

姚成立,金涛,田宁宁. 酵母细胞表面上无机壳层的制备[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):44-46.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.014

# 酵母细胞表面上无机壳层的制备

姚成立,金涛,田宁宁

(合肥师范学院化学与化学工程学院,安徽合肥 230601)

**摘要:**分别介绍了在酵母细胞的有氧呼吸过程中制备碳酸钙外壳以及通过 LBL 自组装方式结合维生素 C 的还原作用制备银质外壳。结果表明,上述 2 种方式能有效防止酵母被化学试剂毒害,为未来的功能细胞研究奠定基础。

**关键词:**酵母;细胞壳;自组装;碳酸钙;银质外壳;制备

**中图分类号:** Q813 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0044-03

细胞壳具备“外衣”功能在自然界并不少见,禽蛋、蚕茧和硅藻等皆属于有壳保护的细胞。蚕茧在蚕蛹的生长发育过程中抵御外界机械压力、毒性物质和天敌的攻击,传递蚕蛹的生命周期信息。蛋壳为胚胎发育提供了机械支持,并且维持它的生物活性。在硅藻和放射目的生物中,细胞壁外面密集排列的囊泡阵列,连续的硅骨架就在囊泡泡沫周围的膜边界成核,在硅藻细胞进入休眠期时为其提供保护外界的环境侵扰。若能以有壳细胞为启示,通过为活细胞人工制造壳结构来改进细胞固有的性质和功能,会是一个极大的挑战。与单细胞生物不同,真核细胞往往是被复杂的细胞外基质包裹和支持着,缺乏外壳的保护。目前的研究结果表明,通过生物硅化法、水凝胶法、聚电解质法 LBL 技术、静电匹配直接沉淀法给真核细胞做外衣技术也已经有了可能,而且这些外衣为细胞的储存、抵御有毒有害抗紫外线的能力大大加强。聚电解质法和静电匹配法在构建细胞外壳时,是基于金属纳米粒子或者金属离子与细胞表面的官能团—COOH 或—NH<sub>2</sub> 相互作用,在经化学修饰后表面具备异种电荷的细胞表面产生吸附作用<sup>[1-2]</sup>。目前使用经聚合物分散稳定的磁性纳米粒子,成功在酵母<sup>[3-6]</sup>、细菌、微藻类、霉菌<sup>[7]</sup>的外表面上包裹上均匀 PAH-四氧化三铁纳米粒子单层,这些磁性纳米粒子在蛋白质分离、细胞收集、药物缓释等方面具有广泛的潜力<sup>[8]</sup>。在酵母等细胞上已经成功地裹上了碳酸钙<sup>[9-11]</sup>,碳酸钙微壳(球霰石)直接沉积到酵母表面发生在沉淀过程中的 Ca<sup>2+</sup> 和 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 相遇在水溶液中的几分钟之内,所得到的核-壳“无机物@细胞”结构在水溶液中是稳定的,并且可以被存储为几个月,同时保留了细胞的生存能力。非常有趣的是,随着酵母细胞的不断分裂,体系中球霰石通过重结晶最终形成较大的方解石微粒。磷酸钙壳通过 LbL 方式在酵母细胞的表面形成聚电解质壳,随后在对细胞的钙与磷酸盐原位矿化。这种方式是通过聚电解质壳静电吸引 Ca<sup>2+</sup>,接着形成无定形磷酸

钙结构层,即相对厚约 1 mm 的矿物层<sup>[12]</sup>。此外,SiO<sub>2</sub><sup>[13]</sup>、聚多巴胺<sup>[14]</sup>、TiO<sub>2</sub><sup>[15]</sup>、氧化石墨烯<sup>[16]</sup>等细胞外壳液相继制备,上述壳化细胞在细胞储存、细胞保护、细胞输送以及细胞治疗等方面具有广阔的应用前景,细胞壳化为调控和功能化细胞提供了一条行之有效的思路和策略。但上述合成方法都比较繁琐,过多采用化学试剂不可避免会对酵母细胞产生毒害,从而降低试验的成功概率。本研究介绍了通过酵母细胞的有氧呼吸产生 CO<sub>2</sub> 为碳源制备碳酸钙外壳,以及在维生素 C 的还原作用下制备银质细胞外壳。试验结果表明,通过酵母自身的呼吸来提供碳源以及维生素 C 的还原作用降低了外在的化学毒素对细胞毒害的可能,为未来大量制备无机壳化的细胞提供了可能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

酵母(Yeast,湖北安琪酵母有限公司);氯化钙(分析纯)、氯化钠(分析纯)、无水乙醇(分析纯)、浓氨水(分析纯)、维生素 C(分析纯)、硝酸银(分析纯)、磷酸酸钠(PTA,分析纯)、聚二烯基丙二甲基氯化铵(PDADMAC,分析纯)、葡萄糖(生化试剂)、蛋白胨(生化试剂),均购自国药集团上海化学试剂有限公司,试验用水全部为无菌水。红外光谱用 Nicolet870 傅立叶红外光谱仪测试,KBr 压片(扫描范围 4 000~400 cm<sup>-1</sup>,扫描 32 次,分辨率 4 cm<sup>-1</sup>),微观粒子形貌在日本日立 S-4800 或 1510 扫描电子显微镜上完成,离心工作在低速台式离心机(TDL-50C)上完成。

### 1.2 酵母细胞的培养

从市场购买的干酵母粉用无菌水溶解,在合适的温度和营养下激活细胞,具体操作如下:在恒温 30 ℃、转速为 220 r/min 的摇床中培养,培养液为 YPD 培养基(2% 蛋白胨、1% 酵母粉悬浮液,2% 葡萄糖)。经过 12 h 的指数生长期之后,酵母细胞被离心收集(1 500 g)并用 0.15 mol/L 氯化钠溶液清洗。

### 1.3 酵母细胞诱导碳酸钙的制备

取 2 mL 酵母悬浮液和葡萄糖于 250 mL 经无菌处理过三角烧瓶中,快速倒入 50 mL 0.05 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液中,同时加入一定量的氨水,调节 pH 值至微碱性,搅拌 30 min,通入一定量的 O<sub>2</sub> 后用保鲜膜将三角瓶瓶口扎紧,置于恒温 30 ℃、转

收稿日期:2014-05-02

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划(编号:201314098038);  
合肥师范学院校级科研项目(编号:2014cxy25)。

作者简介:姚成立(1975—),男,安徽枞阳人,硕士,高级实验师,主要从事生物无机化学研究。Tel:(0551) 63674145;E-mail:yaochen-gli@hftc.edu.cn。

速 220 r/min 的摇床上,经 48 h 呼吸作用后离心,收集三角瓶中的沉淀物,分别用去离子水和无水乙醇各洗涤 3 次,真空干燥 6 h,再将固样放在马弗炉中 400 ℃ 下焚烧,收集白色粉末,待测。

#### 1.4 酵母细胞银质壳的制备

取 1 mL 酵母悬浮液并分散在 1 mg/mL PDADMAC 溶液中,置于恒温 30 ℃、转速 220 r/min 的摇床上摇晃 15 min,然后在 2 000 r/min 下离心 2 min,收集沉淀,弃除多余的 PDADMAC,接着用无菌水洗涤沉淀细胞 2 次;再将洗涤后的酵母细胞分散于 1 mg/mL 磷酸溶液中,接下来的操作过程如前所述,共循环 3 次,形成 Yeast/PDADMAC/PTA 自组装包裹结构;再将上述包裹结构分散于 0.05 mol/L  $\text{AgNO}_3$  溶液中,在摇床上摇晃 15 min,添加 0.05 mol/L 维生素 C 溶液,继续摇晃 15~30 min,在转速 2 000 r/min 下离心 2 min,收集沉淀待测。

## 2 结果与分析

由图 1 可以清楚地看到试验酵母的细胞形态,菌落表面光滑。酵母细胞的形态有很多种,最常见的有球形、卵圆形、腊肠形、椭球形、柠檬形或藕节形等。酵母菌为生物体,在自然状态下会因脱水而收缩变形,从图 1 可以看出酵母细胞发

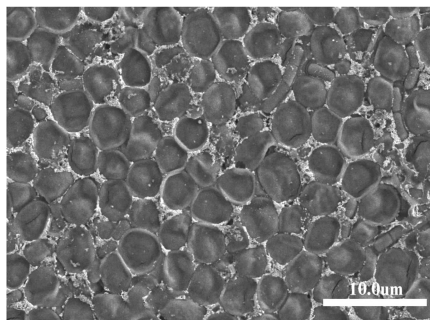
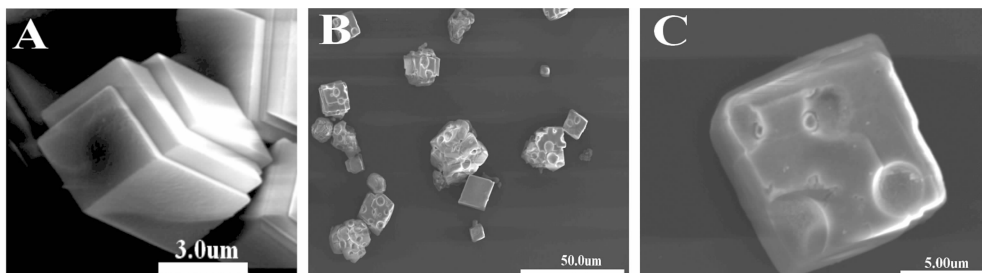


图1 自然风干条件下的酵母扫描电镜图示

生了脱水现象。

图 2-A 是在纯水中制备的碳酸钙,它和文献[17]中的报道一致,是立方体形且稳定性最大的方解石。图 2-B、图 2-C 是在酵母细胞有氧呼吸的条件下制备的碳酸钙固体经 400 ℃ 焚烧后得到的固样,从形貌可以看出,碳酸钙在结晶时基本上还是生成稳定的方解石晶型,但是碳酸钙颗粒表面多处含有直径为 1.5~2.0 μm 的孔洞,初步推测这些孔洞是由于酵母细胞镶嵌在碳酸钙粒子中,经高温焚烧后挥发后形成的,尤其是图 2-C 的右上角出现管道式的孔洞,可以证明酵母被完全埋在碳酸钙粒子中。



A—在纯水中制备的碳酸钙; B、C—在在酵母细胞有氧呼吸的条件下制备的碳酸钙固体经 400 ℃ 焚烧后得到的固样

图2 不同条件下制备的碳酸钙扫描电镜图示

为了探究功能化细胞中碳酸钙与酵母细胞的相互作用,笔者又进行了红外光谱测试,结果见图 3。从图 3 可以看出,在 712、874  $\text{cm}^{-1}$  处都有明显的碳酸钙的红外吸收特征峰,这是由碳酸钙中  $\text{CO}_3^{2-}$  的面内弯曲振动峰和面外弯曲振动峰引起的,红外吸收测试的结果与方解石型碳酸钙的红外吸收峰吻合,而且焚烧后的碳酸钙固体颗粒中已不存在有机质。

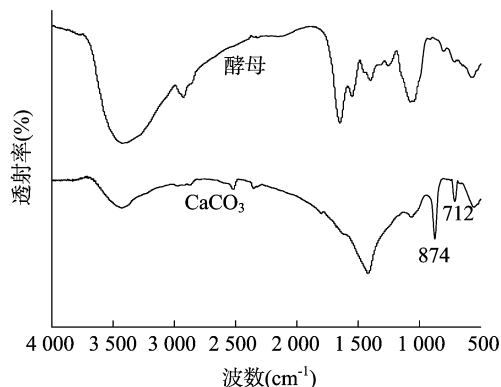


图3 纯酵母细胞与焚烧后碳酸钙的红外图谱

图 4 是经 PDADMAC/PTA 自组装包裹后在维生素 C 还

原作用下,银粒子包裹在酵母细胞表面的扫描电镜图片。图 4-A 是在摇床上摇晃 15 min 后的酵母细胞表面反应的,可以看出经过几次循环后,酵母细胞未出现死亡、干瘪现象,个体细胞仍旧饱满。随着时间的推移,继续摇晃,当达到 30 min 时,细胞表面形成了光滑的、有细小颗粒组成的致密外壳(图 4-B)。

为了确定所看到的外壳结构的元素成分,对图 4-B 所示部分进行 EDX 能谱分析,结果如图 5 所示。由图 5 可以看出 P、W、O、C、Ag 等元素的存在,这些元素应该分别来自于磷酸盐、银单质,其中 C 既有可能来自于 PAH 聚电解质层,也有可能来自于酵母及其培养基的本身,少量其他元素的干扰应该是离心后酵母培养基引入的。

## 3 结论

酵母细胞壁主要由一些多聚糖如葡萄糖、甘露糖和乙酰氨基葡萄糖组成,因此很难直接诱导物质在细胞外面直接生成,这就需要对酵母细胞的外围作相应的修饰来引导目标产物的生成。试验中得到含碳酸钙功能化细胞的可能机理是:由于酵母细胞在一定浓度的葡萄糖溶液中复苏后,在有氧条件下,酵母将葡萄糖经有氧呼吸(糖酵解→三羧酸循环)代谢

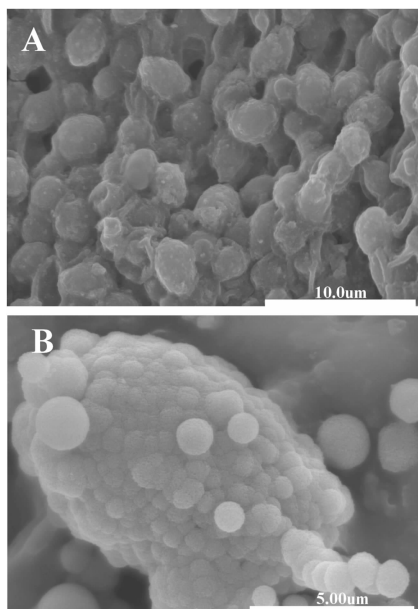


图4 银质壳酵母细胞扫描电镜图示

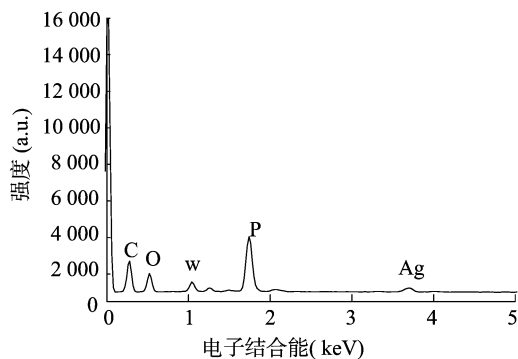


图5 银质酵母外壳的 EDX 能谱

生成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ 。在有氧条件下,酵母菌往往能够迅速出芽繁殖,同时富含糖羟基的细胞壁也能吸附一定量的  $\text{Ca}^{2+}$  且也会有部分  $\text{Ca}^{2+}$  进入细胞内部,由呼吸作用产生的  $\text{CO}_2$  会在细胞内部转变成  $\text{CO}_3^{2-}$ ,可以与细胞内外的  $\text{Ca}^{2+}$  相互反应得到  $\text{CaCO}_3$  晶体。在制备银质细胞壳的过程中带正电荷的聚合物聚二烯基丙二甲基氯化铵首先和带负电荷的细胞壁静电吸引,先形成正电荷的外壁,接着再次吸附带负电荷的磷钨酸,数次循环后,修饰层表面大量的电荷也促使更多的银离子与细胞表面结合,在维生素 C 以及磷钨酸的还原作用下于细胞外围得到 1 层包裹比较严密的银质壳层。类似于此类的处理,可以让酵母细胞外围的人工壳在对具有生命活性的细胞进行贮存、保护、运输以及修饰等方面有很大的应用潜能,同时多孔碳酸钙在药物缓释方面将会有一定的应用潜能。

#### 参考文献:

[1] Fakhru'llin R F, Zamaleeva A I, Minullina R T, et al. Cyborg cells: functionalisation of living cells with polymers and nanomaterials[J].

Chemical Society Reviews, 2012, 41(11): 4189–4206.

- [2] Fakhru'llin R F, Zamaleeva A I, Morozov M V, et al. Living fungi cells encapsulated in polyelectrolyte shells doped with metal nanoparticles [J]. Langmuir, 2009, 25(8): 4628–4634.
- [3] Garcia – Alonso J, Fakhru'llin R F, Paunov V N, et al. Microscreening toxicity system based on living magnetic yeast and gradient chips[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 400(4): 1009–1013.
- [4] Fakhru'llin R F, Garcia – Alonso J, Paunov V N. A direct technique for preparation of magnetically functionalised living yeast cells[J]. Soft Matter, 2010, 6(2): 391–397.
- [5] Garcia – Alonso J, Fakhru'llin R F, Paunov V N. Rapid and direct magnetization of GFP – reporter yeast for micro – screening systems [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2010, 25(7): 1816–1819.
- [6] Fakhru'llin R F, Bikhmullin A G, Nurgaliev D K. Magnetically responsive calcium carbonate microcrystals[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2009, 1(9): 1847–1851.
- [7] Zhang D Y, Fakhru'llin R F, Ozmen M, et al. Functionalization of whole – cell bacterial reporters with magnetic nanoparticles [J]. Microbial Biotechnology, 2011, 4(1): 89–97.
- [8] Wang L, Yang Z M, Gao J H, et al. A biocompatible method of decoration: bisphosphonate modified magnetite nanoparticles to remove uranyl ions from blood [J]. J Am Chem Soc, 2006, 128: 13358–13359.
- [9] Fakhru'llin R F, Minullina R T. Hybrid cellular – inorganic core – shell microparticles: encapsulation of individual living cells in calcium carbonate microshells[J]. Langmuir; the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2009, 25(12): 6617–6621.
- [10] Wang B, Liu P, Jiang W E, et al. Yeast cells with an artificial mineral shell: protection and modification of living cells by biomimetic mineralization[J]. Angewandte Chemie – International Edition, 2008, 47(19): 3560–3564.
- [11] Ma X M, Chen H F, Yang L, et al. Construction and potential applications of a functionalized cell with an intracellular mineral scaffold [J]. Angewandte Chemie, 2011, 50(32): 7414–7417.
- [12] Huang M J, Wang Y J. Synthesis of calcium phosphate microcapsules using yeast – based biotemplate [J]. Journal of Materials Chemistry, 2012, 22(2): 626–630.
- [13] Yang S H, Ko E H, Jung Y H, et al. Bio – inspired functionalization of silica – encapsulated yeast cells[J]. Angew Chem Int Ed, 2011, 50(27): 6115–6118.
- [14] Yang S H, Kang S M, Lee K B, et al. Mussel – inspired encapsulation and functionalization of individual yeast cells[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(9): 2795–2797.
- [15] Yang S H, Ko E H, Choi I S. Cytocompatible encapsulation of individual chlorella cells within titanium dioxide shells by a designed catalytic peptide[J]. Langmuir, 2012, 28(4): 2151–2155.
- [16] Yang S H, Lee T, Seo E, et al. Interfacing living yeast cells with graphene oxide nanosheaths[J]. Macromolecular Bioscience, 2012, 12(1): 61–66.
- [17] Cheng L Y. The purification of biliary protein and its effect on calcium carbonate mineralization [J]. Chinese Journal of Chemistry, 2008, 26(6): 1075–1078.