



## 微藻细胞破碎方法的研究

王雪青, 苗 惠, 翟 燕

(天津市食品与生物技术重点实验室, 天津商学院生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

**摘 要:** 采用反复冻融和超声波破碎法破碎 17 种微藻细胞,通过细胞破碎率和抗菌活性检测破碎效果,以选择适合不同微藻的破碎方法,利于胞内活性物质的提取.细胞破碎结果显示:经过 12 min 的超声处理,所有实验藻种的破碎率均在 90%以上,特别是扁藻、角毛藻以及球等鞭金藻和甲藻,仅处理 3 min,破碎率达到了 99%以上,更适合超声波法破碎.反复冻融法破碎藻细胞,经过 2 次冻融,10 种微藻的破碎率在 95%以上,4 种在 60%~80%,3 种小于 40%.对此三种藻(分别是扁藻,小球藻和紫球藻)的破碎应选择超声或组合法;以金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)为指示菌,采用琼脂扩散法检测细胞破碎率对抑菌活性的影响,抗菌活性表明:细胞充分破碎,有利于活性物质的释放和提取.

**关键词:** 超声破碎; 反复冻融; 微藻; 活性物质

中图分类号: TB559; R282.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2007) 01-0021-05

## Study on the Methods of Alga Cells Fragmentation

WANG Xue-qing, MIAO Hui, ZHAI Yan

(Tianjin Key Laboratory of Food and Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

**Abstract:** For efficient recovery active substance from alga,seventeen species of alga were crushed by ultrasonication and freezing and thawing,and their crushing effects was determined by the crushing efficiency and antimicrobial activity,to choose appropriate method for different alga. The results of crushing alga cells showed that fragmentation efficiency of all of tested alga cells was more than 90% after treatment 12 minute using ultrasonic method,moreover,fragmentation efficiency was more than 99% only treated 3 minute for the alga,such as *Platymonas subcordiformis*,*Chaetoceros*,*Isochrysis galbana* and *Zooxanthella microadriatica*,so the crushing method was more appropriate to these alga compared with the freezing and thawing method. Using freezing and thawing method duty cycle twice,fragmentation efficiency of ten-species alga increased over 95%, four species was between 60%~80%,three species was less than 40%,indicating that crushing method of the three alga(*Platymonas subcordiformis*,*Chlorella saccharophila*,*Porphyridium cruentum*) should choose other or combination methods. And the results of antimicrobial activity,which determined against *S. aureus* using agar diffusion method,indicated that the sufficient crushing efficiency of alga cells was propitious to releasing and distilling of active substances.

**Keywords:** ultrasonication; freezing and thawing; microalgae; bioactive substance

微藻是海洋中存在的一种单细胞藻类,目前已发现三万多种,占海洋生物物种的40%左右,由于其生长环境的特殊性和处于海洋食物链的基础,使微藻成为筛选生物活性物质的库源.越来越多的研究表明:微藻中含有多种性质特殊的生物活性物质<sup>[1-8]</sup>,从而成为各国的关注热点.这些活性物质,大多数在胞内,如何实现有效的破碎藻细胞以充分释放这些活性物质是

急需解决的一个关键性问题.

采用超过 20 000 Hz 的声波对细胞破碎称为超声波破碎,属于机械破碎的范围.许多学者采用超声波破碎植物细胞,研究破碎率与活性物质释放的关系<sup>[9,10]</sup>,表明在超声处理过程中,不仅保持酶、生物碱、维生素等物质的生物活性,而且产率也大幅度的提高.牛波等<sup>[11]</sup>在 20 °C 条件下分别采用不同频率的超声波处理

收稿日期: 2006-05-24; 修回日期: 2006-10-24

基金项目: 天津市科委应用基础重点资助项目(043804211);天津市科技攻关项目(06YFGZNC04200)

作者简介: 王雪青(1964—),女,河北张家口人,教授,博士.

盐藻,通过显微镜记数观察得到盐藻的破碎率可达87%,使 $\beta$ -胡萝卜素能够快速、高效地进入提取介质,避免目的产物的失活.反复冻融是一种非机械破碎方法,具有方便,不受外源性杂质污染的特点,也被广泛采用.本试验采用这两种方法破碎17种微藻,以寻找适合不同藻的破碎方法和条件,为筛选和有效提取胞内的抗菌活性物质奠定基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 藻种

扁藻(*Platymonas subcordiformis*);  
金藻 3011(*Isochrysis galbana* Parke 3011);  
牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*);  
茧形藻(*Entomoneis* sp. Ehrenberg);  
小球藻(*Chlorella saccharophila*);  
金藻 8701(*Isochrysis galbana* Parke 8701);  
蓝隐藻(*Chroomonas* sp.);  
三角褐指藻(*Phaeodactylum*);  
纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*);  
甲藻(*Zooxanthella microadriatica*);  
极小海链藻(*Thalassiosira minima* Gaarder);  
球等鞭金藻(*Isochrysis galbana* sp.);  
紫球藻(*Porphyridium cruentum*);  
叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.);  
针杆 (*Synedra Ehrenberg* sp.);  
衣藻(*Chlamydomonas uva-maris*);  
这些微藻藻种由青岛海洋大学提供.

### 1.2 试剂和仪器

SXJ-2型显微镜,日本松下电器公司;SB-JS-2型洁净工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;HWS 24型电热恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;XB-K-25型血球计数板,上海医科大学科宇科技开发公司;LGJ-10型冷冻离心机,北京四环科学仪器厂.

配置培养液的无机盐为市购分析纯.

### 1.3 微藻的培养

微藻是在消毒的人工海水中添加  $\text{NaNO}_3$  74.8 mg/L;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  4.4mg/L;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  11mg/L;  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  3.9 g/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  23 mg/L;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  178mg/L;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  12mg/L;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  4.35g/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10 mg/L;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  7.3 mg/L;  $\text{VB}_{12}$  0.5 mg/L;  $\text{VB}_1$  100 mg/L 的 F/2 培养基上以 10% 的接种量接种,温度  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,明/暗为 12 h:12 h,光强为 4 000 Lx 的环境中

培养,每天摇动 2~3 次,15 d 后离心收集藻体细胞, PBS 洗涤两次后,制成密度为  $10^6$  个/mL 的待处理藻液, 分别进行冻融和超声波破碎处理.

### 1.4 微藻的破碎处理及计算

(1) 超声破碎处理:取待处理藻液 20 mL,在冰浴,超声功率 400 W 条件下超声处理,以破碎前后显微镜下观察完整细胞的个数计算细胞破碎率,每个条件平行计数 4 次.

(2) 冻融破碎处理:将待处理藻液  $-20^\circ\text{C}$  温度下冷冻,  $40^\circ\text{C}$  温水浴中融解 5 min,反复 2 次,以破碎前后显微镜下观察完整细胞的个数计算细胞破碎率,每个条件平行计数 4 次.

### 1.5 抑菌实验

选用 *S. aureus* 作为指示菌,选用经不同破碎方法的样品,采用琼脂扩散法检测其抗菌活性.具体操作:灭菌滤纸片 ( $\phi 9$  mm),含有萃取物或溶剂 DMSO 添加到琼脂板上,分别为处理组或对照,  $37^\circ\text{C}$  培养 24h 后,测定其抑菌圈的大小.所有的实验均作 3 个平行.

## 2 结果

### 2.1 超声对微藻细胞破碎的影响

17 种微藻液冰浴超声处理,在不同的时间检测藻细胞的破碎率,结果见表 1.从表 1 中可以看出,实验所使用的 17 种微藻,超声处理 12 min,均能达到 90% 以上的破碎效果.同时也发现不同的藻,对超声的敏感性不同,如牟氏角毛藻、甲藻超声处理仅需 0.7 min,其破碎率就达到 95%,而对于小球藻、衣藻和杆状藻,其处理时间需要 12 min 以上才能达到 90% 以上的破碎率.表明不同藻种本身的结构特性决定了对超声的敏感性.

### 2.2 反复冻融对微藻细胞破碎的影响

表 2 为反复冻融法对细胞破碎率的影响.反复冻融使细胞破碎的原理是由于直接将藻液置于  $-20^\circ\text{C}$  的低温环境中,细胞内外环境中的绝大多数水形成冰晶,冰晶的形成产生了膨胀压,导致细胞产生机械损伤,同时未发生冻结的胞内残存液,由于在冻结过程中冰晶的析出致使溶质浓缩,电解质升高、渗透压改变、pH 改变、蛋白变性等,而溶解又会使细胞发生溶胀,最终使细胞破碎和死亡.从表 2 中可以看出: 17 种微藻经过 2 次冻融处理后,细胞的破碎率在 30%~99%.其中 10 种微藻的破碎率在 95% 以上, 4 种微藻在 60%~80%,而对于紫球藻、小球藻和扁藻,则细胞的破碎率小于 40%.

表 1 超声处理对微藻细胞破碎率的影响

Tab.1 Effects of ultrasonic on fragmentation efficiency of alga cells

%

藻种	超声处理时间/min								
	0.7	1	2	3	4	5	6	8	12
扁藻	50	85	95	99					
金藻 3011	0		15		90		95		
牟氏角毛藻	95	99							
茧形藻	80	99							
小球藻	0		10		40			70	95
金藻 8701	0		40		90	95			
蓝隐藻	0		30		85	99			
三角褐指藻	0		30		60	99			
纤细角毛藻	70		99						
甲藻	95								
极小海链藻	50		80	95					
球等鞭金藻	70		99						
紫球藻	30		50		80	99			
叉鞭金藻	40		80	99					
杆状藻	5		15		30			70	90
衣藻	5		15		30			70	90
三沙甲藻	20		60	95					

注:超声破碎条件为超声功率 400 W,冰浴,间歇破碎,周期为破碎 3 s,间歇 3 s.

表 2 反复冻融对微藻细胞破碎率的影响

Tab.2 Effects of freezing and thawing on fragmentation efficiency of alga cells

%

藻种	第一次冻融	第二次冻融	藻种	第一次冻融	第二次冻融
扁藻	5	30	甲藻	20	80
金藻 3011	40	80	极小海链藻	99	100
牟氏角毛藻	40	80	球等鞭金藻	70	99
茧形藻	50	95	紫球藻	5	40
小球藻	5	30	叉鞭金藻	70	95
金藻 8701	10	60	杆状藻	70	95
蓝隐藻	90	95	衣藻	60	99
三角褐指藻	5	95	三沙甲藻	25	95
纤细角毛藻	25	95			

注:冷冻条件为-20℃冰箱恒温冷冻,40℃恒温水浴融解.

### 2.3 破碎率对抗菌活性的影响

超声波是一种弹性机械振动波,是听觉阈以外的振动,它产生强烈振动,高速度、强烈的空化效应,搅拌作用,因此能破坏细胞的完整性,使细胞内的活性组分渗透到胞外,以提高有效成分的提出率.反复冻融是借助于冰晶在胞内外的分布不均和冰晶的成长对细胞所造成的机械伤.本实验通过对一定浓度的微藻用不同的有机溶剂分别萃取两种不同方法破碎的藻液,用琼脂双扩散法测定抗菌活性,检验发现以下 8 种藻有不同的抗金黄色葡萄球菌的作用.对其不同的破碎方

法和抗菌活性检测结果见表 3.

从表 3 可看出,提高细胞的破碎率,在不同程度上增加了藻粗提液的抗菌活性.等鞭金藻 8701 和蓝隐藻采用超声破碎,破碎率从 40% 升至 85%,抑菌圈直径分别增加了 3 mm 和 2 mm,而相应的用反复冻融法破碎效果不明显.对于三角褐指藻比较适合反复冻融法,抑菌圈直径从 8 mm 增加至 11 mm,抑菌效果提高了 18%.从活性物质的检测发现,细胞的充分破碎有利于活性物质的提取和释放.

表3 不同破碎方法和破碎率的藻粗提液对金黄色葡萄球菌抑制作用的影响

Tab.3 Effects of crude extracts from different fragment methods with different fragmentation efficiency on inhibition of *S. aureus* mm

藻种	对照	反复冻融		超声破碎率	
		一次	二次	40%	85%以上
小球藻	4.0	4.0	4.0	4.0	5.0
扁藻	9.0	9.0	9.0	9.5	12.0
三角褐指藻	8.0	8.0	11.0	10.0	10.5
牟氏角毛藻	7.0	7.0	8.0	8.0	8.5
纤细角毛藻	7.0	7.0	7.5	7.0	8.0
等鞭金藻 3011	8.0	8.0	8.5	8.0	9.0
等鞭金藻 8701	15.0	15.0	15.0	15.0	18.0
蓝隐藻	17.0	19.0	19.0	17.0	19.0

### 3 讨论

藻种的不同主要表现在色素的种类、贮藏物质

的性质、细胞壁的成分和结构,鞭毛的数目和位置,以及细胞内的结构的不同.表 4 列出了实验藻种的分类及其特性.

表4 17种微藻的分类及其细胞壁的组成成分

Tab.4 Classify of 17-species alga and their characteristics composition of cell-wall

藻种	门	纲	目	科	属	壁
扁藻	绿藻门	绿藻纲	团藻目	衣藻科	扁藻属	纤维素
金藻 3011	金藻门	普林藻纲	等鞭藻目	等鞭藻科	等鞭藻属	具有细胞膜薄,没有细胞壁
牟氏角毛藻	硅藻门	中心藻纲	盒形藻目	角毛藻科	角毛藻属	细胞壁薄,在超声波操作时较易破碎
茧形藻	硅藻门	羽纹纲	双壳缝目	舟形藻科	茧形藻属	/
小球藻	绿藻门	绿藻纲	绿球藻目	卵孢藻科	小球藻属	细胞很小,细胞壁很薄,有纤维素和有孢粉质
金藻 8701	金藻门	普林藻纲	等鞭藻目	等鞭藻科	等鞭藻属	无细胞壁
蓝隐藻	隐藻门	隐藻纲	隐藻目	隐鞭藻科	蓝隐藻属	无纤维细胞壁,外有周质体
三角褐指藻	硅藻门	羽文纲	褐指藻目	褐指藻科	褐指藻属	无硅质的细胞壁
纤细角毛藻	硅藻门	中心藻纲	盒形藻目	角毛藻科	角毛藻属	果胶质+硅质,无纤维素,壁硬
甲藻	甲藻门	横裂甲藻纲	裸甲藻目	多甲藻科	原夜光藻属	细胞壁厚
极小海链藻	硅藻门	中心硅藻纲	盘状硅藻目	海链藻科	海链藻属	果胶质+硅质,无纤维素,壁硬
球等鞭金藻	金藻门	普林藻纲	等鞭藻目	等鞭藻科	等鞭藻属	细胞膜薄无细胞壁
紫球藻	红藻门	原红藻纲	紫球藻目	紫球藻科	紫球藻属	内层纤维素构成,外面果胶质
叉鞭金藻	金藻门	普林藻纲	等鞭藻目	等鞭藻科	叉鞭金藻属	无细胞壁
杆状藻	硅藻门	羽纹纲	无壳缝目	脆杆藻科	针杆藻属	果胶质+硅质,无纤维素,壁硬
衣藻	绿藻门	绿藻纲	团藻目	衣藻科	衣藻属	/
三沙甲藻	甲藻门	甲藻纲	多甲藻目	原夜光藻科	原夜光藻属	细胞壁厚

从表 4 看出,细胞壁中的纤维素组分可能与细胞的抗冷性相关.细胞壁中含有纤维素的藻种,如扁藻、紫球藻、小球藻,对反复冻融有耐受力,这三种微藻经过 2 次操作后,只有 30%~40%的破碎率,而其他的微藻,破碎率均在 60%以上.小球藻不仅具有抗冻融能力,而且具有较强的抗超声能力,这可能与小球藻细胞壁中含有孢粉质类似物(一种类胡萝卜素衍生物的多聚物,常出现在高等植物花粉粒的细胞壁中)有关.

藻的生长环境也会对反复冻融的耐受力有影响.球等鞭金藻(*Isochrysis galbana* Parke) 是贻贝、牡蛎等海洋经济动物幼虫的理想饵料,本文选用同种但生长环境不同的金藻,其最适培养温度从高到低的顺序依次为球等边金藻,球等鞭金藻 3011 和球等鞭金藻 8701,比较它们在反复冻融(99%, 80%和 60%)的细胞破碎率发现:耐低温的品系的破碎率明显小于耐受高温的品系.青岛海洋大学的宫相忠<sup>[12]</sup>等研究比较了金

藻 8701 和 3011 两个品系与清除活性氧相关的超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性变化时发现, 品系抗胁迫能力的强与弱, 与 SOD 酶活的高低有关. 说明低温品系抗胁迫能力强的原因可能与活性氧清除能力有关.

超声波对细胞破碎的效率与细胞种类、时间、浓度和超声波的声频、声能有关. 裴海燕<sup>[13]</sup>等在研究藻细胞破碎对释放有机物特性的研究中发现, 超声处理确实增加了藻细胞内的有机物的释放. 孙利芹<sup>[14]</sup>等研究了超声对紫球藻破碎效果, 结果表明超声破碎方法比反复冻融有效, 当输出功率 150 W, 处理时间 20 min 破碎率达到 85%. 这一结果与我们的结果一致. 而对于其他藻细胞破碎的研究尚未见报道. 另外, 超声处理会产生局部高温现象, 因此在超声处理时一定要在冰浴条件下进行, 同时超声模式选择间歇式的方式, 以防止热敏性的活性物质变性失活.

#### 4 结 论

超声波法适合于对大多数藻细胞的破碎, 其破碎率明显高于反复冻融法. 生长在温度较高环境下的微藻细胞比较适合用反复冻融法进行破碎. 反复冻融法对藻细胞进行破碎, 虽然处理的时间长, 但处理量大, 在整个处理过程中始终保持较低的温度, 特别适合于热敏性的活性物质的提取前预处理.

#### 参 考 文 献:

[1] 李定梅. 我国微藻产业的发展概况和前景(一)[J]. 粮食

与饲料工业, 2001, 5: 37—40.

- [2] 李定梅. 我国微藻产业的发展概况和前景(二)[J]. 粮食与饲料工业, 2001, 6: 12—15.
- [3] 温少红, 王长海, 鞠宝. 紫球藻细胞中 AA、EPA 及色素提取的研究[J]. 中国海洋药物, 1999(2): 35—40.
- [4] Fenical W, Sethna K M, Lloyd G K. Marine microorganisms as a developing resource for drug discovery[J]. Pharmaceutical Pharmaceutical News, 2002, 9: 489—494.
- [5] 张成武, 曾绍琪, 张媛珍, 等. 钝顶螺旋藻多糖和藻蓝蛋白对小鼠急性放射病的防护效应[J]. 营养学报, 1996, 18(3): 327—329.
- [6] 王雪青, 苗惠, 胡萍, 等. 膳食中多不饱和脂肪酸的营养与生理功能研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 337—339.
- [7] 王长云, 管华诗. 多糖抗病毒作用研究进展 I 多糖抗病毒作用[J]. 生物工程进展, 2000, 20(1): 17—26.
- [8] 柴玉荣, 王天云, 薛乐勋. 新型生物反应器——杜氏盐藻研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(2): 30—33.
- [9] 钟石, 蔡守平, 胡丰林, 等. 4 种破碎方法对古尼虫草内含物提取的初步研究[J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32(1): 81—86.
- [10] 肖亚萍, 张博, 胡雅琴. 超声在植物学领域中的应用[J]. 应用声学, 2004, 3(5): 43—48.
- [11] 牛波, 邱海霞, 田景振, 等. 超声强化提取技术[J]. 山东中医杂志, 2000, 19(10): 629—630.
- [12] 宫相忠, 唐学玺, 黄健, 等. 球等鞭金藻 8701 的耐低温机理[J]. 水产学报, 2001, 25(1): 20—25.
- [13] 裴海燕, 李富生, 汤浅晶, 等. 藻细胞破碎释放有机物的特性[J]. 中国环境科学, 2003, 23(3): 272—275.
- [14] 孙利芹, 王长海, 江涛. 紫球藻细胞破碎方法研究[J]. 海洋通报, 2004, 23(4): 71—74.