

利用 EXAFS 研究酿酒酵母与 $\text{Zn}(\text{II})$ 的相互作用机制

陈灿¹, 谢亚宁², 杜永华², 王建龙^{1*}

(1. 清华大学核能与新能源技术研究院环境技术研究室, 北京 100084; 2. 中国科学院高能物理研究所同步辐射室, 北京 100049)

摘要: 为深入探讨酿酒酵母与重金属离子 $\text{Zn}(\text{II})$ 的相互作用机制, 利用扩展 X 射线吸收精细结构谱 (EXAFS) 研究了在不同实验条件下, 酿酒酵母吸附重金属离子 $\text{Zn}(\text{II})$ 的局域结构. 结果表明, Zn 以四配位体和六配位体混合构型与酵母细胞表面结合, 且以四配位体构型为主. Zn 的第一配位层 $\text{Zn}-\text{O}$ 原子间距和配位数分别在 0.197 ~ 0.203 nm 和 3.2 ~ 4.3 范围内. $\text{Zn}(\text{II})$ 初始浓度升高、初始 pH 值升高导致 $\text{Zn}-\text{O}$ 配位数下降, 活酵母细胞 $\text{Zn}-\text{O}$ 配位数低于死酵母细胞, $\text{Zn}-\text{O}$ 原子间距下降.

关键词: 酿酒酵母; 生物吸附; Zn 离子; EXAFS

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)06-1666-05

Interaction Mechanism Between $\text{Zn}(\text{II})$ and *Saccharomyces cerevisiae* Using EXAFS

CHEN Can¹, XIE Ya-ning², DU Yong-hua², WANG Jian-long¹

(1. Laboratory of Environmental Technology, Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The extended X-ray absorption fine structure spectroscopy (EXAFS) was used to investigate the mechanisms of interaction between $\text{Zn}(\text{II})$ and *Saccharomyces cerevisiae*. The nature of the zinc center in the yeast cells exposed to different $\text{Zn}(\text{II})$ concentrations and initial pH was determined by Zn K-edge X-ray absorption spectroscopy. The experimental results suggested that the adsorbed zinc ion on the yeast was the mixture of tetrahedron and octahedron structure, and $\text{Zn}-\text{O}$ bond length changed within 0.197-0.203 nm and coordination number varied between 4.3 and 3.2 under different conditions. Increase of the initial concentration of $\text{Zn}(\text{II})$ and initial pH value decreased the coordination number of $\text{Zn}-\text{O}$. $\text{Zn}-\text{O}$ bond length and coordination number of the live cells of the yeast was lower than that of dead cells.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; biosorption; zinc(II); EXAFS

生物吸附法是一种新颖的废水处理方法^[1]. 重金属离子在微生物细胞上的吸附, 是一种复杂的固-液界面体系, 许多用于气-固界面体系的表面分析仪无法有效地应用于溶液吸附的微观研究^[2,3]. 基于同步辐射光源的扩展 X 射线吸收精细结构谱 (extended X-ray absorption fine structure, EXAFS) 技术可以研究各类环境样品中元素的局域结构状态, 如确定与吸附态金属相结合的周围原子的种类、个数以及原子间距等, 在近几年已迅速成为国际上研究固液界面吸附的热点之一. 目前利用 EXAFS 技术对生物体系的研究开始增多, 除植物修复方面有所报道外, 缺乏对微生物整体细胞吸附重金属离子的研究^[2~10].

本研究利用 EXAFS 技术, 结合宏观吸附实验, 以水溶液中不同 $\text{Zn}(\text{II})$ 浓度下、不同 pH 值条件下 Zn 离子在不同状态酿酒酵母细胞 (干燥死酵母、新鲜活酵母) 表面上的吸附体系为对象, 对酵母表面 $\text{Zn}(\text{II})$ 的局域结构进行了探讨. 这项研究将为酵母细胞吸附金属离子 Zn 的微观机制提供直接的信息, 同时也是将 EXAFS 技术用于研究微生物细胞-金属离

子相互作用机制方面进行了尝试, 可为类似体系的细胞-离子相互作用关系的 EXAFS 研究提供参考.

1 材料与方法

1.1 菌株

干燥死酵母由燕京啤酒厂提供, 新鲜活酵母是由购买于中国科学院微生物研究所、编号为 2.606 的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 培养所得.

1.2 生物吸附试验方法

分别取 0.1 g (干重) 酵母细胞、50 mL 硝酸锌离子溶液于 100 mL 锥形瓶中, 置于恒温摇床上振荡 (30°C , $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$). 干燥死酵母振荡反应 3 h, 而新鲜活酵母振荡反应 72 h. 然后离心分离 ($12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min), 收集上清液测量 Zn 离子浓度并测

收稿日期: 2007-06-03; 修订日期: 2007-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50278045); 清华大学基础研究基金项目 (JC2002054)

作者简介: 陈灿 (1973 ~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为水污染控制.

* 通讯联系人, E-mail: wangjl@tsinghua.edu.cn

量 pH 值,计算酵母吸附量. Zn 离子浓度 c 的分析方法以及吸附量 q 计算方法见文献[11]. 吸附离心后的酵母用去离子水离心洗涤 2~3 次用于 EXAFS 测定. 具体试验条件和吸附结果见表 1.

表 1 吸附实验结果

Table 1 Results of Zn(II) samples adsorption by <i>S. cerevisiae</i>						
样品编号	Zn(II)初始浓度 /mmol·L ⁻¹	初始 pH	反应后 pH	吸附量 /mmol·g ⁻¹	平衡浓度 /mmol·L ⁻¹	酵母状态
Zn1	1	4	6.01	0.090	0.848	死酵母
Zn2	2	4	6.00	0.164	1.406	死酵母
Zn3	5	4	5.40	0.211	4.972	死酵母
Zn4	1	6	6.14	0.103	0.821	死酵母
Zn5	1	4	—	—	—	鲜酵母

1.3 EXAFS 样品制备、XAFS 光谱数据的采集与处理计算

将酵母细胞装入 3 mm×2 mm 的铅制小槽,用胶带将小槽固定于 XAFS 测定器中. 参照物为分析纯 ZnO、固体 Zn(NO₃)₂·6H₂O(s)、Zn 离子水溶液 Zn(NO₃)₂·6H₂O(aq.). 参照物样品的制备分为 2 种: 对于固体标准物采用固体粉末胶带法: 研磨之后的固体粉末均匀地涂于 10 mm×115 mm 的胶带上, 折叠之后用于 EXAFS 测定; 对于液体参照物则是装于塑料袋中, 保证袋中各处溶液厚度比较均匀并且没有气泡.

EXAFS 实验在北京同步辐射装置(BSRF)的 1W1B束线上进行. 测定时储存环电子能量为 2.5 GeV, 电子流强范围为 60~160 mA. 实验在常温下进行, 根据 Zn 离子的浓度采用透射和荧光模式, 荧光模式下选用 Cu 滤波片. EXAFS 谱的测量范围为吸

收边前 150 eV 至吸收边后 800 eV. EXAFS 解谱采用 Cerius 2 软件.

2 结果与讨论

2.1 吸附实验结果

酵母吸附 Zn(II) 的实验结果见表 1. 可以看出, 随着 Zn 离子初始浓度的升高, 酵母吸附量升高. 当溶液初始 pH 值从 4 增加到 6, 酵母对 Zn 的吸收增加了 14%, 达到 0.103 mmol·g⁻¹, pH 值增加, 但是溶液最终 pH 值相差不大, 不超过 0.14.

2.2 Zn-酵母吸附产物微观构型

参照物 ZnO、固体 Zn(NO₃)₂·6H₂O(s)、Zn(II) 水溶液 Zn(NO₃)₂·6H₂O(aq.) 与 5 种 Zn-酵母吸附样品的 EXAFS 谱图分别见图 1、图 2. EXAFS 第一配位层的分析结果见表 2.

从图 1、图 2 可以看出, Zn-酵母吸附样品中 Zn

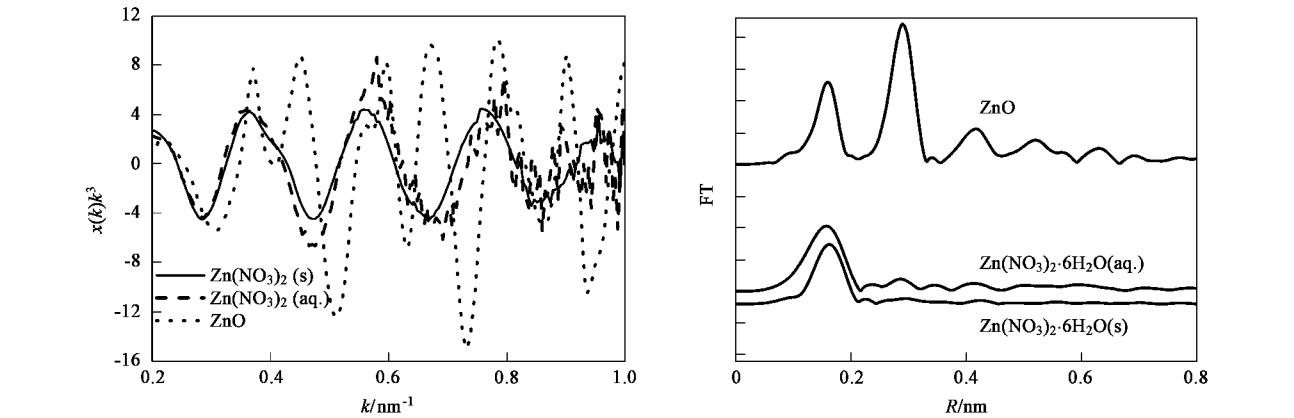


图 1 参照物 Zn-K 边 EXAFS 谱(k^3 权重)以及相应的径向结构函数
Fig.1 Normalized, background-subtracted k^3 -weighted EXAFS of ZnO and Zn(NO₃)₂ references and their corresponding radial distribution functions obtained by Fourier transformation

第一配位层最近邻原子是 O 原子. 根据 Cerius 2 软件计算得到 Zn-酵母吸附样品中第一配位层对应的配位原子间距 R 、近邻原子的配位数 N 、Debye-

Waller 因子(σ^2)以及拟合残差 Residual, 见表 2. 表 2 说明, 随着 Zn 离子初始浓度的增加, 酵母表面 Zn 负荷的增加, Zn—O 配位数逐渐从 4.3 下降到 3.9, 而

Zn—O 键长差别不、基本维持在 0.202 ~ 0.203 nm. Zn 离子初始浓度增加导致细胞表面 Zn—O 间距增加、配位数下降的趋势,在真菌细胞壁吸附 Zn 中也观察到^[10]. 体系初始 pH 值从 4 增加到 6, Zn—O 键长不变,但是配位数下降,从 0.43 下降到 0.39. 活酵母细胞与干燥死酵母细胞吸附的 Zn 比较,被吸附的 Zn—O 键长降低(从 0.202 nm 下降到 0.197 nm),配位数下降到 3.2.

表 2 EXAFS 样品第一配位层(Zn—O)拟合结果				
Table 2 EXAFS results of first Zn—O coordination sphere				
样品编号	<i>R</i> /nm	<i>N</i>	10 ² σ^2 /nm ²	Residual
Zn1	0.202	4.3	0.006	23.48
Zn2	0.202	4.2	0.005	27.78
Zn3	0.203	4.0	0.005	33.48
Zn4	0.202	3.9	0.005	26.63
Zn5	0.197	3.2	0.004	25.16

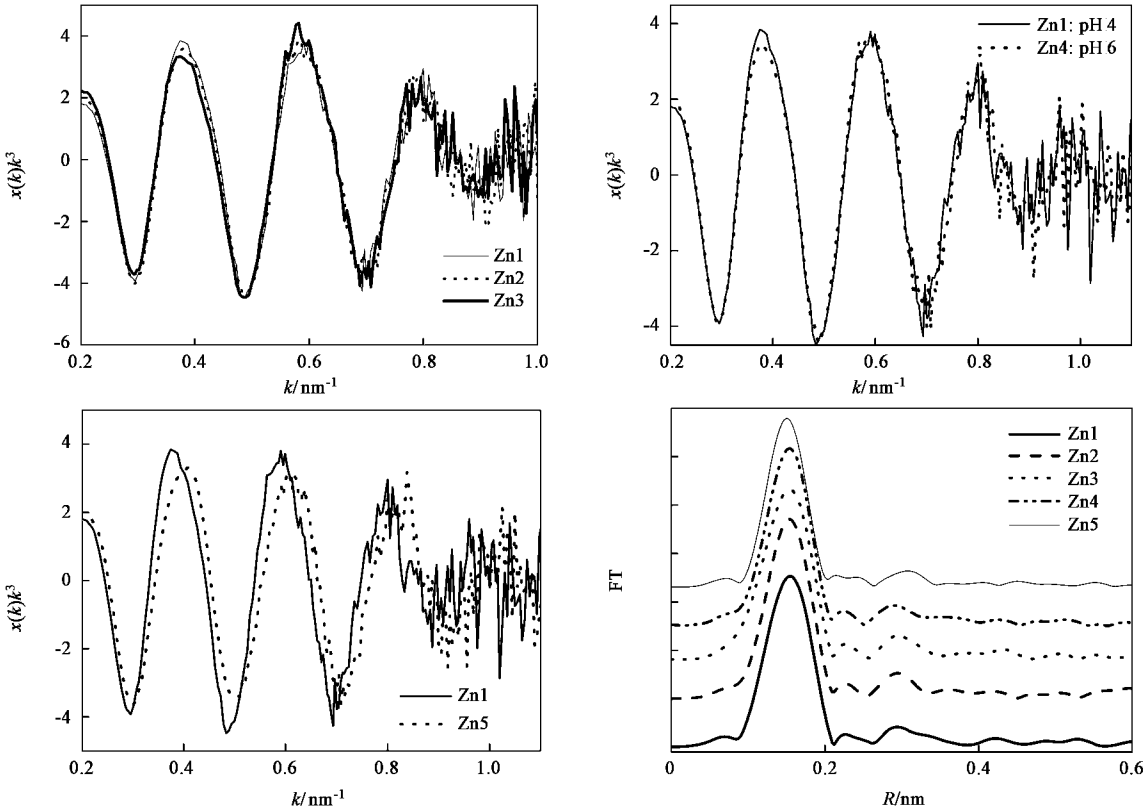


图 2 Zn-酵母吸附样品 Zn-K 边 EXAFS 谱(k^3 权重)以及相应的径向结构函数

Fig. 2 Normalized, background-subtracted k^3 -weighted EXAFS of Zn(II) adsorbed on the yeast and its corresponding radial distribution function obtained by Fourier transformation

Zn 具有 d^{10} 电子构型,化学键各向同性,多面体通常比较规则.因此,在一个给定的结构环境中,Zn-配体原子间距通常较为均匀.四配位的四面体以及六配位的八面体构型是 Zn(II)最常见的配位构型.考虑第一壳层,四面体构型 Zn—O₄ 与八面体构型 Zn—O₆ 明显不同.在典型的四面体构型(如 ZnO、Zn(OH)₂ 等)中 Zn—O 平均距离为 0.195 nm.而在一个典型的八面体构型(如 Zn 水合离子)中 Zn—O 平均距离为 0.210 nm. Zn—O 原子间距可以用来判定 Zn 的配位构型^[2].有报道,Zn 水合离子(Zn²⁺(aq))是八面体构型 Zn—O₆,不过由于 Zn 水合离子的四配位和六配位构型之间的能量差异小,暗示着 Zn 水

合离子配位灵活.在本实验条件下,硝酸锌水溶液(Zn 水合离子)与 Zn-酵母吸附样品的 EXAFS 谱比较,酵母样品的波矢 k 值明显高于 Zn 水合离子,即样品的 Zn—O 距离低于 Zn²⁺(aq).有报道指出,Zn²⁺(aq)中 Zn—O 距离值为 0.207 nm^[12] 和 0.2098 nm^[2].本实验测量值 Zn-酵母样品中的 Zn—O 距离(0.202 ~ 0.203 nm)比典型四面体构型固体 ZnO 中 Zn—O 原子间距(0.196 nm)长,比水合锌离子中的 Zn—O 原子间距短.

Toner 等^[13]认为第一配位层 Zn—O 距离 0.202 nm 是四面体和八面体以不同比例混合时的 Zn—O 平均距离.Sarret 等^[10]研究真菌细胞壁吸附 Zn,结果

表明,Zn 吸附量为 $7.6 \times 10^{-3} \sim 0.15 \text{ mmol/g}$ 时,Zn 主要以四面体构型与细胞壁表面磷酸基 PO_4 结合,在高浓度条件下(0.22 mmol/g)羧基 COO^- 还参与 Zn 的配位,但是其亲和力低,贡献率不超过 10%,说明六配位构型在 Zn-生物体表面较少,贡献率常不超过 10%. Kelly 等^[14]认为,当 Zn^{2+} 浓度在 0.25 mmol/L ~ 0.5 mmol/L 时,Zn 与植物 *Datura innoxia* 细胞中的 N/O 原子以四面体配位,平均距离 0.198 nm . Pokrovsky 等^[7]发现各类硅藻细胞表面吸附的 Zn 与 O 为四配位四面体构型,Zn—O 距离为 $(0.200 \pm 0.002) \text{ nm}$,与 1 个或 2 个羧酸盐形成单齿络合物,认为羧基是结合 Zn 的主要基团.潘纲等^[2]研究了 Zn(Ⅱ)在水锰矿($\gamma\text{-MnOOH}$)上的结构,证实在 $\text{pH} = 7.15$ 、 0.1 mol/L NaNO_3 介质、 25°C 条件下, Zn^{2+} 主要是通过共用水合 Zn^{2+} 的 O 原子及水锰矿表面上的 O 原子形成 Zn—O 键,平均 Zn—O 原子间距为 $0.1998 \pm 0.0010 \text{ nm}$ ($n = 3$),是六配位的 $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ 及其水解产物四配位的 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 或 $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$ 各以一定比例混合吸附于水锰矿表面而形成.

根据上述分析,可以初步判断本实验酵母吸附样品中,在第一配位层 Zn 与 O 相结合,Zn 的结构介于四配位的四面体与六配位的八面体之间,且以四配位体为主.

Zn^{2+} 初始浓度增加导致酵母细胞中 Zn 配位结构中 Zn—O 间距增加(从 0.202 nm 增加到 0.203 nm)、配位数下降(从 4.3 下降到 3.0)的趋势,与 Sarret 等^[10]利用真菌细胞壁吸附 Zn 离子的报道类似.

鲜酵母细胞吸附的 Zn(Zn—O 距离 0.197 nm)则几乎完全是四配位的,而且配位数(3.2)低于参照物氧化锌(ZnO)的配位数 4,认为是细胞复杂环境造成 Zn 局域结构的严重扭曲^[10],但体系对称性增加,无序度降低.

本实验结果显示,体系初始 pH 值升高(从 4 上升到 6)后,Zn—O 键长不变,但是导致 Zn—O 配位数下降(从 4.3 下降到 3.9),说明体系初始 pH 值对 Zn 局域结构仍然产生了某种影响.体系 pH 值增加可能导致形成 Zn 的水解产物单核或多核羟基络合物,甚至形成沉淀.在酸性条件下,溶液中的 Zn(Ⅱ)主要以六配位的 $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ 水合离子形式存在,当 $\text{pH} \geq 6$ 时, Zn^{2+} 极易水解,形成 $\text{Zn}(\text{OH})_n^{2-n}$ 一系列水解形式,如四配位的 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 或 $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$. 当 pH

值继续升高,又可能形成六配位的八面体沉淀.本实验中体系最终 pH 值分别达到 6.01、6.14.朱梦强等^[15]研究水锰矿吸附 Zn,认为 $\text{pH} = 7.0$ 时,Zn 以四面体或八面体吸附于水锰矿表面,在 $\text{pH} = 7.5$ 和 $\text{pH} = 8$ 时吸附于水锰矿表面的四面体又继续大量吸附溶液中的 Zn,形成了八面体和四面体混合的多核羟基表面沉淀结构,并以八面体占主要成分.pH 值增加,八面体比例下降,四面体比例升高,此时大量表面沉淀的 Zn 高层散射信号掩盖了表面吸附态的 Zn 信号,且配位数随着 pH 值增加而减小.而 Bochatay 等^[12]用 EXAFS 研究 pH 值对 Zn 在水锰矿上吸附的影响表明,随着体系 pH 值增加,吸附样品的 Zn—O 键长缩短(从 0.204 nm 下降到 0.196 nm),配位数降低(从 6 下降到 4),并且 Zn 的四配位构型比例增加.

从上面的讨论来看,配位数降低有利于吸附量的升高.与干酵母比较,可以认为鲜酵母更有利于吸附 Zn.

3 结论

利用扩展 X 射线吸收精细结构谱(EXAFS)技术研究了酵母细胞中吸附的重金属离子 Zn 的局域结构,表明 Zn 以四配位体和六配位体混合构型与酵母细胞表面结合,且以四配位体构型为主.Zn 的第一配位层 Zn—O 原子间距和配位数分别在 $0.197 \sim 0.203 \text{ nm}$ 和 $3.2 \sim 4.3$ 范围内.Zn(Ⅱ)初始浓度升高、初始 pH 值升高导致 Zn—O 配位数下降.活酵母细胞 Zn—O 配位数低于死酵母细胞,Zn—O 原子间距下降.

参考文献:

[1] Wang J L, Chen C. Biosorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae*: a review [J]. *Biotechnol Adv*, 2006, **24**(5):427-451.
[2] 潘纲,秦延文,李贤良,等.用 EXAFS 研究 Zn 在水锰矿上的吸附-解吸机理 [J]. *环境科学*. 2003, **24**(3):1-7.
[3] Fomina M, Charnock J, Bowen A D, et al. X-ray absorption spectroscopy (XAS) of toxic metal mineral transformations by fungi [J]. *Environ Microbiol*, 2007, **9**(2):308-321.
[4] 王其武,刘文汉. X 射线吸收精细结构及其应用 [M]. 北京:科学出版社,1994.103.
[5] Um W. Sorption mechanism and transport behavior of Sr(Ⅱ) and Pb(Ⅱ) on zeolitized tuffs from the Nevada test site [D]. Reno: Univeristy of Nevada, 2001.
[6] Boyanov M I, Kelly S D, Kemner K M, et al. Adsorption of cadmium to *Bacillus subtilis* bacterial cell walls: A pH-dependent X-ray absorption fine structure spectroscopy study [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 2003, **67**(18):3299-3311.
[7] Pokrovsky O S, Pokrovsky G S, Gelabert A, et al. Speciation of Zn

- associated with diatoms using X-ray absorption spectroscopy [J]. Environ Sci Technol, 2005, **39**(12):4490-4498.
- [8] Guine V, Spadini L, Sarret G, *et al.* Zinc sorption to three gram-negative bacteria: Combined titration, modeling, and EXAFS study [J]. Environ Sci Technol, 2006, **40**(6):1806-1813.
- [9] Parsons J G, Aldrich M V, Gardea-Torresdey J L. Environmental and biological application of extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) and X-ray absorption near edge structure (XANES) spectroscopies [J]. Appl Spectrosc Rev, 2002, **37**(2):187-222.
- [10] Sarret G, Manceau A, Spadini L, *et al.* Structural determination of Zn and Pb binding sites in *Penicillium chrysogenum* cell walls by EXAFS spectroscopy [J]. Environ Sci Technol, 1998, **32**(11):1648-1655.
- [11] 陈灿,王建龙.酿酒酵母吸 Zn^{2+} 的特性及其动力学研究 [J]. 清华大学学报(自然科学版), 2006, **46**(12): 30-33.
- [12] Bochatay L, Persson P. Metal ion coordination at the water-manganite (γ - $MnOOH$) interface II. An EXAFS study of zinc(II) [J]. J Colloid Interface Sci, 2000, **229**(2):593-599.
- [13] Toner B, Manceau A, Webb S M, *et al.* Zinc sorption to biogenic hexagonal-birnessite particles within a hydrated bacterial biofilm [J]. Geochim Cosmochim Acta, 2006, **70**(1):27-43.
- [14] Kelly R A, Andrews J C, DeWitt J G. An X-ray absorption spectroscopic investigation of the nature of the zinc complex accumulated in *Datura innoxia* plant tissue culture [J]. Microchem J, 2002, **71**(2-3):231-245.
- [15] 朱孟强,潘纲,李贤良,等. EXAFS 研究不同酸度下 Zn^{2+} 在水锰矿表面的吸附和沉淀 [J]. 物理化学学报, 2005, **21**(10):1169-1173.