

# 磁性微球吸附法研究盐藻细胞的疏水性

孙 钰 郝建欣 丛 威\* 蔡昭铃

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

**摘要** 采用正相悬浮聚合法制备了聚苯乙烯-二乙烯苯磁性微球。由于微球表面的聚苯乙烯是疏水性材料,可用于测定微生物细胞表面的疏水性。用聚苯乙烯磁性微球吸附法测定了不同生长期盐藻细胞的表面疏水性,以及 pH 值、NaCl 浓度、 $\text{Fe}^{3+}$  浓度、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度对盐藻细胞疏水性的影响。结果表明,盐藻细胞表面具有疏水性质,其疏水性与细胞生长阶段及环境条件有关。

**关键词** 聚苯乙烯磁性微球,盐藻(*Dunaliella salina*),吸附,疏水性

**中图分类号** Q949 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)02-0037-04

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)作为生产 $\beta$ -胡萝卜素的海洋微藻,以其独特的耐盐性以及高胡萝卜素含量,引起了人们的关注。盐藻细胞生长过程中的各种性质及其相关机理的研究对于盐藻产品的生产有重要指导意义。盐藻生物量的采收在工业生产中还存在一些问题,目前主要有离心法、絮凝法、气浮法和吸附法。离心法虽然应用广泛,但其能耗高,离心过程中易引起细胞破碎,不利于后续提取过程;絮凝法及气浮法由于引入了污染试剂使得培养液无法循环使用而仅在卤水资源丰富的地区适用。基于高盐环境下盐藻细胞表面疏水性用疏水性材料吸附采收的方法,已引起人们的关注并已取得在实际应用方面的进展<sup>[1]</sup>。然而,盐藻细胞的疏水性至今还缺乏较系统的研究。

微生物细胞疏水性的测定方法主要有接触角测定、有机碳水化合物吸附法、疏水色谱法、聚苯乙烯吸附法及聚乙二醇(PEG)-葡聚糖(DEX)双水相测定法等<sup>[2]</sup>。由于盐藻没有细胞壁,因此接触角测定和双水相测定法均无法用于盐藻的疏水性测定;用有机碳水化合物吸附法则由于盐藻细胞膜很快被溶解破坏而使结果难于观测;疏水色谱需要相应的仪器设备;聚苯乙烯吸附法若采取常用的聚苯乙烯薄片或培养板,由于表面积较小,很难使其与盐藻细胞充分接触。

磁性微球由于表面性质多样、大小皆宜、分散性好且易收集的特性,在许多方面都有应用。本文用正相悬浮聚合法合成了聚苯乙烯磁性微球,将磁性微球用于测定盐藻细胞的疏水性,建立了一个材料易得、方便可行的测定方法,并与正十六烷吸附法进行了对比,同时探讨了不同因素对盐藻细胞表面疏水性的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 聚苯乙烯-二乙烯苯磁性微球的制备

采用悬浮聚合法合成聚苯乙烯-二乙烯苯磁性微球。偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂,明胶为分散剂,苯乙烯、二乙烯苯及三氧化二铁发生悬浮聚合反应得到微米级的磁性微球,参照 Lu Xujun 等 1999 年的报道。

### 1.2 聚苯乙烯-二乙烯苯磁性微球的表面磺化

将聚苯乙烯-二乙烯苯磁性微球放入铬酸洗液中浸泡 2 h,在微球表面引入磺酸基。

### 1.3 盐藻细胞培养

杜氏盐藻藻种由内蒙古兰太生物技术公司提供。采用三角瓶培养,于 HZQ QG 型温控培养箱中荧光灯 24 h 光照,平均光强  $8.0 \text{ mW/cm}^2$ ,温度  $32^\circ\text{C}$ 。培养基成分:  $8.1 \text{ mmol/L KCl}$ ,  $0.59 \text{ mmol/L NaNO}_3$ ,  $20.3 \text{ mmol/L MgSO}_4$ ,  $2.5 \text{ mmol/L CaCl}_2$ ,  $0.3 \text{ mmol/L Na}_2\text{CO}_3$ ,  $29 \mu\text{mol/L K}_2\text{HPO}_4$ ,  $528 \mu\text{mol/L Na}_2\text{SiO}_3$ ,  $523 \mu\text{mol/L}$  柠檬酸,  $9 \mu\text{mol/L FeCl}_3$ , 微量元素溶液  $10 \text{ mL/L}$ , pH 8.0 的  $1 \text{ mol/L Tris-HCl}$  缓冲液  $8.25 \text{ mL/L}$ ,  $2.05 \text{ mol/L NaCl}$ 。取不同生长期的盐藻细胞进行疏水性测定。

第一作者:孙钰,出生于 1975 年,硕士,研究方向:生物化工,电话:010-62574303。\* 通讯联系人

收稿日期:2001-11-12;修回日期:2002-03-22

### 1.4 正十六烷吸附法测定疏水性

0.5 mL 藻液中加入 0.1 mL 正十六烷,于振荡器上振荡 3 min。静置分层后,用血球计数法测定水相中的藻密度,与空白对照藻液中的藻密度相比,疏水性以吸附在油相的藻细胞的比例计。

### 1.5 磁性微球吸附法测定疏水性

10 mL 藻液中加入 1 g 磁性微球,于摇床上 100 r/min 振荡 0.5 h。用磁场分离出磁性微球。用血球计数法测定藻液中的藻密度,与空白对照藻液中的藻密度相比,吸附在磁性微球表面上的藻细胞所占比例即吸附率,用于衡量藻体的疏水性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 正相悬浮聚合法合成磁性微球

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (A) 与聚苯乙烯微球 (B) 的傅立叶红外光谱图如图 1 所示。聚苯乙烯微球 (B) 在 700 cm<sup>-1</sup>、756 cm<sup>-1</sup> 与 1 600 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰是苯环的特征峰,3 000 ~ 3 100 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰表明微球有不饱和键。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (A) 的各吸收峰聚苯乙烯微球 (B) 均有。可推测聚苯乙烯磁性微球为混合型磁性微球,即 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 较均匀地分布在聚苯乙烯材料中。

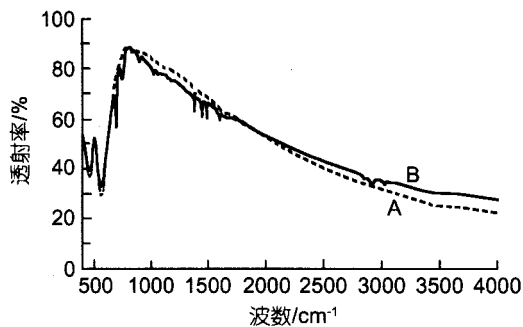


图 1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (A) 与聚苯乙烯磁性微球 (B) 的傅立叶红外光谱  
Fig.1 FTIR spectrogram of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (A) and polystyrene magnetic microspheres (B)

### 2.2 pH 对盐藻细胞疏水性的影响

用聚苯乙烯磁性微球和磺化聚苯乙烯磁性微球分别测定不同 pH 值下盐藻细胞的疏水性。pH 值对盐藻在聚苯乙烯磁性微球上的吸附的影响

如图 2 所示。pH 值低于 3 的情况下,细胞在磁性微球上的吸附量小,说明细胞的疏水性较弱。pH 在 3 左右时,细胞在磁性微球上的吸附明显提高。pH 进一步提高,细胞在磁性微球上的吸附略有下降后逐渐趋于平稳。这是由于盐藻细胞表面有相对高的负电密度,聚苯乙烯磁性微球表面的疏水性基团如苯环是电子云密集的基团。在 pH 值较低的情况下,负电性减少,静电引力小,盐藻细胞与磁性微球上疏水基团的吸引力减弱,在磁性微球上的吸附降低。而 pH 大于 3 后,负电性提高,盐藻与磁性微球上的疏水性基团吸引力增强,在磁性微球上的吸附也就增强。也就是说静电力对疏水性作出了贡献。

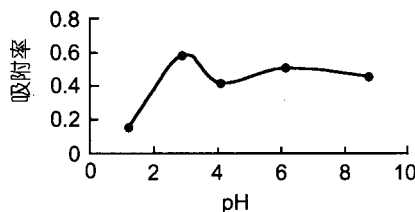


图 2 pH 值对盐藻细胞在聚苯乙烯磁性微球上的吸附影响  
Fig.2 Effect of pH on adhesion of *D. salina* cells to polystyrene magnetic microspheres

磺化后的磁粉, pH 值对盐藻在磁性微球上的吸附影响如图 3 所示。盐藻疏水性随 pH 值的变化规律与图 2 相似。磁粉表面引入磺酸基团后,由于磺酸基团是亲水基团,使磁性微球表面疏水性下降,从而盐藻的吸附效率普遍下降。这也证明了盐藻在磁性微球上的吸附是疏水性吸附。

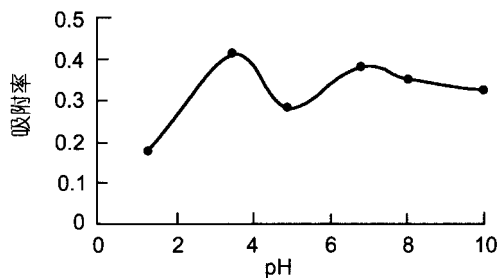


图 3 pH 值对盐藻细胞在磺化聚苯乙烯磁性微球上的吸附影响  
Fig.3 Effect of pH on adhesion of *D. salina* cells to sulfonated polystyrene magnetic microspheres

### 2.3 正十六烷吸附法与聚苯乙烯磁性微球吸附法测定疏水性的对比

采用聚苯乙烯磁性微球吸附法与正十六烷吸附法分别测定了不同硫酸铵浓度对盐藻疏水性的影响(图4)。由图4可见,正十六烷吸附法与聚苯乙烯磁性微球吸附法测定的结果基本相同。由图4还可见,随着硫酸铵浓度的提高,藻细胞的吸附率迅速下降。同时,硫酸铵浓度达到0.06 mol/L时,吸附率已趋于零。

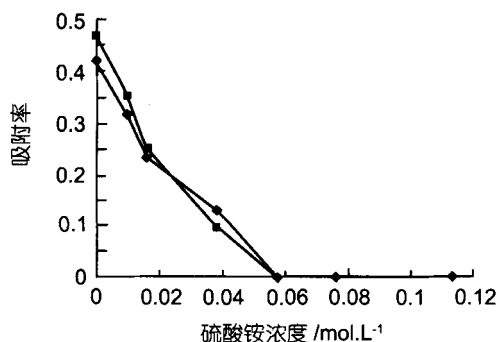


图4 硫酸铵对盐藻细胞在磁性微球上与正十六烷中吸附的影响  
Fig.4 Effect of ammonium sulfate concentration on adhesion of *D. salina* cells to magnetic microspheres and hexadecane  
—■— 正十六烷吸附法; —◆— 聚苯乙烯磁性微球吸附法

Mel Rosenberg 等人1984年报道,硫酸铵作为蛋白质变性剂可提高一些细菌的疏水性。但图4显示硫酸铵是盐藻疏水性的抑制剂。由于盐藻在高盐浓度下生长,具有极强的耐盐性,细胞膜中有一些性能非常独特的膜蛋白。因此一般的蛋白质变性剂如脲、硫酸铵等,对盐藻细胞膜的影响与一般细菌截然不同。同时,加入硫酸铵后,静电引力与范德华力的减小也可能导致细胞疏水性的降低。

### 2.4 盐藻不同生长期的疏水性

用磁性微球吸附法测定的不同生长期盐藻细胞疏水性的变化如图5所示。虽然从接种后第2天细胞进入对数生长期,但从第4天后盐藻细胞才逐渐显示出疏水性。在对数生长期的初期疏水性较低。在对数生长期的末期,疏水性达到较高值。这与 Gerrit Smit 等人1992年报道的某些微生物在对数生长期的中后期表现出较强的疏水性的结果吻合。

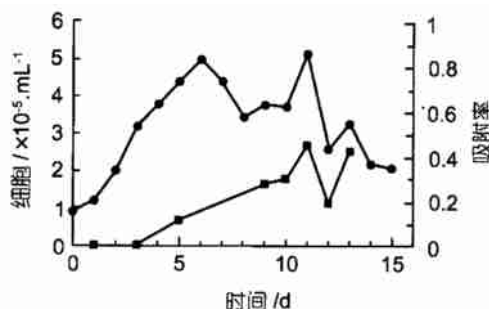


图5 盐藻细胞疏水性随生长的变化  
Fig.5 Hydrophobicity of *D. salina* cells in different growth phase  
—■— 生长曲线; —◆— 疏水性曲线

### 2.5 氯化钠对盐藻细胞疏水性的影响

用磁性微球吸附法测定了在不同氯化钠浓度条件下,盐藻细胞的疏水性(图6)。在5%~10%范围内盐藻疏水性随氯化钠浓度增加而增强。氯化钠浓度在10%~20%之间变化时,盐藻疏水性逐渐降低,氯化钠高于20%后盐藻细胞疏水性随氯化钠浓度的提高,又逐渐增强。从利用盐藻细胞疏水性进行吸附考虑,盐藻的氯化钠浓度在10%左右较为有利。

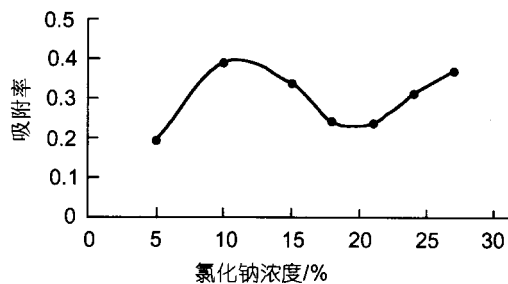


图6 氯化钠对盐藻细胞疏水性的影响  
Fig.6 Effect of NaCl concentration on hydrophobicity of *D. salina* cell

### 2.6 三氯化铁对盐藻疏水性的影响

$Fe^{3+}$ 是盐藻生长所需的重要微量元素,由于 $Fe^{3+}$ 带有较大的正电荷,是盐藻细胞表面疏水性的主要影响因素之一。由磁性微球测定不同 $Fe^{3+}$ 浓度下的盐藻细胞疏水性,结果示于图7。1 mmol/L浓度左右的 $Fe^{3+}$

对盐藻细胞在即表现出明显的毒杀作用。显微镜下镜检查显示,盐藻细胞膜均已丧失,细胞结团。因此仅在低浓度下观察  $\text{Fe}^{3+}$  对盐藻疏水性的影响。在  $0 \sim 0.2$   $\text{mmol/L}$  三氯化铁浓度范围内有一个疏水性变化的凹井。这是静电力与  $\text{Fe}^{3+}$  毒性共同作用的结果,情况十分复杂,其机理有待于进一步的研究。

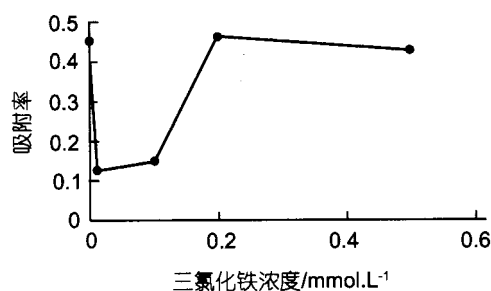


图 7 聚苯乙烯磁性微球吸附法测定三氯化铁对盐藻细胞疏水性的影响

Fig. 7 Effect of ferric chloride concentration on hydrophobicity of *D. salina* cell

### 3 结论

用悬浮聚合法所制得的聚苯乙烯磁性微球,由于表面疏水(聚苯乙烯),可用于测定盐藻细胞表面的疏水性,此法材料易得,方便可靠。

盐藻细胞表面具有疏水性质,其疏水性与细胞生长及环境条件有关。在对数生长期的末期盐藻细胞显示出较强的疏水性; pH 值 3 左右盐藻细胞的疏水性最强;氯化钠浓度在 10% 左右,疏水性最大;而硫酸铵是盐藻细胞疏水性的抑制剂;三氯化铁浓度在  $0.1 \text{ mmol/L}$  以下时,也是盐藻细胞疏水性的抑制剂。

#### 参考文献

- 1 段学辉,张嗣良. 盐藻及其生物量采收. 盐湖盐与化工杂志,1998,27(2):22-24,31
- 2 Nava Mizes, Pauline S, Handley, et al. Microbiol Cell Surface Analysis: Structural and Physicochemical Methods. New York: VCH Publishers Inc,1991.263-287

## STUDIES ON HYDROPHOBICITY OF *Dunaliella salina* CELLS BY ADHERENCE TO MAGNETIC MICROSPHERES

SUN Yu      HAO Jiarr Xin      CONG Wei      CAI Zhao Ling

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080)

Received: Nov., 12, 2001

Key Words: Polystyrene magnetic microspheres, *Dunaliella salina*, Adherence, Hydrophobicity

### Abstract

The surface of magnetic polymer microsphere that was made from polystyrene is hydrophobic. It can measure the hydrophobicity of microbial cells. In this work, the microsphere, which was made from styrene and divinylbenzene, was prepared by suspension polymerization. The surface hydrophobicity of *Dunaliella salina* cells was measured in different growth phase and different culture conditions with pH, NaCl concentration,  $\text{Fe}^{3+}$  concentration and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration. The results showed that the surface of *Dunaliella salina* cells has hydrophobicity and the hydrophobicity changed with cell growth phase and culture conditions.

(本文编辑:张培新)