

# 光谱法研究酵母菌对铜离子的吸附机理

韩润平, 杨贯羽, 张敬华, 鲍改玲, 石杰

郑州大学化学系, 河南 郑州 450052

**摘要** 采用 AAS, FTIR, SEM/EDS 等方法研究了啤酒酵母对铜离子的吸附作用。酵母菌经丙酮和 NaOH 处理后对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附量明显增加, 而将羧基酯化和将氨基甲基化使得酵母菌对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附能力显著降低。化学修饰与酵母菌对  $\text{Cu}^{2+}$  吸附的吸附结果表明, 细胞壁上的羧基、氨基在酵母菌吸附铜时起着重要的作用。红外光谱表明, 酵母菌表面有结合金属的官能团, 如羟基、羧基、氨基等, 吸附  $\text{Cu}^{2+}$  后,  $3\ 392\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰紫移至  $3\ 404, 1\ 405\ \text{cm}^{-1}$  处的峰红移到  $1\ 383\ \text{cm}^{-1}$ , 细胞的主要成分和结构保持完整。SEM/EDS 分析表明, 吸附后酵母菌表面变化不大, 酵母菌仅结合少量  $\text{Cu}^{2+}$ 。

**主题词** 光谱法; 吸附; 酵母; 铜离子

**中图分类号**: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2006)12-2334-04

## 引言

生物材料可用于去除或回收环境中的重金属, 因其来源广, 价廉, 大量存在的常见离子如  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Cl}^-$  等对吸附影响很小, 用于去除水体中的重金属有经济的、环境的意义<sup>[1, 2]</sup>。啤酒酵母作为发酵的副产物, 对重金属有好的吸附作用<sup>[3, 4]</sup>。化学修饰技术在表示官能团结合金属的特征方面有很大的应用价值<sup>[5-7]</sup>。原子吸收光谱在测定重金属时灵敏度高, 测定方法简单, 红外光谱在鉴定官能团存在与否及推断重金属的吸附机理等方面起重要作用<sup>[8-10]</sup>。扫描电镜技术可用于判断表面的状态及表面元素构成。

本文利用红外光谱和扫描电镜技术对酵母菌吸附  $\text{Cu}^{2+}$  前后进行了表征和比较, 测定了化学修饰后酵母菌对铜的吸附量, 并初步探讨了酵母菌吸附  $\text{Cu}^{2+}$  的机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器和试剂

AAAnalyst300 型火焰原子吸收分光光度计 (Perkin-Elmer), 傅里叶-红外光谱仪 (PE-1710 FTIR), 扫描电子显微镜/X 射线能量色散分析仪 JEOL 6335F-SEM/JEOL (JSM-5600-OXFORD EDS), SHZ-82 型水浴恒温振荡器 (江苏太仓医疗器械厂), 800 型离心机 (上海手术器械厂)。

无水甲醇, 浓盐酸, 甲醛, 硝酸铜, 丙酮等, 均为分析

纯。

### 1.2 啤酒酵母的预处理和化学处理

**酸洗啤酒酵母**: 将啤酒酵母 (取自奥克啤酒厂) 经  $4.5\ \mu\text{m}$  微孔滤膜抽滤, 先用去离子水洗一次, 然后用 1% 盐酸溶液洗, 再用去离子水洗去营养离子, 于烘箱中  $60\ ^\circ\text{C}$  烘 2 h, 取出放在冰箱中备用。

**丙酮处理酵母**: 将酸洗酵母菌用丙酮浸泡 24 h 后, 再用去离子水洗去丙酮, 放于恒温箱中  $60\ ^\circ\text{C}$  烘干。丙酮处理主要是溶解细胞内的有机物质, 获得酵母菌的细胞壁<sup>[11]</sup>。

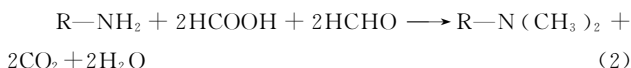
**氢氧化钠处理酵母**: 将酸洗酵母菌用  $0.1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 浸泡酵母菌 24 h, 再用去离子水洗去多余的 NaOH, 放于恒温箱中  $60\ ^\circ\text{C}$  烘干。经过 NaOH 处理后, 可以使酵母菌上的酯基发生碱性水解, 水解出羧基和羟基。

**羧基酯化**: 将酸洗过的酵母菌用甲醇和盐酸进行酯化 24 h。再用去离子水洗掉未反应完全的甲醇和盐酸, 放于恒温箱中  $60\ ^\circ\text{C}$  烘干。处理过程中发生的化学反应为



所以经过酯化处理, 酵母菌细胞壁上的羧基将会减少, 变为酯基。

**氨基甲基化**: 把用去离子水洗过的酵母菌, 用甲酸和甲醛浸泡搅拌 24 h, 其反应方程式为



待反应完全后, 再用去离子水洗去过量的甲酸和甲醛。

收稿日期: 2005-08-30, 修订日期: 2005-11-28

基金项目: 河南省科技攻关项目 (981160416, 012409041) 资助

作者简介: 韩润平, 1967 年生, 郑州大学化学系副教授, 博士

用此方法处理后,酵母菌上的 $-\text{NH}_2$ 被掩盖,即 2 个 H 原子被 2 个 $-\text{NH}_2$ 取代。

### 1.3 原子吸收法测定修饰前后酵母菌对铜的吸附

称取一定质量的酵母菌于 50 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 不同浓度的 $\text{Cu}^{2+}$ 溶液,振荡后取部分溶液离心,测定上清液中 $\text{Cu}^{2+}$ 的浓度,并依下式计算酵母菌的吸附量

$$q = (c_0V_0 - cV) \times 10^{-3} / m$$

式中, $c_0$ 为加入的 $\text{Cu}^{2+}$ 标准溶液的浓度( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $V_0$ 为标准溶液的体积(mL), $c$ 为吸附达平衡后溶液中 $\text{Cu}^{2+}$ 的浓度( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $V$ 为进行吸附时溶液的体积(mL), $m$ 为发生吸附时酵母菌的质量(g), $q$ 为吸附量( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ),即单位质量的酵母菌吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的量。

### 1.4 火焰原子吸收光度法测定 $\text{Cu}^{2+}$ 的条件

波长 234.8 nm,灯电流 15 mA,光谱通带 0.7 nm,乙炔流量  $1.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,空气流量  $7.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,线性范围  $0.05 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 1.5 酵母菌的表征方法

分别对吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 前后的酵母菌进行红外光谱分析和扫描电镜和 X 射线能量色散分析仪(SEM/EDS)。

AAS(原子吸收光度法)用于测定吸附前后溶液中的 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度,FTIR 用于研究酵母菌表面的化学官能团,SEM/EDS 用于测定酵母菌细胞表面形态和判断细胞壁的元素构成。

## 2 结果和讨论

### 2.1 化学修饰与酵母菌对铜的吸附作用

酵母菌能吸附重金属离子,主要是因为其细胞壁上含有一些能结合金属离子的基团,如羧基,羟基和氨基等。为了提高吸附效率和选择性,鉴定吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的官能团非常重要。为了研究是哪些官能团参与了酵母菌的吸附,并进一步探讨酵母菌对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附机理,采用碱性水解、酯化、丙酮处理、掩蔽氨基等不同的化学方法对酵母菌进行了修饰处理<sup>[6,7]</sup>,研究其对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附作用,实验结果见图 1。

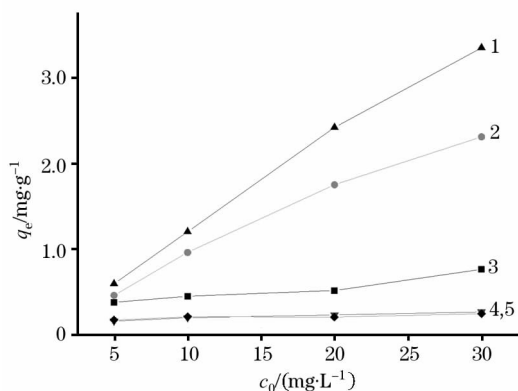


Fig. 1 Adsorbing quantity at different initial  $\text{Cu}^{2+}$  concentration by various modified yeasts

1: NaOH; 2: Acetone; 3: HCl;  
4, 5:  $\text{CH}_3\text{OH} + \text{HCl}$ ,  $\text{HCOOH} + \text{HCHO}$

以酸化酵母菌对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附量作为参照,由图 1 发现:

(1)酵母菌经丙酮处理后,吸附效果明显提高。将酵母菌浸泡于丙酮中后,能对酵母菌的细胞壁浓缩提取,使得单位质量的吸附剂中细胞壁的含量增高。而实验结果表明吸附剂的吸附能力大大提高,说明了细胞壁对酵母菌吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 起着重要的作用。

(2)酵母菌用氢氧化钠处理后,吸附量也是明显增大。在碱性条件下,有机化合物中的酰胺键及酯键发生水解,水解出氨基、羟基和羧基等。酵母菌用氢氧化钠处理后,吸附能力也大大提高了,说明经碱处理后,细胞表面结合 $\text{Cu}^{2+}$ 的官能团或活性吸附点的数量增加。

(3)将酵母菌进行酯化处理后,吸附量明显下降。酵母菌细胞壁上的羧基将会被掩蔽,而酯对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附能力远小于羧基,因此引起吸附量降低,说明了羧基在酵母菌吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的过程中有着重要的作用。

通过酸度对吸附的影响研究表明,pH 小于 3 时,酵母菌对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附量显著降低,说明酸度低时, $\text{H}^+$ 在与 $\text{Cu}^{2+}$ 竞争时占优势,引起吸附量下降。该结果说明酵母菌吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的机理之一为离子交换。但是在 pH 为 1 时(此时氨基将质子化),尽管酵母菌的吸附量下降,但其吸附量不为零,说明 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附还有其他机理<sup>[4]</sup>。

(4)将酵母菌细胞壁上的氨基甲基化后,由反应方程式(2)可以看到,酵母菌细胞壁上氨基( $-\text{NH}_2$ )中的两个氢原子被甲基替代,使得酵母菌的吸附量也是明显降低,吸附量与酯化后的相当。这就证明在酵母菌吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 时,可能与氨基与络合,参与了吸附过程。氨基上的氮原子有孤对电子,而过渡金属离子如 $\text{Cu}^{2+}$ 有空轨道,能形成配位键,同时又是软酸或交界酸,容易形成共价化合物,因此络合作用也是酵母菌吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的机理之一。

### 2.2 酵母菌吸附铜前后红外光谱的比较

吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 前后的酵母菌的红外光谱图如图 2 所示。

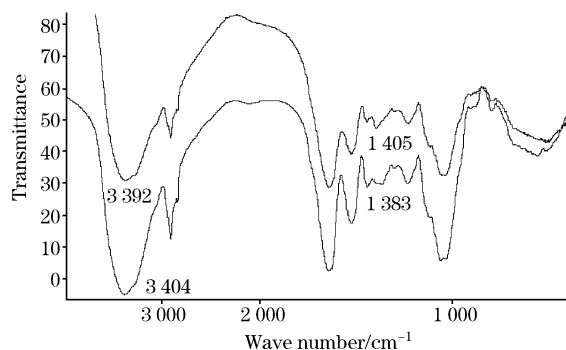


Fig. 2 FTIR spectra of acidic washed yeast(up) and copper loaded yeast(down)

啤酒酵母直径  $1 \sim 5 \mu\text{m}$ ,长度  $5 \sim 30 \mu\text{m}$ ,其细胞壁含有葡聚糖、甘露醇糖、蛋白质及脂类。啤酒酵母还含有几丁质(N-乙酰葡萄糖胺,以 1,4 葡萄糖苷键连接的多聚体)<sup>[12]</sup>。由图 2 可以看出其红外光谱图非常复杂,说明了酵母菌组成的复杂性。在整个波数范围内均有明显的吸收,使得某些峰未能表现出来,一些不太灵敏的吸收峰被掩盖。酵母菌的红外

光谱图主要由几丁质 (Chitin) 的羟基和仲胺 ( $\text{RNHCOCH}_3$ ) 中 N—H 的伸缩振动峰 ( $3\ 391\ \text{cm}^{-1}$ )、蛋白质的特征吸收峰 ( $1\ 652, 1\ 539, 1\ 237\ \text{cm}^{-1}$ )、甲基和亚甲基的吸收峰 ( $2\ 926, 1\ 456\ \text{cm}^{-1}$ ) 啤酒酵母中的 RNA, DNA 或细胞壁中存在的碳水化合物或醇中的 C—O 伸缩振动峰 ( $1\ 073\ \text{cm}^{-1}$ ) 组成<sup>[10]</sup>。研究表明, 酵母菌经酯化后, 酯羰基 ( $1\ 744\ \text{cm}^{-1}$ ) 和甲氧基 ( $1\ 454\ \text{cm}^{-1}$ ) 的吸收程度增加, 在  $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收减小, 说明用盐酸-甲醇处理酵母菌发生了羧基的酯化反应<sup>[10]</sup>。

红外光谱分析可用于确定生物吸附的官能团, 酵母菌吸附  $\text{Cu}^{2+}$  后, 羧基的 C—O 伸缩振动峰发生位移, 由  $1\ 405\ \text{cm}^{-1}$  移至  $1\ 383\ \text{cm}^{-1}$ , 强度减弱。这种位移归属于与羧基阴离子结合的阳离子的不同。羟基或氨基的伸缩振动峰由  $3\ 392\ \text{cm}^{-1}$  移至  $3\ 404\ \text{cm}^{-1}$ , 相对于  $1\ 652\ \text{cm}^{-1}$  处的蛋白质的特征峰强度, 吸附  $\text{Cu}^{2+}$  后  $3\ 404\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收强度增加, 可能是由于部分羟基或氨基参与了吸附, 使得形成的氢键部分断开, 引起伸缩振动最大峰位移。这 2 种位移说明在吸附重金属离子时, 羟基, 氨基和羧基参与了吸附作用。

蛋白质的 2 个强吸收峰 ( $1\ 652, 1\ 539\ \text{cm}^{-1}$ ) 及碳水化合物的某些吸收峰, 在吸附  $\text{Cu}^{2+}$  前后其相对强度几乎未受影

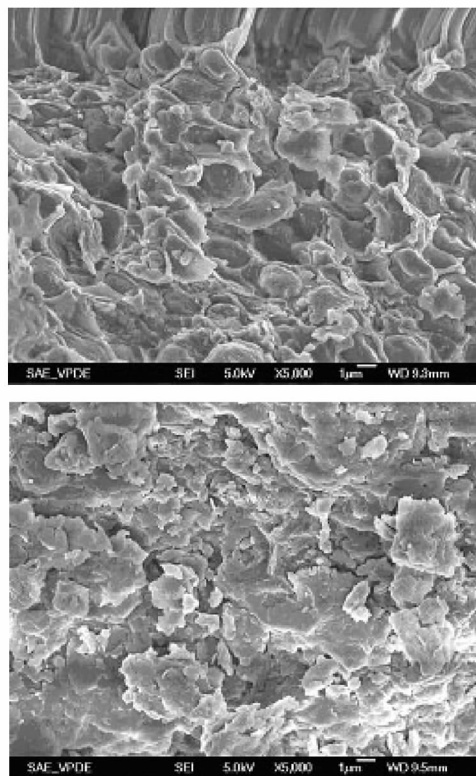


Fig. 3 Yeast cell wall before (up panel) and after (down panel)  $\text{Cu}^{2+}$  adsorption from aqueous solution (original magnification: 5 000)

响, 表明吸附  $\text{Cu}^{2+}$  后酵母菌的主要成份和结构仍保持完整。

### 2.3 酵母菌的 SEM-EDS 分析

图 3 为吸附  $\text{Cu}^{2+}$  前后酵母菌的 SEM, 图 4 为吸附  $\text{Cu}^{2+}$  后酵母菌的 EDS 图。

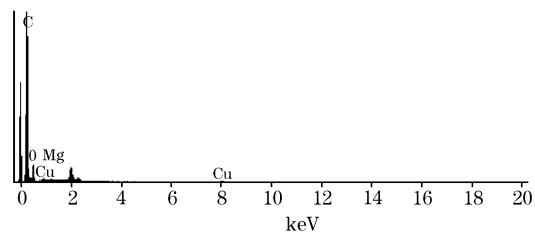


Fig. 4 SEM/EDS spectrum of yeast with adsorbed copper ion

由图 3 看出, 酵母菌表面不平整, 表面积较大, 可以作为吸附剂。比较吸附  $\text{Cu}^{2+}$  前后的 SEM, 两者无明显区别, 可能是因为酵母菌的吸附量不大, 没有引起酵母菌表面发生明显的状态改变。Raize 研究海洋藻类对金属离子的吸附时, 通过 SEM 发现吸附重金属离子后, 藻类细胞萎缩, 边缘拉直, 原因可能是由于藻类细胞的吸附能力较大<sup>[13]</sup>。

由图 4 看出, 酵母菌表面主要组成元素为碳氧镁 (EDS 仅测定原子序数大于 11 的元素)。尽管酵母菌经过了酸洗, 但由图 4 看出, 其表面仍有 Mg 存在, 说明 Mg 作为酵母菌生长所需的营养元素, 一部分作为酶或其他组成的组成部分, 使得酸洗并不能将这部分 Mg 洗出。EDS 分析表明, 酵母菌表面结合有少量的 Cu, 这与表 1 中酵母菌对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附量较小的结果一致。

### 2.4 吸附机理的探讨

微生物结构的复杂性致使其有多种吸附  $\text{Cu}^{2+}$  的途径。死体生物材料吸附重金属的机理包括沉淀, 物理吸附, 离子交换和络合作用<sup>[1, 2]</sup>。死细胞结合  $\text{Cu}^{2+}$  主要由生物材料上的基团, 尤其是占细胞干重比例较大的细胞壁上的官能团的作用。掩蔽羧基和氨基均使得生物吸附量显著下降<sup>[6, 7]</sup>, 说明氨基和羧基在酵母菌吸附  $\text{Cu}^{2+}$  时起着重要作用。离子强度和酸度对吸附的影响说明, 离子交换和络合作用是酵母菌吸附重金属的主要方式<sup>[3, 5]</sup>。在生物吸附过程中, 也存在着物理吸附作用<sup>[9]</sup>。

## 3 结 论

化学修饰与酵母菌的吸附结果表明, 羧基、氨基、羟基在吸附  $\text{Cu}^{2+}$  时起着重要作用。酵母菌的红外光谱图主要有羟基峰, 羰基峰和蛋白质的吸收峰组成。吸附  $\text{Cu}^{2+}$  后, 其酵母菌的结构仍保持相对完整。SEM/EDS 分析表明, 酵母菌表面粗糙, 主要组成元素为碳和氧。最后对生物吸附的机理进行了初步探讨。

## 参 考 文 献

- [1] Drake L R, Rayson G D. *Analytical Chemistry*, 1996, 68 : 22.
- [2] HAN Run-ping, SHI Jie, LI Jian-jun, et al(韩润平, 石 杰, 李建军, 等). *Chinese Chemistry Bulletin(化学通报)*, 2000, 63(7): 25.
- [3] HAN Run-ping, ZHU Lu, YIN Jian-si, et al(韩润平, 朱 路, 尹建四, 等). *Journal of Zhengzhou University(Natural Science)(郑州大学学报·自然科学版)*, 1999, 31(1): 71.
- [4] SHI Jie, ZHANG Jing-hua, ZHU Lu, et al(石 杰, 张敬华, 朱 路, 等). *Journal of Zhengzhou Institute of Technology(郑州工程学院学报)*, 2004, 25(3): 49.
- [5] HAN Run-ping, LI Jian-jun, YANG Guan-yu, et al(韩润平, 李建军, 杨贯羽, 等). *Journal of Zhengzhou University(Natural Science)(郑州大学学报·自然科学版)*, 2000, 32(3): 72.
- [6] Kapoor A, Viraraghavan T. *Bioresource Technology*, 1997, 61(3): 221.
- [7] Lin S, Rayson G D. *Environmental Science and Technology*, 1998, 32(10): 1488.
- [8] Foust E, Volesky B. *Environmental Science and Technology*, 1996, 30(1): 277.
- [9] HAN Run-ping, LI Jian-jun, YANG Guan-yu, et al(韩润平, 李建军, 杨贯羽, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2000, 20(4): 489.
- [10] HAN Run-ping, BAO Gai-ling, ZHU Lu(韩润平, 鲍改玲, 朱 路). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(7): 820.
- [11] Ashhenazy R, Gottlibz L, Yannai S. *Biotechnology and Bioengineering*, 1977, 55(1): 1.
- [12] HU Jia-jun, ZHOU Qun-ying(胡家骏, 周群英). *Environmental Engineering and Microbiology(环境工程微生物学)*. Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 1988. 48.
- [13] Raize O, Argaman Y, Yannai S. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 87(4) : 451.

## Study on Mechanism of Beer Yeast Adsorbing Copper Ion by Spectroscopy

HAN Run-ping, YANG Guan-yu, ZHANG Jing-hua, BAO Gai-ling, SHI Jie  
Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

**Abstract** Copper ions adsorption by beer yeast was studied by AAS, FTIR, SEM/EDS etc. The quantity of copper biosorption by NaOH-treated yeast and acetone-treated yeast increased significantly, while the esterification of carboxylate functionalities and the methylation of amino group presented in the cell walls of yeast resulted in a marked decrease in copper adsorption. These results show that amino and carboxylate groups in yeast cell wall play a great role in binding copper. According to IR spectra, the dominating bands near 1 652, 1 539 and 1 237  $\text{cm}^{-1}$  are assigned to amide I, amide II and amide III, the characteristic IR absorption of protein which could be one of the significant components of cell walls. The peak near 1 456  $\text{cm}^{-1}$  is attributable to the bending stretching of  $\text{CH}_2-$  and  $\text{CH}_3-$ . The changes in the spectra of the copper-exposed yeast biomass were in the stretch of hydroxyl groups or amino groups, which shifted from 3 392 to 3 404  $\text{cm}^{-1}$ , and in the symmetrical stretch of carboxylate groups, which shifted from 1 405 to 1 383  $\text{cm}^{-1}$ . The components and structure of the exposed-copper biomass remain intact. SEM/EDS analysis shows that the main elements of beer yeast are carbon, oxygen, and magnesium, while the surface of yeast is rough, and the copper-loaded yeast only binds little copper.

**Keywords** Spectroscopy; Adsorption; Beer yeast; Copper ion

(Received Aug. 30, 2005; accepted Nov. 28, 2005)