

超声波对湛江等鞭金藻生长和脂肪酸组成的影响

李文权¹, 王 宪¹, 陈清花¹, 张元标¹, 翁蓁洲¹

(1. 厦门大学 海洋系, 厦门大学亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 设计了 1 个超声频率、超声功率和处理时间三因素四水平的正交实验, 研究了超声波对湛江等鞭金藻的生物学效应. 实验结果表明, 超声频率对湛江等鞭金藻的生物学效应显著, 而超声功率和处理时间的影响相对较小. 对于提高湛江等鞭金藻生长速率常数, 最佳超声条件为 20 kHz, 6 W, 10 s 3 次; 对于提高其脂肪酸不饱和度和主要不饱和脂肪酸百分比, 最佳超声条件为 20 kHz, 4~ 6 W, 30 s. 在最佳超声条件下, 湛江等鞭金藻生长速率常数最高可达 0.630 d, 是对照组的 2.02 倍, 其脂肪酸不饱和度最高可达 79.6%, 比对照组提高 7.8%, 其中主要不饱和脂肪酸的百分含量均得到不同程度的提高.

关键词: 超声波; 湛江等鞭金藻; 生长; 脂肪酸

中图分类号: Q177 文献标识码: A 文章编号: 0253- 4193(2002)03- 0094- 07

1 引言

超声波技术在海洋微藻的应用是一个新颖的研究课题. 已有研究表明, 只要超声波的能量、频率、处理时间适宜, 则超声波产生的生物效应总是积极的^[1~ 3], 例如利用超声波对亚心形扁藻进行短期处理, 可得到比对照组高 30% 的细胞密度^[4]. 本课题组也进行了球等鞭金藻和三角褐指藻的超声实验, 取得了明显的实验结果^[5, 6]. 为了进一步研究超声波对海洋微藻的生物学效应, 本文探索促进微藻生长和提高其不饱和脂肪酸含量的最佳超声实验条件.

2 材料和方法

2.1 藻种的培养

取砂滤过的海水, 经 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤后, 高压灭菌(0.14 MPa, 30 min). 采用 F/2 配方(盐度 28.4, pH 7.90) 配制培养液. 以湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhanjiangensis*) 作为

收稿日期: 2000- 08- 28; 修订日期: 2000- 12- 11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870565).

作者简介: 李文权(1946-), 男, 福建省厦门市人, 教授, 从事海洋有机化学研究.

实验藻种, 于生化培养箱(SPX-250型)中培养, 光强为4 000 lx, 光暗周期为12 h/12 h, 温度为26 ℃, 每天振摇4次, 并定期(第8天)扩养. 细胞密度用血球计数板计数. 本实验所用试剂和玻璃仪器均经高压灭菌.

2.2 正交实验的设计

本实验采用超声生物促进生长仪(CY-5D型, 宁波新芝科器研究所), 设计了一个包括超声频率、超声功率和处理时间三因素四水平的正交实验. 根据仪器的条件, 超声频率选定18, 20, 24和30 kHz, 为了得到更合理的分析结果, 频率高低顺序采取随机组合. 已有文献报道, 在较低强度的超声波作用下, 不会破坏细胞的完整结构, 也不产生形态学的明显变化^[7, 8]. 通过显微镜观察表明, 对于湛江等鞭金藻, 宜采用较低功率, 如超声功率过大, 则细胞形态容易发生改变, 因此采用2, 3, 4和6 W. 本研究实验组在球等鞭金藻实验^[5]中, 超声时间采用60 s, 在三角褐指藻的实验^[6]中, 采用15~90 s, 均取得较好的实验结果. 秦松等^[9]在制备螺旋藻原生质体中, 用频率为20 kHz, 功率为15 W的超声波对螺旋藻处理30 s之后, 即观察到藻丝体的断裂, 可见处理时间不宜过长, 因此选定30 s 1次、40 s 1次、15 s 2次、10 s 3次(间隔时间均为10 s). 实验结果采用方差分析, 经过一系列数学推导, 得到各个因素的差方和公式, 从而判断各个因素影响的显著程度^[10]. 最佳超声条件就是最大实验结果平均值所对应的因素水平.

2.3 微藻脂肪酸甲酯的制备和气相色谱分析

平行移取3份指数生长期的藻液(细胞密度为 1.2×10^5 个/cm³)各50 cm³, 按正交设计进行超声实验, 2 h后过滤藻液样品. 将过滤的藻体从滤膜上刮下, 冷冻干燥48 h后移入带螺帽的水解管中, 加入4 cm³ CHCl₃-CH₃OH萃取液(体积比为2:1), 充氮气1 min后密封, 在超声清洗器(250 W, 33 kHz)中两次超声萃取, 每次15 min. 萃取后样品用氮气吹干, 加入2 mol/dm³ HCl-CH₃OH溶液, 充氮气后密闭, 于100 ℃水浴中反应40 min, 冷却后用2 cm³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 mm³, 密封后放入冰箱冷冻保存. 测定时取出样品, 加入适量的正己烷(10~20 mm³), 倾斜并缓慢转动离心管, 使管壁上的样品充分溶解混匀后, 用于气相色谱分析.

气相色谱仪为SP-3402型(北京分析仪器厂), 色谱柱为弹性石英毛细管柱(SE-54, 30 m × 0.22 mm, Australia International Sales). 程序升温分4个阶段进行, 第1段柱温为50~120 ℃, 升温速率为20 ℃/min, 并在120 ℃恒温1 min; 第2段柱温为120~180 ℃, 升温速率为6 ℃/min, 并在180 ℃恒温1 min; 第3段柱温为180~210 ℃, 升温速率为6 ℃/min, 并在210 ℃恒温10 min; 第4段柱温为210~280 ℃, 升温速率为3 ℃/min, 并在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, 氮气流量为30 cm³/min, 氢气流量为30 cm³/min, 空气流量为300 cm³/min, 分流比为1:18, 进样量为1 mm³. 本实验以C19 0为内标, 采用美国SIGMA公司脂肪酸标准试剂. 定性、定量分析按文献[11]方法进行. 取3份平行样品的测定数据计算平均值. 本流程经多次重复验证, 测定结果稳定, 脂肪酸回收率为95.1%~103.7%, 检测限为0.007 2 μg, 相对偏差为0.53%~5.49%.

3 结果和讨论

3.1 超声波对湛江等鞭金藻生长的影响

不同超声条件对湛江等鞭金藻生长影响的测定结果见表1。由此看出,经超声后湛江等鞭金藻生长速率明显加快,16个正交实验号样品生长速率常数均有提高。其中提高较大的是5,6,7,10号样品,生长速率常数达0.592,0.592,0.630,0.611 d,分别为无超声的湛江等鞭金藻对照组生长速率常数(0.312 d)的1.90,1.90,2.02,1.96倍,提高较小的是2和16号样品,其生长速率常数均为0.334 d,仅为对照组生长速率常数的1.07倍。

表1 湛江等鞭金藻正交实验生长速率常数的测定结果*

样品号	频率/kHz	时间/s	功率/W	生长速率常数 k/d
1	24	30	2	0.374
2	24	15(2次)	3	0.334
3	24	10(3次)	4	0.434
4	24	40	6	0.414
5	20	30	3	0.592
6	20	15(2次)	2	0.592
7	20	10(3次)	6	0.630
8	20	40	4	0.474
9	18	30	4	0.414
10	18	15(2次)	6	0.611
11	18	10(3次)	2	0.572
12	18	40	3	0.434
13	30	30	6	0.514
14	30	15(2次)	4	0.394
15	30	10(3次)	3	0.454
16	30	40	2	0.334
对照组				0.312

* 生长速率常数 $k = (\ln N - \ln N_0) / (t - t_0)$, 式中 N 为超声后的细胞密度, N_0 为超声前的细胞密度, t 为实验终了时间, t_0 为开始时间。

方差分析结果表明,频率的改变对湛江等鞭金藻生长的影响尤其显著,而功率和时间也有一定的影响,但不如频率的影响显著。综合正交实验结果,在本实验设计的因素水平范围内,提高湛江等鞭金藻生长速率常数的最佳超声条件是频率为20 kHz,功率为6 W,时间为10 s 3次(表2)。

表2 超声频率、功率和时间对湛江等鞭金藻生长速率常数(k)的影响

频率/kHz	k 平均/d	功率/W	k 平均/d	时间/s	k 平均/d
18	0.508	2	0.468	30	0.474
20	0.572	3	0.454	15(2次)	0.483
24	0.389	4	0.429	10(3次)	0.522
30	0.424	6	0.542	40	0.414

3.2 超声波对湛江等鞭金藻脂肪酸组成的影响

气相色谱测定结果表明, 在湛江等鞭金藻脂肪酸中, 以 C14: 0, C16: 0, C18: 4, C18: 3 和 C18: 1 为主, 同时也有一定含量的 C22: 6, 与 Zhukova 和 Aizdaicher^[12] 的研究相似, 但是 C16: 1 较低, 且未能检测到 C20: 5, 这可能与藻种代谢作用的差别有关. 未经超声处理的对照组和正交实验的 16 组样品的脂肪酸组成如表 3 所示, 各样品号的因素水平与表 1 相同.

3.2.1 对脂肪酸不饱和度的影响

经测定湛江等鞭金藻对照组不饱和度为 71.8%. 由表 3 的数据可知, 在正交实验 16 个实验样品中, 超声后湛江等鞭金藻脂肪酸的不饱和度均有不同程度的提高, 7 和 8 号样品脂肪酸不饱和度提高显著, 脂肪酸不饱和度分别为 79.0% 和 79.6%, 与对照组相比较, 分别提高了 7.2% 和 7.8%.

3.2.2 对 C18: 4 的影响

对照组 C18: 4 占总脂肪酸 20.8%. 经过超声后大多数样品 C18: 4 占总脂肪酸中的百分含量得到不同程度的提高, 尤其以 3 和 7 号样提高幅度显著, 其 C18: 4 占总脂肪酸的百分含量达 26.8%, 26.0%, 比对照组分别提高了 6.0% 和 5.2%.

3.2.3 对 C18: 3 的影响

对照组 C18: 3 占总脂肪酸 22.5%. 经过超声后大多数样品 C18: 3 占总脂肪酸中的百分含量得到不同程度的提高, 以 5, 9 和 4 号样提高幅度显著, C18: 3 占总脂肪酸的百分含量分别达 26.7%, 25.3% 和 25.2%, 分别比对照组提高了 4.2%, 2.8% 和 2.7%.

表 3 超声波对湛江等鞭金藻脂肪酸组成的影响(%, TFA)

样品号	对照组	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
C14: 0	12.5	12.1	10.9	11.3	11.0	12.1	11.9	9.63	11.6	11.5	11.2	14.0	11.9	11.6	10.7	9.97	10.5
C15: 0	0.374	0.428	0.468	0.383	0.421	0.420	0.428	0.370	0.423	0.411	0.384	0.526	0.438	0.401	0.340	0.367	0.346
C16: 4	1.51	1.54	1.53	1.47	1.53	1.49	1.696	1.33	1.55	1.50	1.45	2.06	1.55	1.48	1.49	1.42	1.52
C16: 3	0.390	0.367	0.227	0.333	0.350	0.390	0.398	0.309	0.351	0.336	0.371	0.446	0.385	0.366	0.384	0.370	0.350
C16: 2	0.329	0.266	0.820	0.677	0.549	0.448	0.611	0.551	0.120	0.458	0.636	0.604	0.288	0.331	0.322	0.474	0.439
C16: 1	3.24	3.79	3.56	3.56	3.36	3.49	3.73	2.75	3.03	3.39	2.90	2.79	3.41	3.10	3.16	2.65	3.22
C16: 0	13.0	10.7	7.67	8.45	11.0	8.38	9.29	9.21	8.06	8.55	9.45	9.16	9.15	9.56	11.8	13.2	12.0
C17: 0	0.265	0.371	0.721	0.555	0.396	0.333	0.355	0.361	0.566	0.332	0.479	0.541	0.364	0.372	0.526	0.506	0.494
C18: 4	20.8	20.4	25.2	26.8	21.7	23.8	21.5	26.0	24.6	23.6	23.1	23.5	23.5	23.3	20.6	23.3	21.2
C18: 2	5.02	4.58	3.40	3.21	5.22	3.70	4.10	4.87	3.53	3.64	4.66	4.10	3.55	4.35	5.37	4.15	4.15
C18: 3	22.5	24.9	22.8	22.8	25.2	26.7	24.8	23.3	23.6	25.3	22.7	21.4	23.8	22.8	23.3	21.4	24.4
C18: 1	11.2	13.3	14.1	12.6	12.0	11.9	14.9	13.4	15.4	14.1	14.1	12.7	14.2	14.0	14.0	12.1	12.9
C18: 0	3.18	1.62	1.97	0.433	1.97	0.390	0.740	0.452	0.408	0.457	1.39	1.78	0.896	1.27	2.54	3.48	2.63
C20: 1	0.778	0.394	0.802	0.704	0.126	0.486	0.430	0.470	0.415	0.353	0.382	0.837	0.450	0.628	0.491	0.374	0.628
C22: 6	4.97	5.29	5.72	6.71	5.25	5.83	5.19	7.06	6.74	6.05	6.88	5.59	6.10	6.42	4.98	5.60	5.29
不饱和度*	71.8	74.8	78.2	78.9	75.3	78.3	77.3	79.0	79.6	78.8	77.1	74.0	77.3	76.7	74.0	72.4	74.0

* 不饱和度等于 $TUFA/TFA \times 100\%$, 式中 $TUFA$ 为总不饱和脂肪酸, TFA 为总脂肪酸.

3.2.4 对 C18: 1 的影响

对照组 C18: 1 占总脂肪酸 11.2%。经过超声后大多数样品 C18: 1 占总脂肪酸中的百分含量得到不同程度的提高, 以 8 和 6 号样提高幅度尤其高, C18: 1 占总脂肪酸的百分含量分别达 15.4% 和 14.9%, 分别比对照组提高了 4.2% 和 3.7%。

3.2.5 对 C22: 6 的影响

对照组 C22: 6 占总脂肪酸 4.97%。经过超声后大多数样品 C22: 6 占总脂肪酸中的百分含量得到不同程度的提高, 以 7, 10 和 8 号样提高幅度尤其明显, C22: 6 占总脂肪酸的百分含量分别达 7.06%, 6.88% 和 6.74%, 分别比对照组提高了 2.09%, 1.91% 和 1.77%。

表 4 超声频率和功率对湛江等鞭金藻脂肪酸组成影响

因素 水平	同一因素水平实验结果平均值(%, TFA)							
	不饱和度	C18 4	C18 3	C18 1	C22 6	C16 0	C14 0	
频率/kHz	18	76.8	23.4	23.3	13.8	6.16	9.08	12.2
	20	78.6	24.0	24.6	13.9	6.20	8.74	11.3
	24	76.8	23.5	23.9	13.0	5.74	9.41	11.3
	30	74.3	22.1	23.0	13.2	5.57	11.6	10.7
功率/W	2	75.0	21.7	23.9	13.4	5.35	9.53	12.1
	3	75.6	24.0	23.7	13.1	5.82	9.60	11.2
	4	77.8	23.9	23.8	14.0	6.12	9.22	11.3
	6	77.0	23.5	23.2	13.4	6.40	9.80	10.8
对照组		71.8	20.8	22.5	11.2	4.97	13.0	12.5

经方差分析表明, 超声频率对湛江等鞭金藻脂肪酸组成的影响尤其显著, 超声功率有一定影响, 而时间的影响极小。因此, 以下讨论以超声频率和功率为主。如表 4 所示, 无论是脂肪酸不饱和度或者是脂肪酸含量, 当频率为 20 kHz 时, 超声作用最显著, 此时, 湛江等鞭金藻脂肪酸不饱和度和主要不饱和脂肪酸 (C18: 4, C18: 3, C18: 1 和 C22: 6) 含量最高, 而饱和脂肪酸 (C16: 0 和 C14: 0) 含量下降也十分显著。超声功率的效应不如频率显著, 当功率为 4 W 时, 脂肪酸不饱和度有最大值, 而对于主要不饱和脂肪酸的百分含量, 功率从 2~6 W 均有提高的效果。超声以 30 s 最佳。

为了进一步证实功率因素的效应, 以频率为 20 kHz, 时间为 30 s, 按 2, 4, 6, 8, 10, 12 W 5 个功率水平进行超声实验, 另取一份作为对照组。结果如表 5 所示, 对照组脂肪酸不饱和度为 71.9%。当超声功率为 2, 4, 6 W 时, 其脂肪酸不饱和度均有较大的提高, 不饱和度分别为 77.4%, 77.5%, 78.2%, 比对照组分别提高 5.5%, 5.6%, 6.3%, 功率为 6 W 时有最大值。而超声功率为 8, 12 W 时, 虽然不饱和度比对照组高, 但是提高幅度较小, 而功率为 10 W 时, 其不饱和度几乎未发生变化。由此, 本正交实验所拟定的功率因素水平的范围是合理的。综合正交实验结果, 对于提高湛江等鞭金藻脂肪酸不饱和度和主要不饱和脂肪酸的百分含量, 在本实验设计的因素水平范围内, 最佳超声条件是频率为 20 kHz, 功率为 4~6 W, 时间为 30 s。

表5 不同功率水平湛江等鞭金藻的脂肪酸组成的效应(%, TFA)

功率/W	2	4	6	8	10	12	对照组
C14 0	11.2	12.1	11.4	11.9	11.9	12.7	13.6
C15 0	0.396	0.426	0.543	0.436	0.500	0.504	0.579
C16 4	2.67	1.62	2.01	2.01	2.02	2.07	2.13
C16 3	0.407	0.420	0.488	0.410	0.439	0.515	0.621
C16 2	0.868	0.771	0.672	0.609	0.813	0.039	0.910
C16 1	3.95	3.54	4.09	4.36	4.04	4.16	4.40
C16 0	8.71	9.42	8.18	12.7	12.6	10.4	12.0
C17 0	0.270	0.161	0.337	0.492	0.547	0.279	0.276
C18 4	22.3	21.2	21.8	21.2	19.0	21.7	21.7
C18 2	4.32	4.27	4.09	3.59	4.71	4.15	4.47
C18 3	23.3	23.0	21.5	19.4	21.6	20.9	19.2
C18 1	13.1	16.1	16.2	15.4	12.6	14.9	12.9
C18 0	1.06	0.392	1.35	1.08	2.35	1.33	1.78
C20 1	0.465	0.188	0.422	0.425	0.591	0.436	0.541
C22 6	6.01	6.38	6.94	5.91	6.02	5.97	5.01
不饱和度	77.4	77.5	78.2	73.3	71.8	74.8	71.9

以上实验结果表明,在适宜超声条件下,超声波能产生积极的生物学效应。在本实验设计的因素水平范围内,提高湛江等鞭金藻生长速率常数、脂肪酸不饱和度和主要不饱和脂肪酸百分比的最佳超声频率均为 20 kHz,宜采用较低的超声功率(4~6 W),辐射时间应控制在 30 s 以内,或一次辐射,或多次间歇辐射(10 s 3 次)。短时间低能量的超声产生的机械振动能刺激物质经细胞半透膜的弥散,加速营养成分的传输,从而增强新陈代谢作用,有利于微藻的生长^[7,13]。同时由于多次超声之间有短期间隙,因此不会产生激烈的空化效应,避免了对细胞造成局部的损伤。有关超声可增强酶活性、促进酶催化反应的研究已有不少报道^[13]。海洋微藻中不饱和脂肪酸的存在,脂肪酸脱饱和酶起着关键作用,它催化在脂肪酸碳链上形成双键^[14]。经超声后海洋微藻脂肪酸不饱和度提高,可能是超声导致微藻脂肪酸脱饱和酶活性提高的结果。有关超声波对海洋藻类的作用机理,有待进一步探讨。

4 结语

在适宜超声频率条件下,采用低功率、短时间超声处理,可以促进湛江等鞭金藻生长,提高其脂肪酸不饱和度和主要不饱和脂肪酸百分比。方差分析表明,超声频率对湛江等鞭金藻的生物学效应尤其显著,而超声功率和处理时间的影响相对较小。综合正交实验结果,在本实验设计的因素水平范围内,对于提高湛江等鞭金藻生长速率常数,最佳超声条件为 20 kHz, 6 W, 10 s 3 次;对于提高湛江等鞭金藻脂肪酸不饱和度和主要不饱和脂肪酸百分比,最佳超声条件为 20 kHz, 4~6 W, 30 s。

参考文献:

- [1] 冯若,李化茂.声化学及其应用[M].合肥:安徽科学技术出版社,1992.1-26.

- [2] NYBORG W L. Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines, Part I. Personal histories [J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2000, 26(6): 911—964.
- [3] 林仲茂. 功率超声的进展[J]. *声学进展*, 1984, 3(4): 1—12.
- [4] 章之蓉, 谢瑞生, 何家林, 等. 水生生物与物理因子[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 125—135.
- [5] 李文权, 王清池, 陈清花, 等. 超声波对球等鞭金藻脂肪酸组成的效应研究[J]. *海洋科学*, 2000, 24(4): 7—9.
- [6] 王清池, 廖启斌, 陈清花, 等. 超声波对三角褐指藻脂肪酸组成的效应研究[J]. *厦门大学学报*, 2000, 39(1): 32—35.
- [7] 马玉英, 尚志远. 超声生物效应与超声治疗学[J]. *声学进展*, 1984, 3(3): 44—47.
- [8] 邱树毅, 姚汝华, 宗敬华. 超声波在生物工程中的应用[J]. *生物工程进展*, 1999, 19(3): 45—48.
- [9] 秦松, 王希华, 董顺, 等. 钝顶螺旋藻部分原生质体及单细胞的制备与培养[J]. *海洋与湖沼*, 1995, 26(1): 109—112.
- [10] 郑用熙. 分析化学中的数理统计方法[M]. 北京: 科学出版社, 1991. 180—208.
- [11] 蔡阿根, 郑爱榕, 李文权, 等. 海洋微藻中脂肪酸的气相色谱分析[J]. *海洋技术*, 1998, 17(4): 64—68.
- [12] ZHUKOVA N V, AIZDAICHER N A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(2): 351—356.
- [13] 冯若, 赵逸云, 李化茂, 等. 超声在生物技术中应用的研究进展[J]. *生物化学和生物物理进展*, 1994, 21(6): 500—503.
- [14] 张羽航, 鲍时翔, 郑学勤, 等. 脂肪酸脱饱和酶的研究进展[J]. *生物技术通报*, 1998, 4: 1—9.

Effects of ultrasonic wave on the growth and fatty acid composition of *Isochrysis zhanjiangensis*

LI Wen-quan¹, WANG Xian¹, CHEN Qing-hua¹, ZHANG Yuan-biao¹, WENG Zhen-zhou¹,

(1. Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A three-factors and four-levels orthogonal experiment, including ultrasonic frequency, power and treatment duration, is conducted to study biological effect of ultrasonic treatment on *Isochrysis zhanjiangensis*. The experimental results suggest that ultrasonic frequency has significant biological effect, and ultrasonic power and treatment duration have less influence on this alga. The optimum ultrasonic conditions are 20 kHz, 6 W, 10 s (triplicate) for increasing the constant of growth rate of this alga, and 20 kHz, 4~6 W, 30 s for increasing its unsaturation degree of total fatty acids (TFA) and the percentages of major unsaturated fatty acids. The maximum constant of growth rate of *Isochrysis zhanjiangensis* can be 0.630 d which is 2.02 times of that of the controls. The maximum unsaturation degree can be 79.6% which was 7.8% higher than that of the controls. The percentages of major unsaturated fatty acids in TFA can increase more or less under the optimum ultrasonic conditions.

Key words: ultrasonic wave; *Isochrysis zhanjiangensis*; growth; fatty acids