

三相分离法提取裂殖壶藻中油脂、蛋白质和多糖的工艺优化

魏登泉¹, 车丹丹¹, 陈必铤^{1,2}, 何勇锦^{1,2,3}, 周志华¹

(1. 福建师范大学 生命科学学院, 福州 350001; 2. 福建师范大学 工业微生物教育部工程研究中心, 福州 350001; 3. 福建省多普健水产科技有限公司, 福州 350001)

摘要:为了高值化综合开发裂殖壶藻,以未破壁的裂殖壶藻粉为原料,优化三相分离(TPP)法联产提取裂殖壶藻中油脂、蛋白质和多糖的工艺。结果表明,采用TPP法联产提取裂殖壶藻中油脂、蛋白质和多糖的最佳条件为悬浮液中硫酸铵质量浓度5 g/15 mL,叔丁醇与悬浮液体积比3:1,液料比120:1。在上述优化的条件下,TPP法提取裂殖壶藻油脂的最佳提取温度和提取时间分别为90℃和3 h,提取蛋白质和多糖的最佳提取温度和提取时间分别为60℃和0.5 h。此外,评估不同策略下TPP法联产提取裂殖壶藻油脂、蛋白质和多糖的性能发现,先在60℃下提取0.5 h再在90℃下提取3 h,总油脂、蛋白质和多糖提取率最高,分别达97.86%、57.11%和28.15%,油脂中DHA含量可达35.30%,DPA含量可达5.53%。综上,TPP法是一种高效联产提取裂殖壶藻中油脂、蛋白质和多糖的方法。

关键词:三相分离法;裂殖壶藻;油脂;蛋白质;多糖

中图分类号:TS222;Q939.97

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2023)03-0123-07

Process optimization of three phase partitioning to extract the lipids, protein and polysaccharide from *Schizochytrium* sp.

WEI Dengxiao¹, CHE Dandan¹, CHEN Bilian^{1,2}, HE Yongjin^{1,2,3}, ZHOU Zhihua¹

(1. Collage of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350001, China; 2. Engineering Research Center of Ministry of Education of Industrial Microbiology, Fujian Normal University, Fuzhou 350001, China; 3. Fujian Duopujian Aquatic Technology Co., Ltd., Fuzhou 350001, China)

Abstract: In order to the comprehensive development of *Schizochytrium* sp. with high value, the process of the simultaneous extraction of oil, protein and polysaccharide from the unbroken *Schizochytrium* sp. by three phase partitioning (TPP) method were optimized. The results showed that the optimal conditions for the simultaneous extraction of oil, protein and polysaccharide from *Schizochytrium* sp. by TPP method were as follows: mass concentration of ammonium sulfate in suspension 5 g/15 mL, volume ratio of *t*-butanol to suspension 3:1, ratio of total volume to algal powder mass 120:1. Under the optimized conditions, the optimal extraction temperature and time of lipids from *Schizochytrium* sp. by TPP method were 90℃ and 3 h, respectively, and the optimal extraction temperature and time of protein and polysaccharide were 60℃ and 0.5 h, respectively. Moreover, the extraction performance of TPP method to simultaneously extract the lipids, protein and polysaccharide from *Schizochytrium* sp. was further evaluated by different strategies. It was found that the extraction at 60℃ for 0.5 h followed by 90℃ for 3 h

收稿日期:2022-05-11;修回日期:2022-12-04

基金项目:福建省科技厅引导性项目(2020N008)

作者简介:魏登泉(1997),男,在读硕士,研究方向为环境与应用微生物(E-mail)2287233087@qq.com。

通信作者:周志华,实验师(E-mail)zzh-bio@fjnu.edu.cn。

resulted in the highest extraction rates of 97.86%, 57.11% and 28.15% for total lipids, protein and polysaccharide, respectively, with DHA content up to 35.30% and DPA content up to 5.53% in the lipids. In conclusion, the TPP method is a

highly efficient method for simultaneously extracting lipids, protein and polysaccharide from *Schizochytrium* sp.

Key words: three phase partitioning; *Schizochytrium* sp.; lipid; protein; polysaccharide

裂殖壶藻作为一种多才多艺的细胞工厂,可合成多不饱和脂肪酸(如 DHA)、蛋白质、多糖等物质,在预防或治疗某些炎症、高脂血症、肿瘤等疾病方面具有重要的作用^[1-3]。例如:裂殖壶藻蛋白与钙离子结合后,可以促进人体肠道细胞对钙离子的吸收^[4];裂殖壶藻蛋白经过美拉德反应后具有较强的抗氧化能力和活性^[5];裂殖壶藻多糖具有较强的抗氧化能力和清除自由基能力,可作为食品和药品行业的一种补充资源^[6];裂殖壶藻 DHA 油脂已广泛应用于婴幼儿奶粉、保健品、医药等领域^[7]。因此,综合开发裂殖壶藻生物质资源是微藻领域研究的热点方向之一。

众所周知,裂殖壶藻所合成的多不饱和脂肪酸、蛋白质和多糖主要分布在细胞内。为了获得细胞内的这些物质,研究者们开发了三相分离(Three Phase Partitioning, TPP)^[8]、有机溶剂萃取^[9]、超临界流体萃取^[10]、微波或超声波辅助萃取^[11]等方法。与其他提取方法相比,TPP 法具有提取率高、提取时间短、环境友好、操作简便、易于规模化放大等优点^[12]。TPP 法已被广泛应用于油脂^[13]、蛋白质^[14]、多糖^[15]等物质的提取。由叔丁醇和硫酸铵介导的 TPP 法是基于盐析、醇沉淀、等离子沉淀、渗透静电力等理论,形成稳定的三相体系^[16],即油脂溶解在叔丁醇有机相(上层),可溶性蛋白质和多糖分布在水相(下层),不溶于叔丁醇和水的物质分布在固相(中间层),从而可有效地联产提取油脂、蛋白质和多糖。目前,已有研究报道采用 TPP 法从南瓜籽^[17]、米糠^[18]和亚麻籽^[19]中同时提取油脂、蛋白质和多糖。但关于利用 TPP 法同时提取微藻中油脂、蛋白质和多糖的报道较少。值得注意的是,裂殖壶藻细胞具有细胞壁,会阻碍 TPP 法提取胞内物质^[20]。当前,物理法(如微波法)^[21]和酶解法^[8]可有效破碎裂殖壶藻细胞壁。但物理法破碎细胞壁的效果较差,而酶解法所使用的酶在催化底物时具有选择性,导致破壁效果不理想^[7]。为了解决上述问题,本研究将以未破壁的裂殖壶藻粉为原料,研发 TPP 法联产提取油脂、蛋白质和多糖工艺,并优化叔丁醇和硫酸铵介导的 TPP 法工艺参数,以期为高值化开发裂殖壶藻生物制品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

裂殖壶藻粉(未破壁),青岛旭能生物工程有限公司;叔丁醇、硫酸铵等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

SHA-B 双功能水浴摇床,江苏中和实验仪器制造有限公司;RE-52A 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHZ-D III 循环水真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;SCION-436 气相色谱仪,天美仪拓实验室设备(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 TPP 法联产提取裂殖壶藻中油脂、蛋白质和多糖

在锥形瓶中加入裂殖壶藻藻粉(0.5 g)、硫酸铵、水配制成悬浮液,然后加入叔丁醇配制成三相体系,在一定温度下提取一定时间后,取上层的有机相进行旋蒸以除去叔丁醇和少量的水,获得粗油脂,取下层的水相通过透析膜分离纯化水相中的可溶性蛋白质,通过醇沉淀法分离纯化水相中的多糖。

1.2.2 裂殖壶藻粉的组分分析

采用氯仿-甲醇法^[22]测定油脂含量;采用 BCA 法^[23]测定蛋白质含量;采用硫酸-苯酚法^[15]测定多糖含量。

1.2.3 油脂、蛋白质和多糖提取率计算

按照公式(1)计算油脂提取率(Y_1)。

$$Y_1 = m_2/m_1 \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_1 为原料中油脂质量; m_2 为产品粗油脂质量。

按照公式(2)计算蛋白质提取率(Y_2)。

$$Y_2 = x_2/x_1 \times 100\% \quad (2)$$

式中: x_1 为原料中蛋白质质量; x_2 为三相体系的下层水相中蛋白质质量。

按照公式(3)计算多糖提取率(Y_3)。

$$Y_3 = x_4/x_3 \times 100\% \quad (3)$$

式中: x_3 为原料中多糖质量; x_4 为三相体系的下层水相中多糖质量。

1.2.4 裂殖壶藻油脂脂肪酸组成分析

提取的裂殖壶藻油经甲酯化后通过气相色谱仪测定脂肪酸组成。气相色谱条件^[24]:色谱柱(30

m × 0.25 mm × 0.25 μm);载气为高纯氮气;升温程序为 100 °C 保持 1 min, 然后以 40 °C/min 升温至 210 °C, 接着以 20 °C/min 升温至 250 °C, 保持 10 min; 检测器温度 260 °C; 注射口温度 250 °C; 分流比 1:40; 进样量 1 μL。

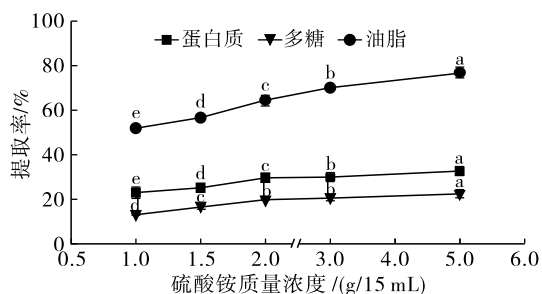
1.2.5 数据处理

所有实验均重复 3 次, 采用 Excel 处理数据, 结果以“平均值 ± 标准差”表示, 采用 Origin 8.1 绘制图表, 通过 SPSS 软件进行差异显著性分析, $p < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 裂殖壶藻粉的组分及裂殖壶藻油的脂肪酸组成

经测定, 裂殖壶藻粉的油脂、多糖和蛋白质含量



注: 同一指标不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。下同

图 1 硫酸铵质量浓度对 TPP 法提取性能的影响

由图 1 可知, 随着硫酸铵质量浓度的增加, 油脂的提取率呈上升趋势, 当硫酸铵质量浓度为 5 g/15 mL 时, 油脂提取率最高, 为 76.95%, 这与 Vidhate 等^[25]的研究结果一致。据报道, 微藻细胞中的甘油三酯主要储存在脂滴中, 脂滴结构含有 45% 的油脂和 25% 的蛋白质^[26-27]。在三相体系中, 提高硫酸铵质量浓度, 可有效地与脂滴中的蛋白质结合并使其沉淀, 从而将甘油三酯释放出来^[28]。本研究发现, 硫酸铵质量浓度的增加可促进 TPP 法提取裂殖壶藻中的蛋白质和多糖, 这可能是高质量浓度的硫酸铵会皱缩并弱化微藻细胞壁, 使得蛋白质和多糖更容易被提取出来^[3,20]。

由图 1 还可知: 改变硫酸铵质量浓度会显著影响所提取油脂的脂肪酸组成; 随着硫酸铵质量浓度的增加, 裂殖壶藻油中的 C16:0 含量呈下降趋势, 而 DPA 和 DHA 含量显著增加。这可能是因为提高硫酸铵的质量浓度使三相体系中的硫酸根离子和铵根离子增加, 影响不同脂肪酸组成的油脂类型(中性脂和极性脂)的溶解度, 最终导致有机相中脂肪酸组成的差异^[29]。

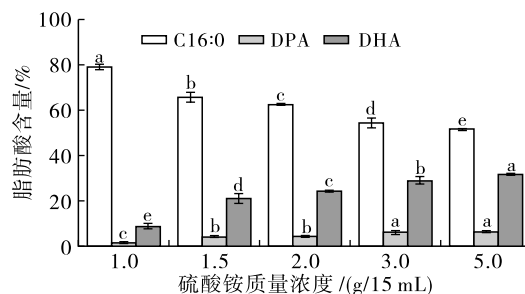
综上, 选择硫酸铵质量浓度为 5 g/15 mL。

分别为 449.60、62.50、266.32 mg/g, 此外, 棕榈酸 (C16:0)、DPA 和 DHA 是裂殖壶藻油的主要脂肪酸。

2.2 TPP 法提取条件优化

2.2.1 硫酸铵质量浓度的影响

研究表明, 适合的盐浓度可以改变藻细胞内外渗透压, 提高细胞壁和细胞膜的通透性, 使油脂更容易溶于有机溶剂中, 进而提高 TPP 法的油脂提取率^[8,21]。在叔丁醇与悬浮液体积比 2:1、液料比 90:1 (三相体系体积与藻粉质量比)、提取温度 70 °C 和提取时间 3 h 的条件下, 研究悬浮液中硫酸铵质量浓度对 TPP 法提取裂殖壶藻胞内活性物质的影响, 结果如图 1 所示。



2.2.2 叔丁醇与悬浮液体积比的影响

在三相体系中, 较少的叔丁醇不能与硫酸铵产生协同效应从而导致油脂提取率较低, 而适量的叔丁醇有利于细胞膜和脂滴中的蛋白质沉淀, 从而促使油脂溶于有机溶剂^[3,8]。因此, 叔丁醇起到了将蛋白质与油脂分离及溶解油脂的重要作用。在悬浮液中硫酸铵质量浓度 5 g/15 mL、液料比 90:1、提取温度 70 °C 和提取时间 3 h 的条件下, 研究叔丁醇与悬浮液体积比对 TPP 法提取裂殖壶藻胞内活性物质的影响, 结果如图 2 所示。

由图 2 可知: 当叔丁醇与悬浮液体积比从 0.5:1 增加至 3:1 时, 油脂提取率从 47.82% 提高至 81.93%, 油脂中 DPA 和 DHA 含量分别从 1.80% 和 7.26% 提高至 4.77% 和 26.53%, 这是因为增加叔丁醇用量, 可提高裂殖壶藻油的溶解度, 从而提高油脂的提取率^[30]; 继续提高叔丁醇用量, 裂殖壶藻油的提取率和脂肪酸组成均无显著变化。Qiu 等^[30]研究发现, 酶辅助的叔丁醇-硫酸铵 TPP 法提取微拟球藻油脂的最佳叔丁醇与悬浮液体积比为 2:1, 油脂提取率最高可达 64.82%。与其研究结果相比, 本研究采用的 TPP 法直接提取裂殖壶藻油的油脂提取率

更高。这可能是因为 TPP 法的提油性能很大程度

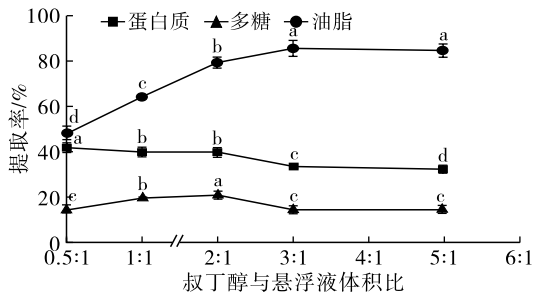
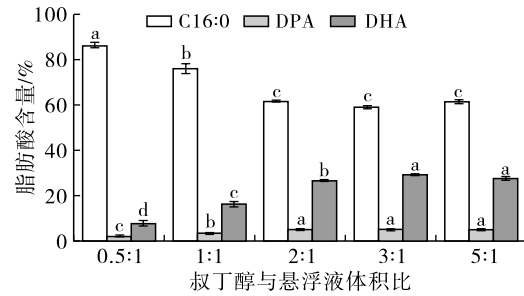


图2 叔丁醇与悬浮液体积比对 TPP 法提取性能的影响

由图 2 还可知,当叔丁醇与悬浮液体积比从 0.5:1 提升至 5:1 时,蛋白质提取率从 41.83% 下降至 33.48%。这可能是因为叔丁醇用量增加会导致叔丁醇从水相吸收更多的水分,从而使水相中的硫酸铵浓度增高致使蛋白质聚集沉淀,并且过多的叔丁醇也会促进蛋白质沉淀^[14]。多糖提取率在叔丁醇与悬浮液体积比为 2:1 时达到最大值,为 20.77%。研究表明,过多或过少的叔丁醇均会使部

上取决于藻种、含油量和不同油脂类型组成。



分多糖沉淀,导致多糖分布于中间层,进而影响多糖的提取率^[31]。

综上,选择叔丁醇与悬浮液体积比为 3:1。

2.2.3 液料比的影响

在悬浮液中硫酸铵质量浓度 5 g/15 mL、叔丁醇与悬浮液体积比 3:1、提取温度 70 °C 和提取时间 3 h 的条件下,研究液料比对 TPP 法提取裂殖壶藻胞内活性物质的影响,结果如图 3 所示。

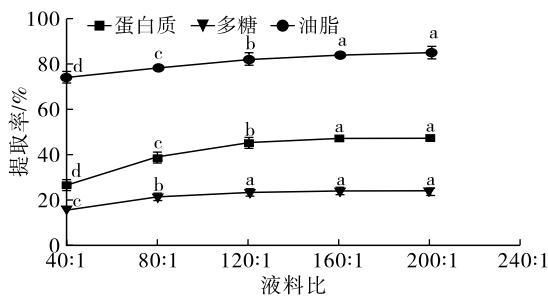
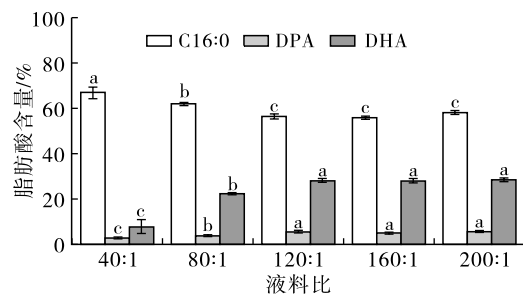


图3 液料比对 TPP 法提取性能的影响

由图 3 可知:当液料比从 40:1 增加至 160:1 时,油脂提取率从 74.26% 提高到 84.00%,液料比继续增加,油脂提取率无显著变化;当液料比从 40:1 增加至 120:1 时,油脂中 DPA 含量从 2.87% 增加至 5.43%,DHA 含量从 8.00% 增加至 28.12%,液料比继续增加,油脂中的脂肪酸组成无显著变化;当液料比从 40:1 提高至 160:1 时,蛋白质提取率从 26.68% 提升至 47.31%,继续增加液料比,蛋白质提取率无显著变化;当液料比从 40:1 提高到 120:1 时,多糖提取率从 16.03% 提升至 23.59%,继续增加液料比,多糖提取率无显著变化。Han 等^[32]采用 TPP 法同时提取鲟鱼肝脏中的蛋白质和油脂,结果发现,适度增加液料比可以有效地提高蛋白质和油脂的提取率,而过量的液料比对蛋白质和油脂提取率的提高不显著。液料比过低无法充分地溶解藻内活性物质,而过多的液料比会导致成本增加。



综上,选择液料比为 120:1。

2.2.4 提取温度的影响

有研究指出,提高 TPP 法的提取温度可以增大分子扩散系数,提高传质效率,从而有利于提高提油性能^[7]。在悬浮液中硫酸铵质量浓度 5 g/15 mL、叔丁醇与悬浮液体积比 3:1、液料比 120:1 和提取时间 3 h 的条件下,研究提取温度对 TPP 法提取裂殖壶藻胞内活性物质的影响,结果如图 4 所示。

由图 4 可知,当提取温度从 50 °C 提升至 90 °C 时,油脂提取率从 63.10% 提高至 86.96%,油脂中 DPA 含量从 3.81% 升高至 5.73%,DHA 含量从 21.67% 提升至 35.05%。由这些结果可推测出高温环境更有利于细胞壁的破碎和油脂的释放。此外,升高提取温度可能会改变水-醇-极性脂和甘油酯的相行为,影响叔丁醇对含不同脂肪酸的中性脂和极性脂的溶解度,从而导致有机相中脂肪酸组成的变化^[29]。

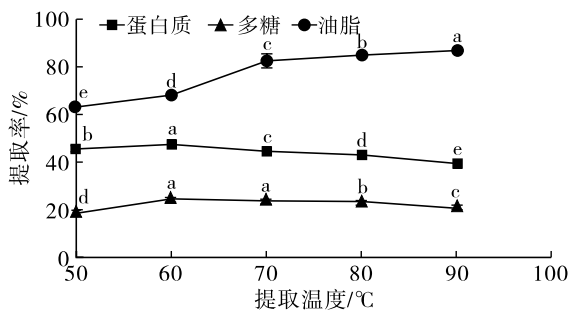
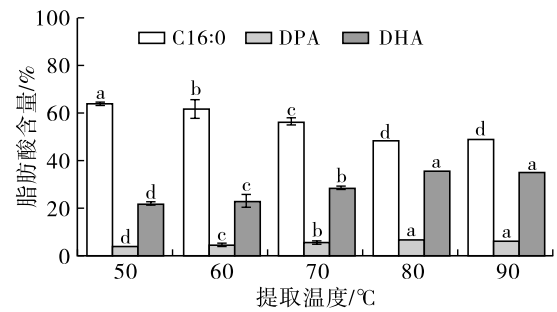


图4 提取温度对 TPP 法提取性能的影响

由图4还可知:当提取温度从50℃提高至60℃时,蛋白质提取率从45.88%提升至47.68%,多糖提取率从18.40%提升至24.39%;当提取温度继续提高至90℃时,蛋白质和多糖的提取率分别下降至38.49%和21.01%。这是因为适当地提高提取温度有利于细胞壁破碎,促进蛋白质和多糖的溶解,而高温会使蛋白质和多糖变性并沉淀于中间层^[15,31]。目前研究者采用TPP法提取蛋白质和多糖的最适温度范围一般为30~37℃^[14,17,33]。本研究提取蛋白质和多糖所需温度较高,可能是因为微



藻未进行破壁处理,需要适当地提高温度来破碎细胞壁。

综上,选择藻内油脂的提取温度为90℃,藻内蛋白质和多糖的提取温度为60℃。

2.2.5 提取时间的影响

在悬浮液中硫酸铵质量浓度5 g/15 mL、叔丁醇与悬浮液体积比3:1、液料比120:1的条件下,研究提取时间对TPP法在90℃提取裂殖壶藻油和60℃提取裂殖壶藻蛋白质与多糖性能的影响,结果如图5所示。

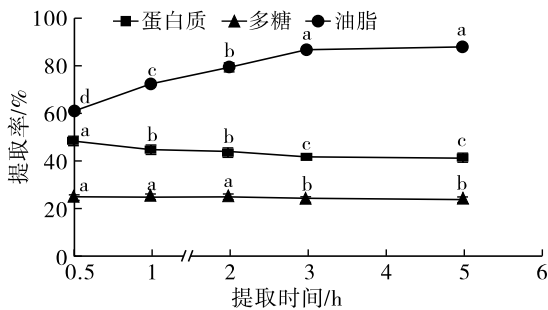
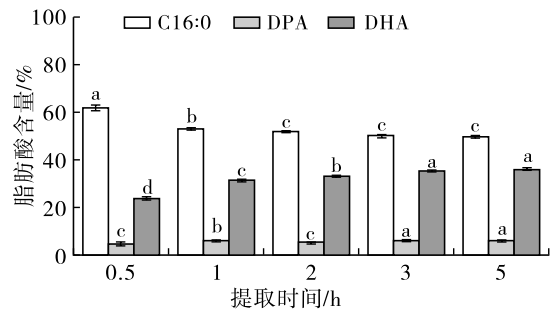


图5 提取时间对 TPP 法提取性能的影响

由图5可知:当提取时间从0.5 h延长至3 h时,油脂提取率从60.98%提高至86.96%,油脂中DPA和DHA含量在提取3 h时分别为5.96%和35.10%;继续延长提取时间,油脂提取率以及油脂的脂肪酸组成均无显著变化。

由图5还可知,蛋白质和多糖的提取率随着提取时间的延长呈下降趋势,提取时间从0.5 h延长至5 h时,蛋白质和多糖提取率分别从48.24%和25.14%下降至41.41%和23.28%。这可能是因为蛋白质和多糖的提取温度较高,在长时间高温的反应条件下会使蛋白质和多糖变性沉淀至中间层^[31]。

综上,选择藻内油脂的提取时间为3 h,藻内蛋白质和多糖的提取时间为0.5 h。



2.3 不同提取策略对 TPP 法提取性能的影响

基于图4和图5的结果可知,提取温度和提取时间很大程度上会影响TPP法联产提取裂殖壶藻中油脂、蛋白质和多糖的性能。TPP法提取裂殖壶藻油脂的最佳提取温度和提取时间分别为90℃、3 h,提取蛋白质和多糖的最佳提取温度和提取时间分别为60℃、0.5 h。为了最大化联产提取裂殖壶藻中的这3种物质,在上述优化的条件下,拟研究4种提取策略(策略A为第一步在60℃、0.5 h条件下提取一次,第二步在90℃、3 h条件下提取一次;策略B为第一步在90℃、3 h条件下提取一次,第二步在60℃、0.5 h条件下提取一次;策略C为在90℃、3 h条件下提取两次;策略D为在60℃、0.5 h条件下提取两次)对联产提取裂殖壶藻中油脂、蛋白质和多糖的影响,结果见表1。

表 1 不同提取策略对 TPP 法提取性能的影响

项目	策略 A	策略 B	策略 C	策略 D
第一步				
油脂提取率	58.96 ± 0.44	86.72 ± 2.39	86.72 ± 2.39	58.96 ± 0.44
蛋白质提取率	47.24 ± 1.82	30.69 ± 1.62	30.69 ± 1.62	47.24 ± 1.82
多糖提取率	25.39 ± 0.02	19.14 ± 1.12	19.14 ± 1.12	25.39 ± 0.02
第二步				
油脂提取率	38.90 ± 1.63	8.30 ± 0.91	10.49 ± 1.91	18.59 ± 1.25
蛋白质提取率	9.87 ± 2.09	6.29 ± 0.70	8.92 ± 1.75	10.28 ± 1.02
多糖提取率	2.76 ± 0.46	2.06 ± 0.19	0.91 ± 0.09	1.90 ± 0.44
总计				
油脂提取率	97.86 ± 2.07	95.02 ± 3.30	97.21 ± 4.30	77.55 ± 1.69
蛋白质提取率	57.11 ± 3.91	36.98 ± 2.32	39.61 ± 3.37	57.52 ± 0.46
多糖提取率	28.15 ± 0.93	21.20 ± 1.31	20.05 ± 1.21	27.29 ± 0.62
油脂中 DHA 含量	35.30 ± 0.48	35.76 ± 0.57	36.67 ± 0.91	12.55 ± 2.66
油脂中 DPA 含量	5.53 ± 0.02	6.01 ± 0.22	5.84 ± 0.35	2.57 ± 0.43

由表 1 可知,利用策略 A 提取未破壁裂殖壶藻的总油脂提取率可达 97.86%,油脂中 DHA 和 DPA 的含量分别为 35.30% 和 5.53%,这一结果与策略 C 的接近,说明提高 TPP 法的提取温度有利于提取裂殖壶藻胞内油脂。在较低的提取温度下提取两次(策略 D),TPP 法的总油脂提取率最低(77.55%),但此策略的总蛋白质和总多糖提取率高于 90℃ 提取两次的(策略 C)。这些结果进一步说明,TPP 法提取裂殖壶藻中油脂、蛋白质和多糖的最适温度是不同的。值得注意的是,与策略 A 相比,策略 B 的总蛋白质和总多糖提取率都较低,这可能是在提取过程中,策略 B 先在 90℃ 下提取会导致蛋白质和多糖变性沉淀至中间层,从而使蛋白质和多糖的提取率降低^[31]。因此,选择策略 A 为裂殖壶藻联产提取油脂、蛋白质和多糖的合适策略。

3 结论

本文建立了一种由硫酸铵和叔丁醇介导的 TPP 法,用于联产提取未破壁裂殖壶藻中油脂、蛋白质和多糖。在所优化的提取工艺条件(悬浮液中硫酸铵质量浓度 5 g/15 mL、叔丁醇与悬浮液体积比 3:1、液料比 120:1)下,将提取体系先置于 60℃ 下提取 0.5 h,再置于 90℃ 下提取 3 h,得到油脂、蛋白质和多糖的提取率最高,分别为 97.86%、57.11% 和 28.15%,油脂中 DHA 和 DPA 含量分别可达 35.30% 和 5.53%。本文所研发的 TPP 法可有效地提取未破壁裂殖壶藻胞内的油脂、蛋白质和多糖,为高值化开发裂殖壶藻生物制品提供了一种可供选择的新方案。

参考文献:

[1] GUESNET P, ALESSANDRI J M. Docosahexaenoic acid

(DHA) and the developing central nervous system (CNS) – implications for dietary recommendations [J]. *Biochimie*, 2011, 93(1): 7–12.

[2] ZIVKOVIC A M, TELIS N, GERMAN J B, et al. Dietary omega-3 fatty acids aid in the modulation of inflammation and metabolic health [J]. *Calif Agric*, 2011, 65(3): 106–111.

[3] JIN J, JIN Q Z, WANG X G, et al. High sn-2 docosahexaenoic acid lipids for brain benefits, and their enzymatic syntheses: a review [J]. *Engineering*, 2020, 6(4): 424–431.

[4] 林佳萍,唐梦茹,汪少芸. 裂殖壶藻蛋白水解产物-钙纳米复合物的制备与表征 [C]//中国食品科学技术学会第十二届年会暨第八届中美食品业高层论坛文集. 辽宁大连:中国食品科学技术学会,2015:266–267.

[5] 胡晓,刘晶,高颖,等. 裂殖壶藻蛋白肽美拉德反应产物的制备及其抗氧化特性 [J]. *南方水产科学*, 2021, 17(4):58–65.

[6] 宋泽,彭雍博,宋悦凡,等. 裂殖壶菌营养成分及其多糖特征分析 [J]. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(2): 247–251.

[7] CHEN W W, JIA Z B, HUANG G R, et al. Global optimization for simultaneous extraction of oil and polysaccharides from *Schizochytrium limacinum* by enzyme-assisted three-phase partitioning [J/OL]. *J Food Process Pres*, 2020, 44(10):e14824[2022-05-11]. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14824>.

[8] LI Z B, LI Y, ZHANG X, et al. Lipid extraction from non-broken and high water content microalgae *Chlorella* spp. by three-phase partitioning [J]. *Algal Res*, 2015, 10: 218–223.

[9] GIL-CHÁVEZ G J, VILLA J A, AYALA-ZAVALA J F,

- et al. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients; an overview [J]. *Compr Rev Food Sci F*, 2013, 12 (1): 5 – 23.
- [10] 苗笑雨, 谷大海, 程志斌, 等. 超临界流体萃取技术及其在食品工业中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(5): 209 – 218.
- [11] 余汉谋, 姜兴涛, 肖海鸿, 等. 超声波辅助萃取天然植物香料研究进展[J]. *香料香精化妆品*, 2011 (1): 29 – 32.
- [12] GAUR R, SHARMA A, KHARE S K, et al. A novel process for extraction of edible oils: enzyme assisted three phase partitioning (EATPP) [J]. *Bioresour Technol*, 2007, 98 (3): 696 – 699.
- [13] HE Y, ZHANG B, GUO S, et al. Sustainable biodiesel production from the green microalgae *Nannochloropsis*: novel integrated processes from cultivation to enzyme – assisted extraction and ethanolysis of lipids [J/OL]. *Energ Convers Manage*, 2020, 209: 112618 [2022 – 05 – 11]. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.112618>.
- [14] 罗磊, 董金龙, 朱文学, 等. 金银花过氧化物酶的三相分离纯化及酶学性质[J]. *食品科学*, 2017, 38(24): 20 – 27.
- [15] LIAO N, ZHONG J, YE X, et al. Ultrasonic – assisted enzymatic extraction of polysaccharide from *Corbicula fluminea*: characterization and antioxidant activity [J]. *LWT – Food Sci Technol*, 2015, 60 (2): 1113 – 1121.
- [16] MULCHANDANI K, KAR J, SINGHAL R. Extraction of lipids from *Chlorella saccharophila* using high – pressure homogenization followed by three phase partitioning [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 176(6): 1613 – 1626.
- [17] WANG H, CHEN K, CHENG J, et al. Ultrasound – assisted three phase partitioning for simultaneous extraction of oil, protein and polysaccharide from pumpkin seeds [J/OL]. *LWT – Food Sci Technol*, 2021, 151: 112200 [2022 – 05 – 11]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112200>.
- [18] WANG H, GENG H, CHEN J, et al. Three phase partitioning for simultaneous extraction of oil, protein and polysaccharide from rice bran [J/OL]. *Innov Food Sci Emerg*, 2020, 65: 102447 [2022 – 05 – 11]. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102447>.
- [19] 姚思含, 廖敏和, 康佳欣, 等. 酶辅助三相分离法同时提取亚麻籽油、亚麻籽蛋白和亚麻籽胶工艺优化[J]. *中国油脂*, 2022, 47(3): 11 – 17.
- [20] ALAM M, WU J, XU J, et al. Enhanced isolation of lipids from microalgal biomass with high water content for biodiesel production [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2019, 291: 121834 [2022 – 05 – 11]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121834>.
- [21] ZEB L, SHAFIQ M, CHI Z, et al. Separation of microalgal docosahexaenoic acid – rich oils using a microwave – assisted three – phase partitioning system [J/OL]. *Sep Purif Technol*, 2020, 252: 117441 [2022 – 05 – 11]. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117441>.
- [22] 马建设, 韩方方, 叶海仁, 等. 裂殖壶菌油脂提取方法的研究[J]. *温州大学学报(自然科学版)*, 2009, 30 (6): 21 – 24.
- [23] 胡勇, 纪德铭, 詹骞, 等. 人血浆中纤维蛋白溶酶原纯化工艺样品蛋白含量改良 BCA 检测方法的建立及验证[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34(5): 595 – 601.
- [24] 钟晨, 何勇锦, GUO Z, 等. 两步法催化鱼油制备 MLM 型结构三酰甘油酯[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(10): 141 – 147, 154.
- [25] VIDHATE G S, SINGHAL R S. Extraction of cocoa butter alternative from *kokum (Garcinia indica)* kernel by three phase partitioning [J]. *J Food Eng*, 2013, 117 (4): 464 – 466.
- [26] BOULARD C, BARDET M, CHARDOT T, et al. The structural organization of seed oil bodies could explain the contrasted oil extractability observed in two rapeseed genotypes [J]. *Planta*, 2015, 242(1): 53 – 68.
- [27] TZEN J, CAO Y, LAURENT P, et al. Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species [J]. *Plant Physiol*, 1993, 101(1): 267 – 276.
- [28] MONDAL A. Sonication assisted three phase partitioning for the extraction of palmitic acid and elaidic acid from *Cassia sophera* Linn. [J]. *Sep Sci Technol*, 2015, 50 (13): 1999 – 2003.
- [29] LESER M, EVERT W, AGTEROL W. Phase behaviour of lecithin – water – alcohol – triacylglycerol mixtures [J]. *Colloid Surface A*, 1996, 116(3): 293 – 308.
- [30] QIU C, HE Y, HUANG Z, et al. Lipid extraction from wet *Nannochloropsis* biomass via enzyme – assisted three phase partitioning [J]. *Bioresour Technol*, 2019, 284: 381 – 390.
- [31] TAN Z J, WANG C Y, YI Y J, et al. Three phase partitioning for simultaneous purification of aloe polysaccharide and protein using a single – step extraction [J]. *Process Biochem*, 2015, 50(3): 482 – 486.
- [32] HAN X, LIU A, LIN Y. Simultaneous separation of protein and oil from the liver of sturgeon (*Acipenser baerii*) by three – phase partitioning [J/OL]. *J Food Process Pres*, 2022, 46(2): 16259 [2022 – 05 – 11]. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16259>.
- [33] 王春, 杨红玲, 闫景坤. 响应面法优化三相分离法提取河蚬汁多糖的工艺研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(9): 3613 – 3620.