



超声波对球等鞭金藻脂肪酸组成的效应研究*

EFFECT OF ULTRASONIC RADIATION ON THE FATTY ACID COMPOSITION IN *Isochrysis galbana*

李文权 王清池 陈清花 廖启斌 胡智兵

(厦门大学海洋学系, 厦门大学亚热带海洋研究所 361005)

一般来说, 较低强度的超声波可以通过改进反应物的质量传输机制, 提高酶的活性或加速细胞的新陈代谢过程^[1]。国内一些学者研究表明, 采用低功率超声辐照培养基, 可提高藻类细胞的生长速率, 从而提高这些细胞的蛋白质产量^[2-4]。海洋生物活性物质的研究, 是开发海洋生物资源的一个热点, 在海洋单胞藻营养成分中, 多不饱和脂肪酸(PUFA)是重要的生物活性物质。有关超声辐射法提高海洋单胞藻 PUFA 含量的研究尚未见有报道, 如何通过改变超声辐射条件来改变海洋单胞藻体内 PUFA 含量与百分组成, 是提高海藻饲料营养价值十分重要的研究课题。

作者应用自行研制的超声发射装置对处于对数生长期的球等鞭金藻进行超声作用, 旨在对超声波在开发利用海洋微藻资源方面的应用作初步探索。

1 材料和方法

1.1 样品和试剂

实验所选用藻种为球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*), 培养液采用 F/2 配方配制, 在自制的人工光源培养箱 (2×40 W 白炽灯加热, 4×40 W 日光灯照射) 中培养。光暗周期为 12 h/12 h, 温度用电子继电器控制在 26℃, 每天振摇数次。脂肪酸标准品为 SIGMA 公司产品。

1.2 实验采用超声辐射条件

自制的超声发射装置, 换能器为复合式纵向压

电换能器, 其谐振频率为 20 kHz, 谐振阻抗为 95 Ω。施加于换能器上的电压分 3 档, 即 20 V、40 V、60 V, 超声作用一次, 时间为 60 s。

1.3 样品的水解和脂肪酸甲酯的制备

取 50 ml 实验藻液(细胞密度 120 000 个/ml), 过滤完毕置干燥器干燥后连同滤膜放入带螺帽的水解管内, 加入正十九酸内标液和 2 ml CHCl₃-CH₃OH 混合液(体积比为 2:1), 充 N₂ 1 min 后密闭封口, 以 SQ-250 型超声波清洗器(33 kHz, 250 W)超声萃取 30 min, 移上上清液, 重复 3~4 次(超声作用时间可缩短为 10 min), 合并萃取液, 氮气浓缩吹干后, 加入 2 mol/L HCl-CH₃OH 溶液, 充氮气后密闭(为确保气密性良好, 可先用聚四氟乙烯材料密封瓶口后再旋上螺帽拧紧)。于 100℃ 水浴中反应 40 min, 冷却后用 2 ml 正己烷分两次提取, 合并提取液于具塞离心管中, 用氮气吹至 20~50 μl 供色谱分析用。

1.4 气相色谱分析

实验所用仪器为 SP-3420 型(北京分析仪器厂生产)气相色谱仪, 30 m×0.220 mm SE-54 弹性石英毛细管色谱柱(Australia International Sales)。程序升温分 4 个阶段进行, 第 1 段柱温为 50℃~120℃, 升温速

* 国家自然科学基金资助项目 39870565 号和福建省自然科学基金资助项目 C97006 号。

收稿日期: 1999-05-06; 修回日期: 1999-10-21

率 20 ℃/min, 于 120 ℃ 恒温 1 min; 第 2 段柱温为 120 ℃ 至 180 ℃, 升温速率 6 ℃/min, 于 180 ℃ 恒温 1 min; 第 3 段柱温为 180 ℃ ~ 210 ℃, 升温速率 6 ℃/min, 于 210 ℃ 恒温 10 min; 第 4 段柱温为 210 ℃ ~ 280 ℃, 升温速率 3 ℃/min, 于 280 ℃ 恒温 5 min。进样器温度为 300 ℃, 氢火焰离子化检测器 (FID) 温度为 300 ℃, 载气为高纯氮, 柱头压为 0.42 MPa, 恒流控制, 氮气流量 30 ml/min, 氢气流 30 ml/min, 空气流量 300 ml/min, 分流比 1:18, 进样量 1 μl。海洋微藻脂肪酸的气相色谱定性和定量分析按文献 [5] 方法进行。

2 结果和讨论

平行移取对数生长期 (培养约 1 周左右) 的球等鞭金藻藻液各 50 ml 于 8 个 100 ml 小三角烧瓶中, 按 A1~A8 编号。A1 号、A2 号为对照组, 其他藻液以超声发射装置进行超声辐射, 施加于换能器上的电压分别为 20 V、40 V、60 V, 同时进行平行实验, 取平均值计算结果。藻液经超声作用后, 静置避光过夜后过滤, 样品以毛细管气相色谱法分析测定。测定结果见表 1。

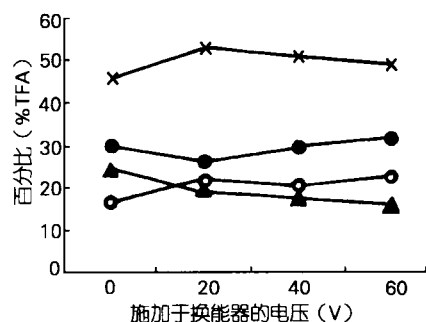


图 1 球等鞭金藻在不同超声条件下脂肪酸百分比的变化

●, TSFA; ▲, TMUFA; ○, C18:3; ×, TPUFA

由表 1 中生长速率常数 K 和 TFA 数据可知, 与对照组 (0V) 的实验结果比较, 在工作电压 20 V 条件下, 经超声处理 60 s 的球等鞭金藻生长速率和总脂肪酸含量 (% 干重) 都有一定的提高, 随工作电压进一步增大, 生长速率开始明显下降, 低于对照组, TFA 含量在 20 V、40 V 条件下有所提高, 工作电压升至 60 V 时, 其含量开始明显下降。

由图 1 可知, 球等鞭金藻的主要脂肪酸 C18:3 经超声作用后, 其百分含量得到显著提高, 随工作电压的增大, 百分含量呈现上升的趋势。球等鞭金藻在较低工作电压 (20 V、40 V) 条件下进行超声作用, 二十碳五烯酸 (EPA) 百分含量有明显的提高 (见图 2), 由对照组的 1.77% 升至 1.95% 和 1.85%, 二十二碳六烯酸 (DHA) 则由对照组的 5.92% 升至 6.59% 和 6.11%, 工作电压升至 60 V 条件下, EPA 和 DHA 的含量均有明显降低, 分别降至 1.31% 和 5.55%。球等鞭金藻体内的 TSFA 占总脂肪酸的百分比在工作电压为 20 V 时, 由对照组的 29.9% 降至 26.59%, 之后, 随工作电压增大其百分比开始上升; TMUFA 随工作电压的增大而呈现下降趋势; TPUFA 占总脂肪酸的百分比经超声处理之后, 明显提高, 最大值 53.18% 出现在工作电压为 20 V 条件下, 比对照组提高了 7%。

表 1 超声波对球等鞭金藻脂肪酸百分含量的影响 (% TFA)

工作电压 (V)	0	20	40	60
C14:0	13.15	11.87	13.59	14.33
C15:0	0.28	0.17	0.23	0.24
C16:4	3.25	3.62	3.72	3.54
C16:3	2.20	2.57	2.28	2.18
C16:2	0.67	0.60	0.56	0.61
C16:1	4.95	3.50	3.29	3.23
C16:0	15.18	13.53	15.55	16.44
C18:4	9.29	10.15	10.45	8.62
C18:3	16.81	22.22	21.39	23.98
C18:2	5.46	4.74	4.70	3.92
C18:1	16.72	14.98	12.89	11.87
C18:0	1.28	1.01	0.82	1.71
C20:4	0.70	0.72	0.59	0.65
C20:5	1.77	1.95	1.85	1.31
C20:1	2.36	1.75	1.96	1.84
C22:6	5.92	6.59	6.11	5.55
TSFA	29.90	26.59	30.19	32.72
TMUFA	24.04	20.23	18.14	16.94
TPUFA	46.07	53.18	51.66	50.34
TFA (% 干重)	6.683	7.021	6.741	5.154
生长速率常数	0.085	0.087	0.082	0.079
$K (d^{-1})$				

注: TFA, 总脂肪酸; TSFA, 总饱和脂肪酸; TMUFA, 总单不饱和脂肪酸; TPUFA, 总多不饱和脂肪酸。K 为生长速率常数 (d^{-1}), $K = (\lg N - \lg N_0) / T$, N_0 为藻液初始细胞密度数; N 为 T 时刻藻液细胞密度数; T 为实验时间 (d)。

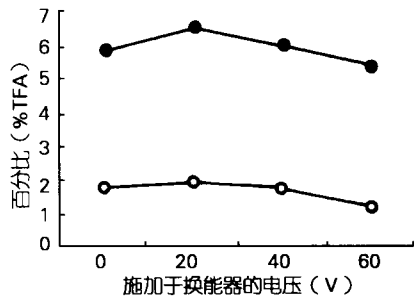


图2 球等鞭金藻在不同超声条件下 EPA、DHA 百分比含量的变化

●, DHA ; ○, EPA

从上述实验结果可知, 在较低的工作电压 (20 V、40 V) 的超声辐射下, 可以提高球等鞭金藻的生长速率, 并通过改进细胞的质量传输, 加速细胞的新陈代谢过程, 从而提高某些不饱和脂肪酸的含量。超声波与微藻细胞的相互作用机制是比较复杂的, 超声振动能刺激经细胞半透膜的弥散过程, 因此加强了组织的再生作用。微藻细胞还能吸收超声能量, 从而加速了细胞内某些生物活性物质的合成。而在较高工作电压的超声作用下, 可能由于空化作用使细胞内酶变性, 引起负面影响, 使细胞生长速率下降, 同

时造成细胞超微结构的损伤, 破坏了细胞正常的新陈代谢过程。因此, 确定适宜的超声辐射工作电压, 对于超声波生物效应的研究是十分重要的。

4 结语

由本文实验结果来看, 较低工作电压条件下, 超声辐射处理后的球等鞭金藻生长速率有一定的提高, 百分组成发生明显变化, 尤其是不饱和度有较大的提高, 如 C18:3、EPA、DHA 等多不饱和脂肪酸和 TPUFA 的百分含量增加明显。如何通过调节超声波功率、频率和作用时间实现超声辐射条件的最优化, 是进一步提高海洋微藻的多不饱和脂肪酸含量和百分比的关键, 这方面工作有待进一步深入研究。

参考文献

- 1 秦松等. 海洋与湖沼, 1995, 26(1): 109~112
- 2 章之蓉等. 水生生物与物理因子. 北京: 科学出版社, 1994. 112~113
- 3 路德明等. 应用声学, 1994, 14(1): 22~25
- 4 袁易全主编. 近代超声原理与应用. 南京: 南京大学出版社, 1996. 170~173
- 5 蔡阿根等. 海洋技术, 1998, 17(4): 64~68

(本文编辑: 张培新)