

# 三角褐指藻细胞破碎方法的研究

汤卫华, 岳 鹏, 王 芃, 殷海松

(天津现代职业技术学院 生物化工系, 天津 300350)

**摘要:** 三角褐指藻是一种含有较高多不饱和脂肪酸的海洋单胞藻。为了从细胞中提取不饱和脂肪酸, 采用反复冻融法、超声波破碎法和匀浆法分别对三角褐指藻细胞进行破碎, 并测定油脂提取率。结果表明, 超声波破碎法、反复冻融法和匀浆法的最大细胞破碎率分别为 91.5%, 56.7% 和 81.2%; 油脂提取率分别为 18.1%, 13% 和 13.4%。从操作的简捷性和经济效益来看, 超声波破碎法优于反复冻融法和匀浆法。

**关键词:** 三角褐指藻; 反复冻融法; 超声波破碎法; 匀浆法; 油脂

中图分类号: Q94-33

文献标志码: A

doi: 10.3969/j.issn.1671-9646.2012.02.013

## Research on the Methods of *Phaeodactylum tricornutum* Cells Fragmentation

TANG Wei-hua, YUE Kun, WANG Peng, YIN Hai-song

(Department of Chemical Biology, Tianjin Modern Vocational Technology College, Tianjin 300350 China)

**Abstract:** The marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* is rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs). In order to extract PUFAs from cells, three methods of cells fragmentation, including ultrasonic method, freezing-thawing method and homogenate method are introduced. The result shows that cell disruption rates are 91.5%, 56.7% and 81.2% respectively; extraction rates are 18.1%, 13% and 13.4%. Considering the operating convenience and economic benefits, the ultrasonic method is superior to the methods of freezing-thawing and homogenate.

**Key words:** *Phaeodactylum tricornutum*; freezing-thawing method; ultrasonic method; homogenate method; total lipid

在海洋单胞藻营养成分中, 多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 具有独特的生物活性, 在防治心脑血管疾病、某些炎症方面具有良好的效果, 还具有一定的抑制肿瘤作用。此外, 二十二碳六烯酸 (DHA) 具有促进大脑发育, 改善大脑机能, 能预防视力下降<sup>[1-2]</sup>。传统上多不饱和脂肪酸的主要来源是鱼油, 但由于鱼油产量不稳定, 且具有含有高胆固醇和难闻的腥臭味等缺点, 使 PUFAs 的生产和应用受到限制<sup>[3]</sup>。因此利用海洋微生物尤其是藻类生产多不饱和脂肪酸大有前途。

三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 属于硅藻门羽纹纲褐指藻目褐指藻属。三角褐指藻是具有重要经济价值的藻类, 多不饱和脂肪酸的含量较高<sup>[4]</sup>。由于三角褐指藻中的 PUFAs 是细胞膜的组成成分, 同时也是特殊的生物活性物质, 因此, 要得到高产率的活性物质需要建立有效的细胞破碎方法。

目前, 微藻的细胞破碎方法主要有: 反复冻融法、化学试剂处理法、超声波法、匀浆法、融胀法等。为了建立有效的三角褐指藻细胞破碎方法, 本文对反复冻融法、超声波破碎法和匀浆法进行了比

较和分析。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试验材料

三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*), 天津科技大学天津市工业微生物重点实验室提供。

三角褐指藻的培养: 培养液采用 f/2 配方配制<sup>[5]</sup>, 盐度为 30, pH 值为 7.5。光照强度为 5 000 Lx, 培养温度为 (22±1) °C, 光暗比 12 h: 12 h。培养 14 d 后离心收集藻体细胞, 蒸馏水洗涤 2 次后, 稀释成 3 个细胞密度后备用。

#### 1.2 破碎方法

##### 1.2.1 反复冻融法破碎细胞

将不同密度的三角褐指藻细胞在 -20 °C 下进行冻融, 每次冷冻 1 d, 室温下溶解 30 min, 分别反复冻融 1, 2, 3, 4 次。以冻融前后显微镜下观察完整细胞个数计算细胞破碎率。

##### 1.2.2 超声波法破碎细胞

将一定密度的三角褐指藻细胞置于超声波破碎仪中, 其破碎频率为 20 kHz, 工作/间歇为 30 s/30 s,

收稿日期: 2011-10-12

作者简介: 汤卫华 (1979—), 女, 江西人, 博士, 副教授, 研究方向: 生物化工。E-mail: tangweihua79@hotmail.com。

超声功率为 95, 190, 285, 475 W, 分别破碎 10, 20, 30 min, 计算其细胞破碎率。

### 1.2.3 匀浆法破碎细胞

将离心收集的三角褐指藻细胞置于玻璃匀浆器中分别匀浆 10, 20, 30 min 后, 计算其细胞破碎率。

## 1.3 油脂的测定

氯仿—甲醇法<sup>[6]</sup>测定油脂提取率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反复冻融法破碎细胞

将离心分离收集的三角褐指藻液稀释成 3 个密度。分别冻融 1, 2, 3, 4 次后, 在显微镜下观察冻融前后完整细胞数, 计算三角褐指藻细胞破碎率。

反复冻融法细胞破碎率见表 1。

表 1 反复冻融法细胞破碎率

反复冻融次数 / 次	不同密度三角褐指藻液的细胞破碎率 / %		
	0.854 g·L <sup>-1</sup>	0.425 g·L <sup>-1</sup>	0.218 g·L <sup>-1</sup>
1	47.4	45.2	43.6
2	54.9	52.7	50.1
3	56.7	55.6	53.4
4	56.2	56.4	53.8

由表 1 可知, 在相同的冻融次数、不同的细胞密度下, 三角褐指藻细胞的破碎率差异较小; 而在相同的细胞密度下, 冻融次数对细胞破碎率的影响较大, 随着冻融次数的增加, 细胞破碎率也随之增大。但是当冻融次数从 3 次增至 4 次时, 细胞破碎率增加并不明显。

### 2.2 超声波破碎法破碎细胞

一定的三角褐指藻密度下, 考察不同的破碎功率 (95, 190, 285, 475 W) 和破碎时间 (10, 20, 30 min) 对超声波细胞破碎的影响。

超声波破碎法细胞破碎率见表 2。

表 2 超声波破碎法细胞破碎率

超声时间 t/min	不同超声功率下细胞破碎率 / %			
	95 W	190 W	285 W	475 W
10	60.5	65.2	64.1	65.8
20	82.7	83.4	91.5	88.2
30	83.8	84.2	90.8	89.5

进行超声波处理时, 超声波的高频振动与微生物细胞的振动不协调, 造成细胞周围环境局部真空, 使细胞膜产生空穴作用, 从而使细胞破碎<sup>[7]</sup>。表 2 数据表明, 超声波的功率对细胞破碎效果产生很大的影响, 功率越大, 有利于细胞膜产生空穴作用, 产生更多的空化泡, 使破碎效果增强。但当功率提高至 300 W 时, 其细胞破碎率增加已经不再明显。同时研究发现细胞破碎率随破碎时间的延长而增加, 但

是破碎时间超过 20 min 后, 其破碎率增加并不明显。

### 2.3 匀浆法破碎细胞

在不同的三角褐指藻细胞密度下, 分别匀浆 10, 20, 30 min 后, 计算匀浆前后完整细胞个数。

表 3 匀浆破碎法细胞破碎率

匀浆时间 t/min	不同密度三角褐指藻液的细胞破碎率 / %		
	0.854 g·L <sup>-1</sup>	0.425 g·L <sup>-1</sup>	0.218 g·L <sup>-1</sup>
10	60.5	59.8	59.0
20	81.2	80.2	78.3
30	80.5	80.1	80.9

匀浆破碎法细胞破碎率见表 3。

研究发现, 不同的细胞密度、相同的匀浆时间, 三角褐指藻的细胞破碎率差异不大, 这说明藻液密度对细胞破碎率的影响不大。细胞密度一定的情况下, 匀浆时间越长, 细胞破碎率也越高。以藻种密度为 0.854 g/L 为例, 当匀浆时间为 10 min 时, 细胞破碎率仅为 60.5%; 破碎时间继续延长到 20 min, 细胞破碎率达 81.2%; 但当匀浆时间超过 20 min 后, 破碎率增加不明显。

将反复冻融法、超声波破碎法和匀浆法 3 种细胞破碎方法进行比较。其中反复冻融法中冻融次数为 3 次、藻液密度为 0.854 g/L, 其最大细胞破碎率仅为 56.7%, 且该操作耗时较长; 超声波破碎法中, 超声波功率为 285 W, 超声时间为 20 min, 其最大细胞破碎率可达 91.5%, 该方法破碎时间短, 且可防止油脂的氧化 (冰浴中进行); 匀浆法中, 藻种密度为 0.854 g/L, 匀浆时间为 30 min, 最大细胞破碎率可达 81.2%, 但是匀浆过程中产生的大量热量会加快油脂的氧化。因此, 超声波破碎法优于反复冻融法和匀浆法。

### 2.4 不同破碎方法对油脂提取效率的比较

三角褐指藻细胞密度为 0.854 g/L, 采用不同的细胞破碎方法, 使胞内油脂从细胞中释放出来, 然后采用氯仿—甲醇法提取油脂, 计算细胞破碎率和油脂提取率。

3 种破碎方法的细胞破碎率和油脂提取效率见图 1。

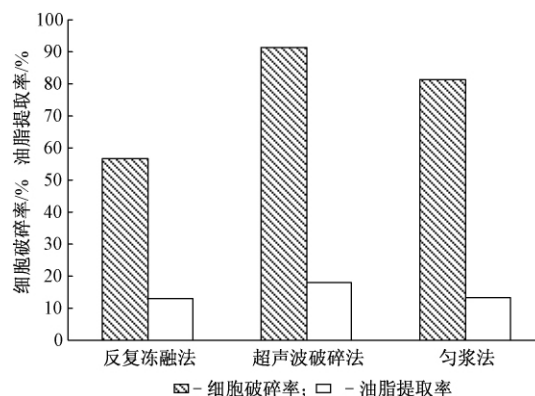


图 1 3 种破碎方法的细胞破碎率和油脂提取效率

(下转第 69 页)

自身易氧化导致,也可能是对色素有轻微的还原作用,在标准安全范围内适量添加即可。

### 2.2.8 山梨酸钾对色素稳定性的影响

山梨酸钾对色素稳定性的影响见表13。

表13 山梨酸钾对色素稳定性的影响

山梨酸钾 m/mg	2	6	10	14	18
吸光度 A	0.753	0.756	0.759	0.752	0.758

山梨酸钾常作为防腐剂使用,由表13可看出,随着山梨酸钾添加量的增加对吸光度的影响不大。因此在标准的基础上,再根据实际情况考虑山梨酸钾的添加量即可。

### 2.2.9 常见金属离子对色素稳定性的影响

分别测定了  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  的硫酸盐或盐酸盐溶液对万寿菊色素稳定性的影响,这7种金属离子溶液的浓度均为0.5 mol/L。通过试验发现,加入  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  分别有沉淀析出;加入  $\text{Al}^{3+}$  后,提取液的颜色没有发生变化,仍是原来的黄色;而加入  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  三种离子后,溶液的颜色发生了很大改变,因而表明万寿菊色素在加工、使用及储藏过程中应尽量避免与铁、铜制容器接触。

## 3 结论

提取万寿菊色素的最佳溶剂为石油醚;最佳提取工艺条件为:以1:8的料液比,在30℃下浸提60 min。该色素的耐光性好,热稳定性不是很好;

pH 值总体来说对色素的影响不大,但是在碱性条件下更加稳定;蔗糖浓度、食盐浓度对其稳定性均有影响,应根据实际需要添加;除了抗坏血酸 VC 外,柠檬酸与山梨酸钾对色素的稳定性影响不大,只要按照国家标准添加即可;金属离子对色素的影响比较大,因而在万寿菊色素的加工及储藏过程中应尽量避免与铁、铜、钙等容器接触。

## 参考文献:

- [1] 刘品华,李照刚,魏柱平.万寿菊花中提取胡萝卜素和叶黄素的研究[J].曲靖师范学院院报,2003,22(6):40-42.
- [2] 宋昊,何泽超.万寿菊中叶黄素的分析方法研究[J].化工设计,2003(4):32-46.
- [3] 刘海廷,杨志峰,刘福.植物色素的提炼[J].化学工程师,1995,48(3):45-46.
- [4] 赵文恩,孙晓萍,时国庆,等.万寿菊叶黄素提取分离研究[J].食品科学,2003(12):87-105.
- [5] 张小吐,张建武,王朝晖,等.万寿菊花干粉中总叶黄素的分离测定[J].中国国境卫生检疫杂志,1994(55):101-120.
- [6] 成功,黄文书,苏亚洲,等.微波辅助提取万寿菊色素工艺条件研究[J].中国食物与营养,2008(12):45-60.
- [7] 彭子模,刘玉祥,马晓东,等.万寿菊色素急器稳定性研究[J].粮食与油脂,2002(12):68-80.
- [8] 王桃云,王金虎.野菊花黄色素的理化性质研究[J].江苏农业科学,2003,83(3):71-73.
- [9] 张玉清,王海棠.万寿菊色素的初步研究[J].天津商学院报,1990,10(2):36-37.
- [10] 张晓彤,刘慧.万寿菊色素研究综述[J].天津商学院报,1991,11(2):24-29.

(上接第49页)

比较反复冻融法、超声波破碎法和匀浆法发现,反复冻融3次后,其细胞破碎率和油脂提取率分别为56.7%和13.0%;超声波细胞破碎20 min后,其细胞破碎率和油脂提取率分别为91.5%和18.1%;匀浆20 min后,其细胞破碎率和油脂提取率分别为81.2%和13.4%。

## 3 结论

反复冻融法、超声波破碎法和匀浆法最大细胞破碎率分别为56.7%,91.5%和81.2%;同时其油脂提取率分别为13.0%,18.1%和13.4%。超声波破碎和匀浆法耗时较短且细胞破碎率较高,但是,匀浆过程中会产生大量热量,会加快不饱和脂肪酸的氧化。综合细胞破碎率和油脂提取率比较,超声波破碎法要优于反复冻融法和匀浆法。

## 参考文献:

- [1] 廖启斌,李文权,陈清花,等.营养盐对三角褐指藻脂

肪酸含量与百分组成的影响[J].海洋环境科学,2000,19(2):6-9.

- [2] 万新祥,张立,藏吉.三角褐指藻中多烯脂肪酸的初步研究[J].中国生化药物杂志,1998,19(2):76-78.
- [3] 蒋汉明,高坤山.氮源及其浓度对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响[J].水生生物报,2004,28(5):545-551.
- [4] 杨哲,魏东盛,邢来君,等.三角褐指藻 D5-脂肪酸脱氢酶的克隆及在酿酒酵母中的表达[J].生物工程学报,2009,25(2):195-199.
- [5] Guillard R R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8: 229-239.
- [6] 温少红,王长海.光照和培养时间对紫球藻细胞脂肪酸含量的影响[J].中国海洋药物,2000(1):47-49.
- [7] 赵瑞香,王大红,牛生洋,等.超声波细胞破碎法监测嗜酸乳杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶活力的研究[J].食品科学,2006,27(1):47-50.