

荧光法测定微藻中色氨酸的含量

吴芳, 郭卫东, 张润, 夏恩琴, 周宽波

(厦门大学海洋系, 亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要:建立了微藻中色氨酸的荧光分析方法。以 NaOH 为水解液水解微藻, 在激发波长 225 nm, 发射波长 350 nm 处测定色氨酸的荧光强度。方法线性范围 0~0.07 mg/L, 检测限为 0.003 mg/L, 回收率 90%~100.1%。此法快速、简便、灵敏度高。

关键词:色氨酸; 微藻; 荧光法

中图分类号: Q503

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)10-0001-04

氨基酸是海洋微藻生长繁殖所必需的生化组分之一, 研究微藻体内氨基酸的组成及其含量, 对揭示其新陈代谢过程有重要意义。此外, 微藻在海水养殖中占有重要地位, 它是许多软体、甲壳动物幼体及仔稚鱼的优良饵料, 其营养价值与其所含必需氨基酸的含量和比例密切相关, 其中包括色氨酸^[1-4]。

在通常的氨基酸分析中一般都使用酸处理来水解蛋白质, 但是在酸水解条件下, 色氨酸极易被破坏, 所以在大多数的文献报道中都缺少色氨酸的数据^[2], 造成资料的不完整, 不能不说是一种很大的遗憾。作者建立了一种分析海洋微藻中色氨酸含量的快速、灵敏的荧光分析方法。

1 材料

1.1 藻种

金藻 (*Chrysophyta* spp.)、盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*)、小球藻 (*Chlorella* spp.)、角毛藻 (*Chaetoceros* spp.)、雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 5种。

1.2 微藻的培养

取若干高温消毒过的 3L 三角烧瓶, 倒入消毒过的天然海水, 加入 f/2 培养配方, 然后接入刚扩大的藻液, 用滤纸封口, 置于天然光源下, 每天振摇, 直至培养至对数生长期后期, 用离心法收集藻细胞。用纯净水冲洗 3 次, 移入表面皿中, 60℃ 下烘至恒质量, 研磨后置于干燥器中备用。

2 仪器与试剂

岛津 RF-5301 荧光分光光度仪, 配 1 cm 的吸收池。

L-色氨酸(上海生物工程技术有限公司), 配成浓度 50 mg/L 的标准储备液; 含 0.5% 淀粉的

6 mol/L NaOH 溶液(需新鲜配制); 6 mol/L HCl; pH = 10.5 的缓冲溶液: 0.5 mol/L KH_2PO_4 与 0.5 mol/L NaOH 溶液按 8.5 : 10 体积分数混合。

3 实验方法

3.1 色氨酸标准工作曲线

3.1.1 标准系列溶液配制

分别移取 0.0、0.05、0.10、0.20、0.25、0.30、0.35 mL 1 mg/L 色氨酸标准使用液于 5 mL 刻度试管中, 用 pH = 10.5 的 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液定容, 则标准溶液浓度分别为 0.00、0.01、0.02、0.04、0.05、0.06、0.07 mg/L。

3.1.2 荧光光谱及其测定

色氨酸有 2 个激发光谱峰(225 nm 和 280 nm) 和 1 个发射光谱峰(350 nm), 作者选用灵敏度高而干扰少的 225 nm 作激发波长, 在 295~380 nm 扫描荧光光谱, 于发射波长 350 nm 处读取荧光强度值。激发光谱狭缝宽度为 5 nm, 发射光谱狭缝宽度为 10 nm, 高速扫描。以标准溶液浓度为横坐标, 荧光强度为纵坐标绘制标准曲线, 如图 1 所示, 可见色氨酸在 0~0.07 mg/L 范围内线性良好。

3.2 样品水解

称取 1 mg 左右微藻样品于水解管内, 加入新鲜配制的内含 0.5% 可溶性淀粉的 6 mol/L NaOH 溶液 1 mL, 将水解管进行充纯氮 3 min, 封口, 在烘箱中 110℃ 水解 20 h 后, 放置于暗处冷至室温。

收稿日期: 2004-11-24; 修回日期: 2005-01-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40106007)

作者简介: 吴芳(1980), 女, 福建漳州人, 硕士研究生, 主要从事海洋生物地球化学研究, E-mail: wufang206@sina.com

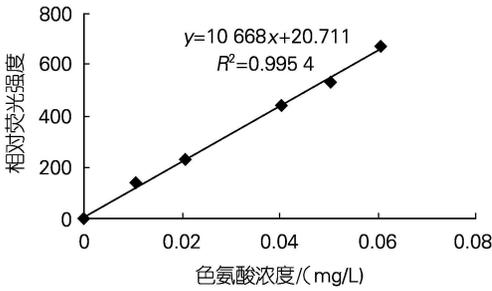


图1 色氨酸标准工作曲线

Fig. 1 The standard curve of tryptophan

将水解物转移至已加有 1.4 mL 6 mol/L HCl 的 50 mL 容量瓶中,用纯水冲洗水解管 7~8 次,直至完全转移为止,其总量在 40 mL 左右,加入 1 滴 0.1% 酚酞,使溶液呈粉红色,然后用 6 mol/L HCl 调至溶液无色,再用 1 mol/L NaOH 滴至溶液呈粉红色。用纯水定容,此为样液。

取 1 mL 样品于 5 mL 刻度试管中,用 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液定容,摇匀,此为样品待测液。

3.3 样品测定

样品按照与标准溶液相同的方法进行荧光测定。

3.4 样品色氨酸含量计算

采用标准曲线法。

色氨酸含量($\mu\text{g/g}$) =

$$\frac{\text{标准曲线上查得色氨酸含量}(\mu\text{g}) \times \text{稀释倍数} \times 1000}{\text{样品量}(\text{mg})}$$

4 结果

4.1 条件优化

4.1.1 水解液 NaOH 的浓度

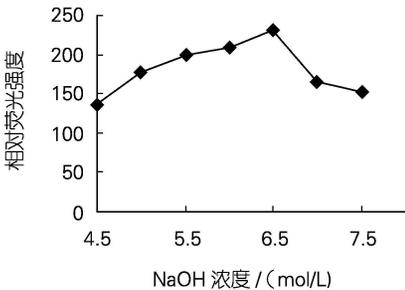


图2 水解液浓度对荧光强度的影响

Fig. 2 Effect of concentration of hydrolyzing solution on fluorescence intensity

为考察 NaOH 水解液浓度对微藻水解的影响,分别向 1 mg 角毛藻样品中加入不同浓度的 NaOH 水解液 1 mL 进行水解。结果表明,NaOH 浓度在 5.5~6.5 mol/L 范围内比较适宜,本实验选用 6.0 mol/L,结果见图 2。

4.1.2 缓冲液 pH 的影响

色氨酸的荧光信号大小与缓冲液 pH 有很大关系^[5]。从图 3 可见,在 pH 10~11 时,色氨酸荧光信号强度比较适宜,本实验选择 pH = 10.5。

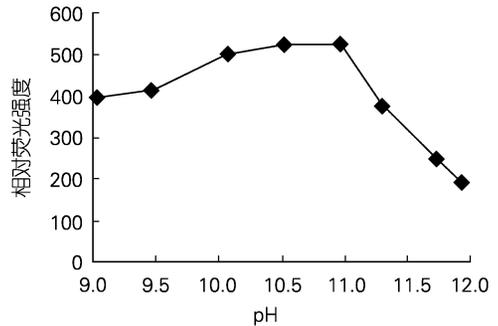


图3 pH 对荧光强度的影响

Fig. 3 Effect of pH on fluorescence intensity

4.2 检测限和精密度

在最佳条件下,对 0.05 mg/L 的色氨酸标准溶液连续测定 9 次,由荧光信号强度标准偏差的 3 倍与工作曲线斜率之比,得检测限为 0.003 mg/L。对小球藻、金藻样品连续取样测定 9 次,相对标准偏差(RSD)分别为 3.03% 和 2.79%。

4.3 样品测定的重复性和回收率试验

取 6 份角毛藻样品,按上述水解法处理,仪器条件同上,测定结果如表 1 所示。重现性试验的相对标准偏差为 4.67%,表明重现性较好。

对角毛藻、雨生红球藻和金藻的水解液进行加标回收实验,测定结果见表 2,回收率为 90%~100.1%,达到了分析实验的要求。

4.4 样品分析

5 种微藻的色氨酸含量如表 3 所示。由表 3 可知,5 种微藻中色氨酸含量由高到低的排列顺序是雨生红球藻 > 盐生杜氏藻 > 角毛藻 > 小球藻 > 金藻。

表 1 重现性试验

Tab. 1 Reproducible test

样品量 (mg)	色氨酸含量 ($\mu\text{g/g}$)	平均含量 ($\mu\text{g/g}$)	标准偏差	相对标准偏差 (%)
1.0	5070			
1.1	4710			
1.0	4880			
1.0	5210	4960	230	4.67
1.1	4700			
0.9	5200			

表 2 回收率试验

Tab. 2 Recovery test

样品名	样品含量 (μg)	加标量 (μg)	加标后测得量 (μg)	回收量 (μg)	回收率 (%)
角毛藻	0.373	1.000	1.374	1.001	100.1
雨生红球藻	0.025	0.075	0.096	0.071	95.7
雨生红球藻	0.025	0.200	0.225	0.200	100.1
雨生红球藻	0.025	0.250	0.255	0.230	92.0
金藻	0.089	0.075	0.169	0.080	90.0

表 3 微藻中色氨酸的含量(干质量)

Tab. 3 The contents of tryptophan in microalgae (dry mass)

微藻名称	色氨酸含量($\mu\text{g/g}$)
金藻	3 360
盐生杜氏藻	4 870
小球藻	3 580
角毛藻	4 610
雨生红球藻	4 890

4 760 $\mu\text{g/g}$, 与本实验相同属的几种微藻中的色氨酸含量相比可以发现, 两种方法的测定结果具有很好的可比性。

色氨酸在受到紫外光照射后, 会产生比激发波长更长的荧光信号。利用色氨酸的荧光特性就可以用简便、快捷、高灵敏度的荧光光谱分析方法来检测微藻中色氨酸的含量。

色氨酸的荧光特性还可用来监测海洋微藻生物量的变化^[8], 由于色氨酸是一种比叶绿素更为普遍的代谢产物, 本方法还可用于监测微生物特别是不进行光合作用的微生物的生长过程。

5 讨论

经碱水解处理后的色氨酸样品, 可由氨基酸自动分析仪、高效液相色谱等方法进行测定。采用氨基酸自动分析仪分析色氨酸, 方法重现性好, 但分析时间过长(30 min), 需重新配置缓冲液, 操作不便。此外, 样品用酸中和和碱, 不经脱盐直接上机测定, 对树脂造成污染^[6]。采用高效液相色谱法分析色氨酸, 回收率较低, 且其适用范围尚存在争议^[7]。

Brown^[3] 曾用液相色谱法测定了用于海洋动物养殖的 16 种微藻的氨基酸组成, 其中球等鞭金藻、杜氏藻和角毛藻的色氨酸含量分别为 3 770、3 000 和

6 结论

作者研究了微藻中色氨酸含量快速、灵敏的荧光分析方法。方法线性范围 0~ 0.07 mg/L, 检测限为 0.003 mg/L, 回收率 90%~ 100.1%。

参考文献:

- [1] 夏恩琴, 郭卫东, 胡明辉. 海洋蛋白质荧光分析的研究进展[J]. 台湾海峡, 2004, 23(2): 238-244.
- [2] 王大志, 朱友芳, 李少菁, 等. 7 种微藻蛋白质含量和氨基酸组成的比较[J]. 台湾海峡, 1999, 18(3): 297-

- 302.
- [3] Brown M R. The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture[J]. **J Exp Mar Biol Ecol**, 1991, 145: 79- 99.
- [4] Brown M R, Jeffrey S W. Biochemical composition of microalgae from the green algae classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments[J]. **J Exp Mar Biol Ecol**, 1992, 161: 91- 113.
- [5] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等. 荧光分析法(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1991. 495.
- [6] 李予霞, 王少珩. 色氨酸分析方法的筛选研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2001, 5(1): 41- 44.
- [7] 伍喜林. 色氨酸分析技术的现状和展望[J]. 饲料工业, 1994, 15(5): 29- 33.
- [8] Petersen H T. Determination of an *Isochrysis galbana* algal bloom by L-tryptophan fluorescence[J]. **Marine Pollution Bulletin**, 1989, 20(9): 447- 451.

Fluorescence measurement of tryptophan content in microalgae

WU Fang, GUO Weidong, ZHANG Run, XIA Erqin, ZHOU Kuanbo

(Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Nov. , 24, 2004

Key words: tryptophan; microalgae; fluorescence method

Abstract: This paper set up a procedure of fluorescence method to measure tryptophan in microalgae. NaOH containing 0.5% soluble starch was used as hydrolytic solution. The fluorescence intensity of tryptophan was determined with excitation wavelength 225 nm and emission wavelength 350 nm. The linear range of calibration graph was 0~ 0.07 mg/L. The detection limit was 0.003 mg/L. The recovery rate of sample was 90% ~ 100.1%.

(本文编辑:张培新)