

[Note]

www.whxb.pku.edu.cn

酵母细胞为模板矿化合成 SiO₂ 纳米结构材料的研究

于源华 郭 锋* 果洪宇

(长春理工大学生命科学学院, 长春 130022)

摘要 根据无机盐可以在生物细胞膜上沉积形成纳米结构材料的现象和生物矿化理论, 在人工培养条件下, 成功地以低等真核生物细胞-酵母菌为模板, 以正硅酸乙酯(TEOS)作为硅源, 矿化合成了一种壳鞘状的 SiO₂ 纳米结构材料, 厚度达 150 nm 左右, 并采用 TEM、SEM、EDX、FT-IR、TGA 等表征手段对实验结果进行了深入细致的研究, 获得了大量的实验数据, 为利用生物细胞模板合成介观尺寸有序 SiO₂ 纳米材料作出了有益的尝试。

关键词: 细胞模板, 生物矿化, 纳米结构SiO₂, TEOS

中图分类号: O614

Studies on Biomineral Synthesis of SiO₂ Nanostructured Materials by Yeast Cells as Templates

YU, Yuan-Hua GUO, Feng* GUO, Hong-Yu

(College of Life Science, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, P. R. China)

Abstract According to the phenomena that inorganic salt may deposit on biological cell membrane and the biomineralization theory, under the man-made culture conditions, one kind of SiO₂ nanostructured material with special shape was biominerally synthesized successfully by means of the cell templates of lower eukaryote-yeast and by tetraethyl orthosilicate(TEOS) as Si nutrition. In the yeast cell wall, the shell-like nanostructured SiO₂ was synthesized, and its thickness was 150 nm. The samples were investigated by TEM, SEM, EDX, FT-IR, XPS, TGA, etc., and massive experimental data were obtained.

Keywords: Cell template, Biomineralization, Nanostructured SiO₂, TEOS

生物矿物体是生物的有机化合物分子与环境的无机矿物离子相互作用的复杂产物。生物矿化作用是在一定条件下, 在生物体的不同部位, 以各种作用方式, 在有机物质的影响下, 经历形核、生长和相变等过程, 将溶液中的无机物转变为结构高度有序的生物矿物体的过程^[1]。生物矿化作用是复杂的固液相之间的生物无机物理化学过程, 它不仅受热力学因素、动力学因素的控制, 更重要的是在空间、构造和化学上受控于生物学因素, 生物通过设置自身的生物矿化位置, 调节微环境, 提供有机质和成矿物质来控制生物成矿作用的方向和过程^[2]。

近年来, 随着生物矿化研究的深入, 微生物在成矿过程中的作用越来越受到重视。因为微生物可以生活在自然界任何具有液态水的地方, 在一些极为苛刻的条件下, 微生物往往是唯一的生命形式^[3]。微生物无所不在, 数量众多, 并且体形小, 具有相对最大的比表面积, 能够在其表面聚集各种物质。已知由微生物产生的生物矿物占生物矿物总数的一半以上, 其中铁锰氢氧化物、氧化物以及硫化物占有很大比例, 这也是微生物能够控制许多现代生物地球化学循环的原因^[4]。国内王荔军、郭中满等人^[5]已成功利用基因工程大肠杆菌细胞和硅藻细胞模板合成了

Received: February 20, 2006; Revised: May 29, 2006. *Correspondent, E-mail: aamoekwok@163.com; Tel: 13384980453.

吉林省科技厅资助项目(20030505-2)

直径在50~170 nm 的 SiO₂ 纳米粒子.

本文为了探讨硅在真核微生物细胞上沉积的可能性, 选择了内孢霉属(endomyces)的近似内孢霉酵母(endomyces decipiens)作为模板, 以正硅酸乙酯(TEOS)为硅营养进行了 SiO₂ 纳米材料的矿化合成实验研究, 成功地合成了有一定规律和结构特点的 SiO₂ 纳米结构材料, 对利用生物细胞为模板进行 SiO₂ 纳米材料的化学合成有重要的指导作用和潜在应用价值.

1 材料与方法

1.1 材料

近似内孢霉酵母(endomyces decipiens)菌种由中国科学院微生物研究所提供, 正硅酸乙酯(TEOS)为北京化工厂产品.

1.2 方法

1.2.1 酵母菌培养基的配制

本实验所用化学试剂均为分析纯(A.R.). 醋酸钠 10 g; 葡萄糖 1 g; 酵母浸膏 2.5 g; 磷酸氢二钠 0.5 g; 硫酸铵 5 g; 七水合硫酸镁 1 g; 磷酸二氢钾 0.5 g; 氯化钾 1.8 g; 维生素 B₁ 100 μg; 蒸馏水 100 mL; pH 为自然值.

将上述试剂用蒸馏水溶解后, 用高压灭菌锅 121 °C、15 min 灭菌, 冷却后无菌保存备用.

1.2.2 甘油酵母菌种的激活

在试管中加入适量的已制好的培养基, 于无菌室内用接种环挑取适量菌种接种于试管培养基中, 无菌封口后置于恒温水浴振荡器中进行厌氧培养, 25 °C、160 r·min⁻¹ 振荡 12 h 过夜, 备用.

1.2.3 激活酵母菌的大量制备

取 250 mL 三角烧瓶一个, 灭菌后备用. 将 100 mL 培养基和 2 mL 已激活的菌液加入到三角烧瓶中摇匀, 无菌封口后置于恒温水浴振荡器中进行厌氧培养, 25 °C、120 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h, 备用.

1.2.4 实验酵母菌细胞形态的观察

取上节所得的酵母菌 2 mL 接种于 100 mL 麦氏培养基内, 25 °C、120 r·min⁻¹ 培养 24~48 h, 经 2% 美蓝染色液染色后, 做显微镜观察, 并用 OLYMPUS-20 型摄像系统进行显微照相, 观察记录实验酵母菌的细胞形态.

1.2.5 酵母菌的生物矿化培养

准备三只 250 mL 已灭菌的三角烧瓶, 按 A、B、C 依次编号. 分别向三只烧瓶中各加入 100 mL 的

表 1 酵母菌的生物矿化培养

Table 1 Yeast's biomineralization under the man-made culture conditions

Sample	Yeast culture medium (mL)	TEOS/culture medium (μg·mL ⁻¹)	Yeast (mL)
A	100	100	2
B	100	120	2
C	100	150	2

酵母培养基, 然后按表 1 所列各 TEOS/培养基的配比分别向 A、B、C 中加入 10000 μg、12000 μg、15000 μg 的 TEOS, 振荡均匀后静置 10 min, 接着再向 A、B、C 中各加入 2 mL 稳定期的酵母菌.

用 8 层已灭菌的医用纱布封口, 棉线扎紧后将 A、B、C 移至恒温水浴振荡器中, 25 °C、100 r·min⁻¹ 振荡培养 72 h, 培养结束后置于 4 °C 冰箱内保存备用.

1.2.6 样品的处理与表征

样品初步处理: 将 TEOS 生物矿化培养好的酵母菌分别用离心机 4500 r·min⁻¹、10 min 离心, 弃上清液, 收取沉淀, 用少量培养基洗下乳白色沉淀后, 分装在 2 mL 的小离心管中, 置于 4 °C 冰箱内备用. 检测前从冰箱内取出离心管, 10000 r·min⁻¹、4 °C 离心 5 min, 弃上清液; 再加入适量生理盐水, 洗涤沉淀 2 次, 10000 r·min⁻¹、4 °C 离心 5 min, 然后用 5 倍于沉淀体积的酵母培养基稀释沉淀, 摇匀使酵母细胞悬浮于培养基中. 采用 TEM、SEM、EDX、FT-IR、TGA 等表征手段对实验结果进行表征.

2 结果与分析

实验酵母菌的显微照片如图 1 所示, 由显微照片可以清楚地辨认实验酵母菌的细胞形态. 图 1 显示内孢霉酵母呈柱状或棒状, 个体均一, 平板培养基显示菌落色泽灰白, 菌落表面光滑.

如表 2 所示, 实验酵母菌经 72 h 矿化培养后,



图 1 近似内孢霉酵母的显微照片

Fig.1 Micrograph of endomyces decipiens

表 2 TEOS 生物矿化培养酵母菌的生长情况

Table 2 Growth situation under the man-made culture conditions

Sample	TEOS/culture medium ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Growth situation
A	100	normal
B	120	micro precipitation
C	150	massive precipitations

各添加配比不同的样品,其生长情况也不同.当“TEOS/培养基”为 $150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,酵母菌液浑浊,有大量沉淀,镜检说明酵母菌出现了大量死亡的情况,因此样品 C 已无研究价值,故舍弃;当配比为 $120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,菌液出现了少量的沉淀,镜检显示酵母菌生长情况良好;A 样表现和镜检都显示菌种生长良好,对 A、B 和空白样进行电镜观察分析.电镜观察结果如图 2~图 5 所示.

从图 2 上可以看到,当“TEOS/培养基”配比为 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,样品 A 的细胞壁外侧沉积的 SiO₂ 纳米粒子比较少,但有逐渐连接成片的趋势;尤其令我们感兴趣的是,当 TEOS 的添加量增加到 $120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时(图 3),在样品 B 的细胞壁外侧沉积了一层厚度为 150 nm 左右的 SiO₂ 纳米结构,形成了一个类似壳鞘状的包裹层,将酵母细胞紧密包裹在内.而在相同条件下,正常培养的近似内孢霉酵母的细胞壁上,看不到 SiO₂ 纳米粒子.另外还发现,样品 B 的酵母细胞大小与样品 A 和正常酵母细胞相比明显小了许多,这可能是因为壳鞘状 SiO₂ 纳米结构的形成过程限制了酵母菌细胞体的生长发育.相对于 $150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 添加量的样品 C 中酵母菌的大量死亡而言,可以推断这一壳鞘状 SiO₂ 纳米结构并不致

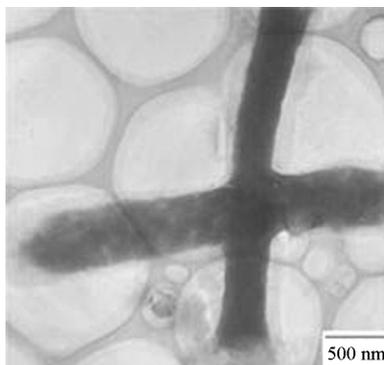


图 2 近似内孢霉酵母样品 A 的 TEM 照片

Fig.2 TEM image of endomyces decipiens sample A

×12 K

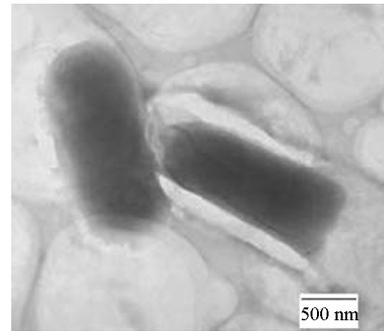


图 3 近似内孢霉酵母样品 B 的 TEM 照片

Fig.3 TEM image of endomyces decipiens sample B

×15 K

密,在它上面必定存在许多的孔道,使细胞能与外界相通以进行物质交换,样品 C 中的酵母菌之所以大量死亡,就是因为 TEOS 添加量过大,致使细胞壁上短时间内沉积了过多的 SiO₂,堵塞了这些通道使物质交换无法进行所致.

由各个“TEOS/培养基”配比样品的电镜观察结果来看,配比值 $120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时沉积的壳鞘状结构最完整,由日常培养的观察也可知,此时酵母大部分生长情况良好,虽然有少量沉淀发生,但可能是因少数酵母初期对 TEOS 的不适应所致,因此,可以认为在酵母细胞壁上形成壳鞘状纳米结构材料的最佳 TEOS 添加量为 $120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

为了确定所看到的壳鞘状结构的元素成分,对内孢霉酵母进行了扫描电镜分析,图 4 就是样品 B 壳鞘的 SEM 照片.由图可见壳鞘表面是不光滑的,由细小的颗粒聚集形成.对图 4 所示部分进行 EDX

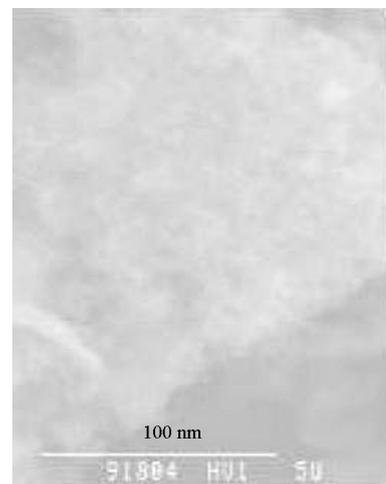


图 4 近似内孢霉酵母样品 B 壳鞘的 SEM 照片

Fig.4 SEM image of endomyces decipiens sample B

×100 K

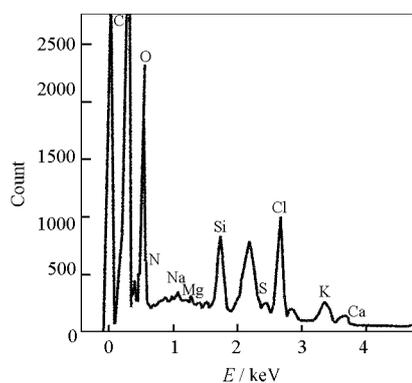


图5 壳鞘状 SiO_2 纳米结构的 EDX 能谱
Fig.5 EDX spectrum of the shell-like nanostructured SiO_2

能谱分析,结果如图5所示.由图中可以看到其它一些元素的干扰,应该是离心后酵母培养基引入的,忽略影响可以得出壳鞘层氧硅摩尔比(O/Si)为2.86, Si的含量为61.03%,O为38.97%.

为了进一步确定壳鞘层的组成和结构,对TEOS最佳添加量 $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 培养下的内孢霉酵母样品B进行了红外光谱和热失重分析.

从图6中可以看出, $1090 \sim 1120 \text{ cm}^{-1}$, $790 \sim 820 \text{ cm}^{-1}$, $450 \sim 470 \text{ cm}^{-1}$ 处的峰分别由 Si—O—Si 的反对称伸缩振动、对称伸缩振动和弯曲振动引起.经比较发现,图中热处理前后三个特征峰的位置基本不变,表明热处理过程中没有对 SiO_2 的骨架结构造成破坏;在 3450 cm^{-1} 附近是与—OH 基团伸缩振动有关的吸收峰;— CH_3 的吸收带在 2960 、 2870 、 1460 、 1380 cm^{-1} 等位置,— CH_2 —的吸收带在 2925 、 2850 、 1470 、 725 cm^{-1} 等位置,这些吸收峰应该是由组成酵母细胞的有机物引起的.样品热处理后的谱图显

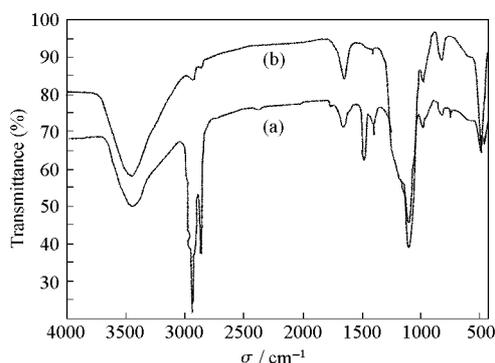


图6 样品酵母热处理前后的红外分析图
Fig.6 The FT-IR spectra of the sample of endomyces decipiens at different temperatures
(a) before heat treatment, (b) after heat treatment

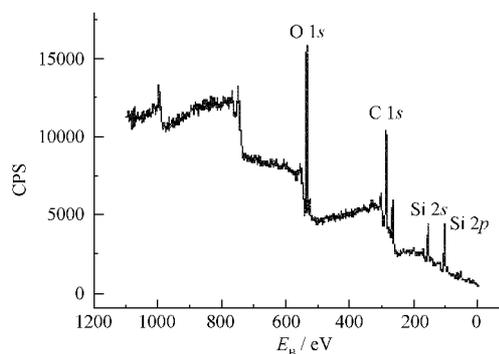


图7 近似内孢霉酵母样品C的XPS全图
Fig.7 XPS spectrum of endomyces decipiens sample C

示— CH_3 、— CH_2 —特征峰的强度极弱,说明热处理后样品中有机物的含量已大大减少,热处理过程能很好地除去有机物.由以上图谱分析可知,在酵母细胞壁上沉积的壳鞘状纳米结构材料确为二氧化硅,属于无定型结构.

此外,还对样品C的酵母沉积膜进行XPS全谱扫描,扫描结果见图7.由于不同的原子具有不同的特征结合能,因此可以根据XPS图谱中出现峰值的位置确定样品表面的元素组成及各元素的存在状态.由图7可以看出,在菌液薄膜表层XPS全图中,存在四个峰值,对照XPS标准谱图,这四个峰对应的分别为 Si 2p、Si 2s、C 1s、O 1s 峰,表明所得菌液薄膜表层中含有 Si、C、O 等元素(H元素除外).

为了确定各种组成元素的化合态及存在状态,必须分析这些元素的内层电子结合能及其相关的化学位移,因此对上述三种元素进行了高分辨率XPS分谱扫描.从光电子能谱测得的信号是该物质含量或相应浓度的函数,在谱线上它表示为光电子峰的面积.利用XPS对菌液薄膜表层元素定性分析得知,各组分所对应的结合能分别为 C 1s: 284.6 eV ; O 1s: 531.9 eV ; Si 2p: 103.4 eV .对照XPS标准谱图,可知 SiO_2 中 Si 元素的特征结合能为 103.4 eV ,本实验测量值与其一致,又由 Si、O 两元素的光电子峰的面积可以计算得出, Si 元素所占质量比为 34.53% ,而 O 元素所占质量比为 65.46% .通常, Si 与 O 质量比应该为 46.6% ,菌液薄膜表层氧元素对于 Si 有微量富余,这可能是由于在壳鞘状纳米结构表层有部分 Si—O—H 结构存在所致.因此可以确定所得菌液薄膜表层中 Si 元素的组成状态为 SiO_2 .

图8的TGA曲线表明,内孢霉酵母在不含TEOS(A)和有TEOS(B)的培养基中,同样条件培养

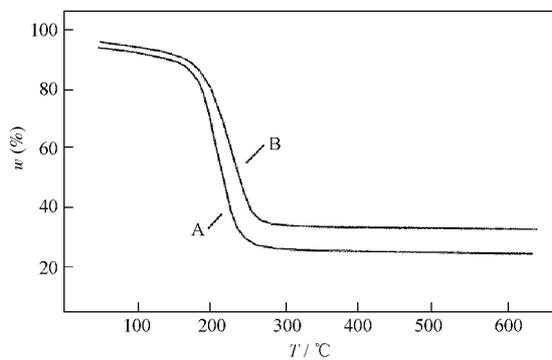


图 8 近似内孢霉酵母样品的热失重曲线

Fig.8 TGA curves of the sample of endomyces decipiens

(A) without TEOS; (B) with TEOS

后TGA曲线发生了明显的变化,在200℃以前,B曲线和A曲线的失重速率比较接近,但从200℃至600℃为止,B的失重速率明显比A慢,在400℃时,A失重72%(w,下同)左右,而B仅失重60%左右,在温度达到600℃以上时,B的残余质量是35%,而A的残余质量是20%,两者相差15%;由于在600℃以上高温时,内孢霉酵母菌体内的所有水分及有机成分已基本分解挥发,剩余的就是无机成分,除了含TEOS或不含TEOS之外,A、B两样品是在同样时间、同样培养基以及同样培养条件下生长所得的实验结果,所以也说明两者相差15%是由于SiO₂在酵母细胞壁上沉积使得菌体的无机成分增加所致,从而进一步证实了电镜上所观察到的细胞壁上沉积的壳鞘状纳米结构确是SiO₂纳米结构体系。

3 结 论

在温和的人工培养条件下,以近似内孢霉酵母细胞为模板,在细胞壁蛋白和多糖生物分子诱导下,以TEOS为硅源进行了纳米结构SiO₂的矿化合成

实验,结果如下。

(1) 经实验证明近似内孢霉酵母细胞可以利用TEOS以细胞壁为模板合成纳米结构SiO₂,生物矿化化学合成的这种壳鞘状纳米结构SiO₂,厚度达150nm左右。

(2) TEM和EDX能谱分析表明,纳米结构壳鞘层氧硅摩尔比(O/Si)为2.86,Si含量为61.03%,O含量为38.97%。

(3) 由IR和XPS分析可知,在酵母细胞壁上沉积的壳鞘状纳米结构组成为SiO₂,属于无定型结构。

(4) 热失重分析表明,在600℃以上时,酵母细胞自身的水分和有机成分基本分解挥发完全,壳鞘状纳米结构SiO₂占矿化培养酵母细胞质量的15%。

利用微生物合成SiO₂纳米结构材料有重要的潜在应用价值,可以作药物的载体治疗血栓症等疾病,也可以用作医用植入材料、光电子器件和记忆存储材料等。该研究对仿生材料化学合成也有重要的指导作用。如何进一步的利用各种微生物特性开展横向实验和开发应用这些纳米结构材料,是我们下一步研究的首要目标。

References

- 1 Mann, S.; Kupeman, A.; Ozin, G. A. *Nature*, **1996**, *382*: 313
- 2 Oliver, A.; Kupeman, A.; Coomvys, N.; Lough, A.; Ozin, G. A. *Nature*, **1995**, *378*: 47
- 3 Lin, H. P.; Mou, C. Y. *Science*, **1996**, *273*: 765
- 4 Yang, H.; Kuperman, A.; Coombs, N.; Mamiche, S.; Ozin, G. A. *Nature*, **1996**, *379*: 703
- 5 Wang, L. J.; Guo, Z. M.; Li, T. J.; Li, M. *Progress in Chemistry*, **1999**, *11*(2): 119 [王荔军,郭中满,李铁津,李敏.化学进展(*Huaxue Jinzhan*), **1999**, *11*(2): 119]
- 6 Aksay, I. A.; Trau, M.; Manne, S.; Honma, I.; Yao, N.; Zhou, L.; Fenter, P.; Eisenberger, P. M.; Gruner, S. M. *Science*, **1996**, *273*: 892