. It can be used to detect γ -PGA concentration in fermentation broth.

Key words: poly- γ -glutamic acid, methylene blue, colorimetric method, quantitative analysis

γ -聚谷氨酸(poly- γ -glutamic acid, γ -PGA)是一种具有生物相容性的新型生物高分子材料,是炭疽杆菌细胞荚膜的一种化学组成成分,由 D-谷氨酸或 L-谷氨酸以 α -氨基和 γ -羧基通过酰胺键缩合而成的,由多数杆菌产生的一种胞外水溶性的高分子氨基酸聚合物. 微生物合成的 γ -PGA 通常由 5 000 个左右的谷氨酸单体组成,相对分子质量一般在 100 kD~1 000 kD^[1-3]. γ -PGA 是一种阴离子高分子聚合物,在其分子链的侧链上有很多活性较高的游离羧基($-\text{COOH}$),可以在分子内部或分子之间形成氢键^[4],具有极高的保湿性和吸水性,易于和一些药物结合形成稳定的复合物,是一种理想的可在体内生物降解的药用高分子聚合物^[5-6]. γ -PGA 安全无毒,对环境没有污染,具有可塑性、成纤维性、成膜性、保湿性等众多的理化性

收稿日期:2018-11-28.

基金项目:江苏省科技厅前瞻性研究项目(BY2013001-03).

通讯联系人:刘鹏丽,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学. E-mail:963116134@qq.com

质和生物学特性,被广泛地应用于农业、医药、环境治理、食品加工与包装、化妆品工业等众多领域,是一种极具开发价值和应用前景的新型多功能生物制品^[7-9]。

亚甲基蓝(Methylene blue),又被叫做次甲基蓝、亚甲蓝、次甲蓝、美蓝等,是一种芳香杂环化合物,被用作化学指示剂、生物染色剂、染料和药物等,在水溶液中呈正电性^[10-11]。根据异性电荷相吸的原理,带正电荷的亚甲基蓝分子可以和带负电荷($-\text{COO}^-$)的 γ -PGA通过静电吸引力相结合,使亚甲基蓝水溶液颜色发生变化^[12-13]。

1 材料

1.1 菌种及培养基

枯草芽孢杆菌(南京师范大学生化与生物制品研究所提供);种子培养基:葡萄糖 20 g/L;谷氨酸钠 10 g/L;酵母粉 5 g/L;七水合硫酸镁 2.5 g/L;磷酸氢二钾 2 g/L;一水合硫酸锰 0.02 g/L;发酵培养基:谷氨酸钠 50 g/L;磷酸氢二钾 15 g/L;磷酸二氢钾 2 g/L;七水合硫酸镁 2.5 g/L;酵母粉 5 g/L;氯化铵 4 g/L;一水合硫酸锰 0.2 g/L;葡萄糖 40 g/L;pH 7.0。

1.2 仪器

UV-1800PC 分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;Heraeus Multifuge×3R 冷冻离心机 美国赛默飞;ZQZY-C 振荡培养箱 上海知楚仪器有限公司;SHZ-IV 循环多用真空泵 南京科博尔仪器设备有限公司。

1.3 材料

亚甲基蓝 上海瑞永生物科技有限公司; γ -PGA 标准品 南京轩凯生物科技有限公司;其他试剂 均为分析纯试剂。

2 方法

2.1 γ -PGA 标准液的配制

分别精确称取 γ -聚谷氨酸标准品(4、3.5、3、2.5、2、1.5、1、0.5)g,置于干净的烧杯中,加入适量的蒸馏水溶解,然后定容至 100 mL 的容量瓶中,摇匀,分别得到 40 g/L、35 g/L、30 g/L、25 g/L、20 g/L、15 g/L、10 g/L、5 g/L 的 γ -PGA 标准品。

2.2 γ -PGA 的初步纯化

发酵液稀释数倍后经 10 000 r/min 离心 20 min,除去菌体,取上清液进行抽滤脱色,制得样液。

2.3 亚甲基蓝配制

根据文献[9]可知亚甲基蓝的干燥减量 $E=11.46\%$,因此根据干燥减量精确称取与所需亚甲基蓝干燥品质量 0.050 0 g 相当的未干燥品,将称取的亚甲基蓝(精确至 0.000 1 g)溶解于蒸馏水中,待全部溶解后,移入 100 mL 容量瓶中,摇匀,配置成 0.5 g/L 的亚甲基蓝溶液,取该溶液 1 mL 至另一个 50 mL 的容量瓶中,用蒸馏水定容至 50 mL,摇匀,得到 10 mg/L 的亚甲基蓝试液。

2.4 亚甲基蓝比色法

取 3 mL 标准液或样液于试管中,准确加入 3 mL 亚甲基蓝试液,然后置于恒温振荡箱中,在 25 ℃ 振荡反应 5 min 后,将反应液倒入比色皿中,测定波长在 664 nm 下的吸光度(A_{664}),以蒸馏水做相应处理作为空白。

3 结果与分析

3.1 亚甲基蓝试液浓度对测定的影响

将浓度为(6、8、10、12、14、16)mg/L 的亚甲基蓝试液分别与浓度为(5、10、15、20、25、30、35、40)g/L 的 γ -PGA 标准品溶液在一定温度反应一定时间后,在 664 nm 下测定其吸光度 A_{664} ,并绘制标准曲线,见图 1。

由图 1 可见,在不同浓度亚甲基蓝试液条件下,标准曲线都呈现较好的线性关系,但不同浓度的亚甲基蓝试液与 γ -PGA 标准液反应得到的标准曲线的 R^2 值还是存在着不同,当亚甲基蓝试液浓度为 10 mg/L 时,标准曲线的准确度更好,因此在后续研究中,将亚甲基蓝试液浓度确定为 10 mg/L。

3.2 反应温度对测定的影响

将浓度为(5、10、15、20、25、30、35、40) g/L 的 γ -PGA 标准液与浓度为 10 mg/L 的亚甲基蓝试液分别在(25、30、35、40、45、50) $^{\circ}\text{C}$ 下反应一定时间后,在 664 nm 处测定吸光度 A_{664} ,绘制标准曲线。

由图 2 可见,在不同温度条件下,标准曲线几乎重合,表明温度对测定结果的影响不大,可以忽略,因此选择温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,即室温。

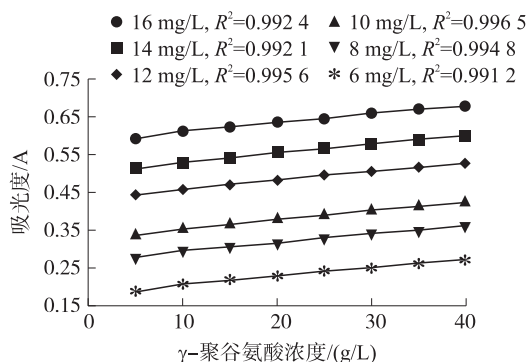
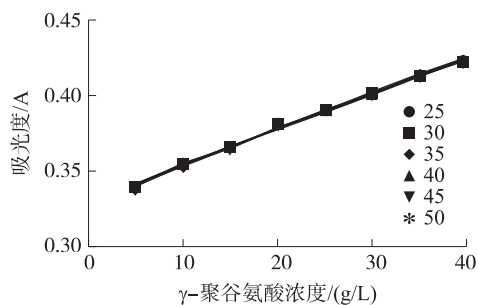


图 1 不同亚甲基蓝浓度下的标准曲线

Fig. 1 Standard curves at different concentrations of methylene blue



注: $R^2 = 0.9948$ (25 $^{\circ}\text{C}$); $R^2 = 0.9969$ (30 $^{\circ}\text{C}$); $R^2 = 0.9940$ (35 $^{\circ}\text{C}$); $R^2 = 0.9946$ (40 $^{\circ}\text{C}$); $R^2 = 0.9960$ (45 $^{\circ}\text{C}$); $R^2 = 0.9955$ (50 $^{\circ}\text{C}$).

图 2 不同温度下的标准曲线

Fig. 2 Standard curves at different reaction temperature

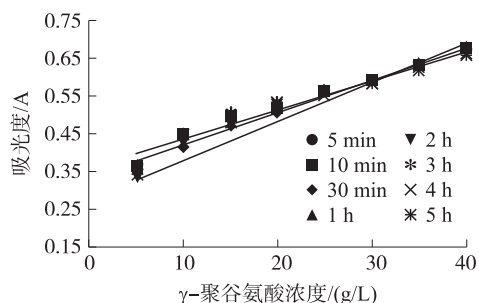
3.3 反应时间对测定的影响

将浓度为(5、10、15、20、25、30、35、40) g/L 的 γ -PGA 标准品溶液与浓度为 10 mg/L 的亚甲基蓝试液于 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应不同时间,在 664 nm 处测定其吸光度 A_{664} ,并绘制标准曲线。

由图 3 可见,反应不同时间的标准曲线都呈较好的线性关系,而且标准曲线没有太大的差异,表明反应时间对于测定结果影响不显著,因此,为了更加快速并且准确地检测 γ -PGA 含量,在后续的研究中,控制反应时间为 5 min。

3.4 亚甲基蓝比色法标准曲线

按照上述实验得到的测定条件,将浓度为(5、10、15、20、25、30、35、40) g/L 的 γ -PGA 标准液与浓度为 10 mg/L 的亚甲基蓝试液于 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min,在 664 nm 处测定吸光度 A_{664} ,绘制标准曲线,如图 4 所示。



注: $R^2 = 0.9948$ (5 min); $R^2 = 0.9881$ (10 min); $R^2 = 0.9850$ (30 min); $R^2 = 0.9786$ (1 h); $R^2 = 0.9607$ (2 h); $R^2 = 0.9544$ (3 h); $R^2 = 0.9613$ (4 h); $R^2 = 0.9489$ (5 h)。

图 3 反应时间对标准曲线的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on the standard curve

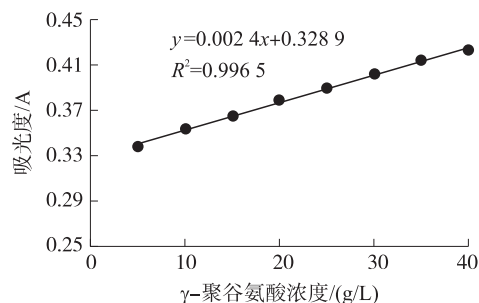


图 4 亚甲基蓝比色法标准曲线

Fig. 4 The standard curve of methylene blue colorimetry

3.5 方法的回收率和重现性

3.5.1 空白加标回收法

按照方法 1.2.1 配制得到浓度为 8 g/L (相对低浓度)、16 g/L (相对中浓度)、32 g/L (相对高浓度) 3 个不同浓度的 γ -PGA 标准液,分别取 γ -PGA 标准液 3 mL,亚甲基蓝 3 mL,充分振荡摇匀,5 min 后测定 A_{664} ,以蒸馏水做相应处理后作为空白,每个处理重复 3 次,实验结果见表 1,结果显示,应用亚甲基蓝比色法测定 γ -PGA 含量,其回收率和重现性都较好。

3.5.2 样品加标回收法

配制浓度为 8 g/L、16 g/L、32 g/L 的 γ -PGA 标准液,每个浓度的标准液各取 2 mL,然后分别加入等体积的经过稀释的样品溶液,充分混匀之后,加入 4 mL 的亚甲基蓝试液,充分振荡反应 5 min 之后,测定 A_{664} ,以 2 mL 样液加 2 mL 蒸馏水做相应处理后作为空白,每个浓度重复 3 次.测定结果见表 2,结果显示 γ -PGA 在发酵液中的回收率也较好.

表 1 回收率与重现性实验

Table 1 The recovery and reproducibility of test			
配制浓度/ (g/L)	测得浓度的 平均值/(g/L)	回收率/%	RSD/%
8	8.13	101.6	2.41
16	16.04	100.3	1.25
32	31.94	99.8	0.61

表 2 γ -PGA 在发酵液中的回收率

Table 2 The recovery of γ -PGA in the fermentation broths				
样品	加标样量/ (g/L)	回收标样量的 平均值/(g/L)	回收率/%	RSD/%
1	8	8.53	106.7	2.21
2	16	16.57	103.6	1.14
3	32	32.67	102.4	1.33

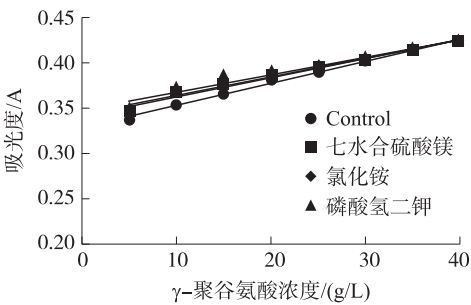
3.6 样品提取过程中发酵液脱色对测定的影响

本实验主要采用粉末状活性炭进行抽滤脱色,脱色率在 90%左右,在未脱色之前发酵液的颜色会干扰比色测定的结果,因此,在进行比色测定时要先对发酵液进行脱色处理,由 3.5.2 样品加标回收法中可以看出,经过脱色之后的发酵液对比色测定的结果干扰很小.

3.7 发酵液中无机盐成分对测定的影响

分别准确称取一定量的七水合硫酸镁、氯化铵、磷酸氢二钾、谷氨酸钠,然后分别溶于一定量的浓度为 10 mg/L 的亚基蓝试液中,使之浓度分别为 2.5 g/L、4 g/L、15 g/L、50 g/L,对照组为不加任何上述无机盐的浓度为 10 mg/L 的亚甲基蓝溶液,然后再分别与浓度为(5、10、15、20、25、30、35、40)g/L 的 γ -PGA 标准液于 25 $^{\circ}$ C 反应 5 min,在 664 nm 处测定吸光度 A_{664} ,绘制标准曲线,如图 5 所示.

由图 5 可知,加入不同无机盐的标准曲线都呈较好的线性关系,标准曲线虽然有所差异,但是差异并不明显,表明无机盐离子对于测定结果的影响并不显著.



$R^2 = 0.994\ 8$ (control); $R^2 = 0.962\ 7$ (七水合硫酸镁);
 $R^2 = 0.969\ 2$ (氯化铵); $R^2 = 0.965\ 1$ (磷酸氢二钾); $R^2 = 0.972\ 3$ (谷氨酸钠).

图 5 不同无机盐对标准曲线的影响

Fig. 5 Effect of different inorganic salts on the standard curve

4 结论

亚甲基蓝是一种带正电荷的芳香杂环化合物,而 γ -PGA 在发酵液中是以聚阴离子形式存在的.在溶液中,亚甲基蓝的氮原子可以和 γ -PGA 中羧基的氧原子配对,使亚甲基蓝试液的颜色发生变化.研究表明,带有正电荷的亚甲基蓝与具有聚阴离子性质的 γ -PGA 发生反应之后在 664 nm 处的吸光度大小与 γ -PGA 浓度成正比,并且具有良好的线性关系.该方法的反应温度为 25 $^{\circ}$ C,反应时间为 5 min,采用该方法测定 γ -PGA 的含量,其重现性和回收率都较好,而且在发酵液中的回收率也较高,并且发酵液需要经过脱色之后再行比色测定,且发酵液中的无机盐对于测定结果干扰性很小.该方法快捷简便、准确度高、结果可靠、无需特殊的设备和试剂,可以应用于 γ -PGA 的生物发酵生产中的检测.

[参考文献]

[1] 刘婷. 发酵液中 γ -聚谷氨酸的分离纯化及初步鉴定研究[D]. 西安:陕西科技大学,2016.
[2] 桑秀梅. 利用聚谷氨酸高产菌 NS-18 制备 γ -聚谷氨酸[D]. 南京:南京师范大学,2017.
[3] 董健,吕颖,方丽,等. γ -聚谷氨酸的发酵制备及快速鉴定分析方法研究[J]. 中国酿造,2012,32(5):148-150.
[4] MAKOTO A, KAZUYA S, HISAAKI N, et al. Enzymatic Synthesis of High-Molecular-Mass Poly- γ -glutamate and regulation of its stereochemistry[J]. Applied and environmental microbiology, 2004, 7:4249-4255.

(下转第 114 页)

- [15] TZAGOLOFF A, MEAGHER P. Assembly of the mitochondrial membrane system. V. properties of a dispersed preparation of the rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase of yeast mitochondria[J]. The journal of biological chemistry, 1971, 246(23): 7328-7336.
- [16] ALEXANDER T, ANTONI B, WALTER N, et al. Atp10p assists assembly of Atp6p into the Fo unit of the yeast mitochondrial ATPase[J]. The journal of biological chemistry, 2004, 279(19): 19775-19780.
- [17] CLAROS M G, VINCENS P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences[J]. European journal of biochemistry, 1996, 241(3): 779-786.
- [18] 岳强, 周惠. 粟酒裂殖酵母——一种良好的真核模式生物[J]. 韶关学院学报, 2003, 24(3): 100-102.
- [19] 黄敏. 基因敲除技术及其应用[J]. 广东轻工职业技术学院学报, 2009, 8(4): 12-14.
- [20] PAUL M F, BARRIENTOS A, TZAGOLOFF A. A single amino acid change in subunit 6 of the yeast mitochondrial ATPase suppresses a null mutation in ATP10[J]. The journal of biological chemistry, 2000, 275(38): 29238-29243.
- [21] DE J P, VAN DIJKEN J P, PRONK J T. Metabolic fluxes in chemostat cultures of *Schizosaccharomyces pombe* grown on mixtures of glucose and ethanol[J]. Microbiology, 1996, 142(6): 1399-1407.

[责任编辑: 黄 敏]

(上接第108页)

- [5] 张庆庆, 金鑫强, 陈剑翔, 等. 发酵液中 γ -聚谷氨酸含量快速测定方法研究[J]. 食品工业科技, 2012, 19: 294-296.
- [6] ING-LUNG S, YI-TSONG V. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications[J]. Bioresource technology, 2001, 79(3): 207-225.
- [7] 朱凡, 吕忠良, 杨叶东, 等. 高黏发酵液中 γ -聚谷氨酸的分离纯化工艺[J]. 化学工程, 2013, 41(12): 9-11.
- [8] EZZELL J W, WELKOS S L. The capsule of *Bacillus anthracis*, a review[J]. J Appl Microbiol, 1999, 87(2): 250.
- [9] 李德衡, 赵兰坤, 李树标. γ -聚谷氨酸的生物合成及应用研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2012, 41(3): 12-16.
- [10] 李江涛, 郑涛. 介孔碳材料对亚甲基蓝的吸附特性研究[J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2010, 13(1): 48-53.
- [11] 肖敏, 李丽, 钟龙飞, 等. 活性炭吸附法处理印染废水的研究[J]. 辽宁化工, 2009, 38(8): 537-539.
- [12] 王静心, 李政, 张秋亚, 等. 亚甲基蓝染液的 γ -PGA水凝胶脱色处理[J]. 印染, 2013, 24: 1-5.
- [13] MEHMET D, MAHIR A, AYDM T, et al. Kinetics and mechanism of removal of methylene blue by adsorption onto perlite[J]. Journal of hazardous materials, 2004, 109: 141-148.

[责任编辑: 黄 敏]