

利用产黄青霉培养液的上清液生物合成纳米银影响因素的研究

杨素玲, 孟佑婷, 刘桂君, 王平, 尚宏忠 (北京市辐射中心, 北京 100015)

摘要 [目的] 对利用产黄青霉培养液的上清液生物合成纳米银的影响因素进行研究。[方法] 利用紫外-可见光谱和投射电镜研究硝酸银起始浓度、pH 值、光照和微波辐照等条件对合成反应速率及合成纳米银粒径的影响。[结果] 硝酸银的最佳起始浓度为 2 mmol/L; 随着反应体系 pH 值的升高, 反应速率随之加快, 合成纳米银粒子的粒径变小; 光照和微波辐照均能有效促进纳米银的合成。[结论] 该研究为实现纳米银的可控合成提供了试验基础。

关键词 产黄青霉; 纳米银; 生物合成

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)02-00503-02

Effects of Experimental Conditions on Silver Nanoparticles's Biosynthesis by Culture Supernatant of *Penicillium chrysogenum*

YANG Su-ling et al (Beijing Radiation Center, Beijing 100015)

Abstract [Objective] The aim was to study the effects of experimental conditions on silver nanoparticles's biosynthesis by culture supernatant of *Penicillium chrysogenum*. [Method] The effects of initial silver nitrate concentration, pH value, visible-light emission and microwave irradiation on the reaction rate and size of synthetic silver nanoparticles were studied by using UV-vis spectra and transmission electron microscopy. [Result] The optimal initial silver nitrate concentration was 2 mmol/L; the reaction rate was increased with the increase of pH value in the reaction system, but the particle size was decreased; both visible-light emission and microwave irradiation could promote the synthesis of silver nanoparticles effectively. [Conclusion] This research provided a test basis for the realization of controllable synthesis of silver nanoparticles.

Key words *Penicillium chrysogenum*; Silver nanoparticles; Biosynthesis

纳米银因其独特的物理化学特性使其在电学、光学、生物医学、催化等诸多领域具有广阔的应用前景。目前合成银纳米粒子的方法主要是物理法和化学法, 但这些方法都耗能且会造成环境污染, 因此, 寻找清洁、环境友好的纳米银制备方法就显得尤为重要。近几年来, 利用微生物、植物及其提取物合成纳米晶的生物合成法受到了人们的广泛重视。目前已发现多种微生物包括细菌^[1]、酵母^[2]和真菌^[3]等具有合成纳米银的能力。

产黄青霉菌是一种广泛存在于自然界中的霉菌, 是生产青霉素的重要工业菌种, 能分泌多种酶类及有机酸, 是重要的工业用真菌, 同时因其能合成大量的胞外物质, 是很有潜力的合成纳米银的菌种。笔者在初期的研究中发现这种产黄青霉培养液的上清液确实能合成纳米银, 并对合成纳米银的特性进行了研究。纳米银的性质主要依赖于其形貌和尺寸, 对于纳米银的可控制备, 已成为当今的研究热点之一。笔者在文中主要研究硝酸银初始浓度、pH 值、光照、微波辐照等条件对反应速率和合成纳米银粒子形貌的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。产黄青霉, 由北京市辐射中心分离保存。

1.1.2 培养基。PDA 培养基: 土豆 20% (煮汁), 葡萄糖 2%, 自然 pH。

1.2 方法

1.2.1 微生物培养。刮取固体平板菌种一环, 接入 PDA 液体培养基中, 置于 28 °C 恒温摇床上 150 r/min 培养 5 d。

1.2.2 微生物培养液上清液的制备。取培养好的菌液, 用

Waterman NO.1 滤纸过滤以去除菌体, 收集滤液, 用于纳米银合成试验。

1.2.3 纳米银的合成。取 50 ml 微生物培养液上清液, 加入 250 ml 三角瓶中, 向其中加入新配制的硝酸银溶液, 使银离子终浓度约为 2 mmol/L, 塞上瓶塞, 置于 28 °C 的恒温振荡器 (转速 150 r/min) 中避光孵育。

1.2.4 硝酸银初始浓度、pH 值、光照和微波辐照对合成反应的影响。硝酸银浓度和 pH 影响: 分别在不同的硝酸银浓度、pH 值下反应, 其他条件同“1.2.3”。光照处理: 反应在光照振荡器 (哈东联, HZQ-QG, 上盖配置 6 支 30 W 日光灯) 中进行, 其余条件同“1.2.3”。微波处理: 在 SANYO EM-2012MS1 微波炉中进行, 功率为 700 W。分两个处理: ①微波前处理, 即先微波处理菌液上清液 5 min, 再将其与硝酸银反应; ②微波后处理, 即将菌液上清液与硝酸银混合后再进行微波处理, 处理时间分别为 5 和 10 min。紫外扫描分析产物, 确定反应的各种最佳单因素条件。

1.2.5 合成纳米银表征方法。采用多功能酶标仪 USA Hitachi U-3010 (Molecular Devices) 对纳米银溶液进行分析, 波长范围为 250 ~ 700 nm。取反应终止后得到的溶胶 20 μl 滴在铜网上, 室温晾干, 进行透射电镜 JEM-2010 TEM (JEOL Co.) 分析。

2 结果与分析

2.1 银纳米粒子的合成 当产黄青霉培养液的上清液与银离子混合并共孵育时, 随着反应时间的延长, 溶液由淡黄色逐渐变为红棕色, 同时, 紫外-可见 (UV-vis) 谱图在波长 410 nm 处出现了吸收峰, 说明反应体系中有 AgNPs 生成^[4]; 吸收峰的强度随反应时间的增加而增强, 说明随着反应的进行, 生成的纳米银粒子量越来越多, 反应进行到 72 h, 吸收峰的峰强达最大值。停止反应后, 将反应液滴在覆有炭膜的铜网上, 室温干燥后用高倍透射电镜观察, 由图 1 可看出, 反应

体系中有类球形的纳米颗粒生成,直径在5~50 nm之间。

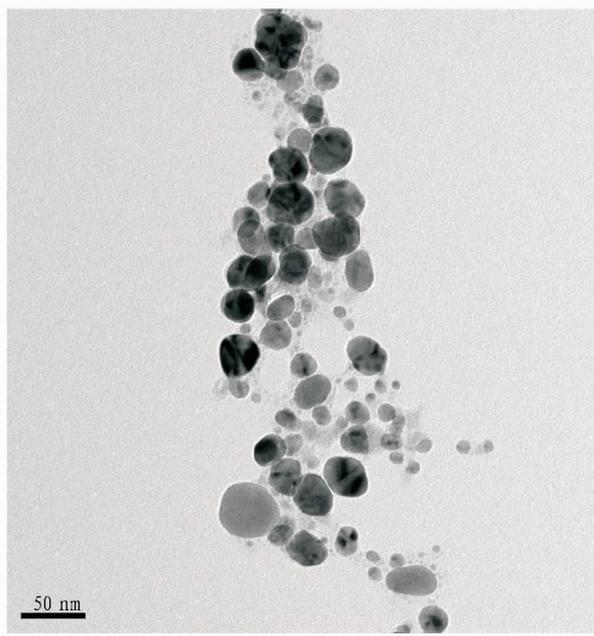


图1 利用产黄青霉上清液合成的纳米银 TEM 图谱

2.2 硝酸银浓度对纳米银合成的影响 如表1所示,当硝酸银浓度低于3.0 mmol/L时,随着硝酸银剂量的增加,合成纳米银的UV-vis图谱吸收峰的强度也增加,但峰位置基本不变,说明生成的纳米银粒子粒径不变,粒子数量增加,这是由于硝酸银浓度增加,使被还原生成的纳米银的量增加。当硝酸银浓度为4.0 mmol/L时,吸收峰发生红移,说明合成粒子的粒径变大。球形纳米颗粒的吸收峰位置随着颗粒尺寸的增加而逐步红移。粒径越大,红移越大^[5]。这是由于当纳米银浓度增加时,还原反应速度加快,纳米银颗粒也会生长变大。另一方面,AgNO₃浓度增大,起始形成的晶核增大,而形成的晶粒在此时团聚的趋势要大于扩散的趋势,更易造成颗粒的团聚,从而也导致银颗粒的粒度逐渐变大^[6]。当硝酸银的浓度等于或小于2 mmol/L时,形成的纳米粒子分散性和稳定性较好,而当硝酸银浓度为3和4 mmol/L时,形成的纳米银溶胶不稳定,放置1周就会发生团聚,并且从投射电镜观察,形成的纳米银粒子形状也会发生变化,不再局限于单一的球形,出现其他形状的粒子。由此可知,合成纳米银的最佳硝酸银浓度为2 mmol/L,此时反应速率高,形成的纳米粒子稳定性好。

表1 不同浓度硝酸银合成纳米银的紫外-可见吸收光谱特征

Sample	Silver nitrate concentration//mmol/L	λ_{\max} nm	Absorbance value//a.u.
S1	1.0	410	0.521 0
S2	1.5	410	0.732 0
S3	2.0	410	1.132 4
S4	3.0	410	1.428 5
S5	4.0	420	1.686 9

2.3 pH对纳米银合成的影响 研究采用NaOH和CH₃COOH溶液调节上清液的pH值,来考察pH值对合成反

应的影 响。由图2可知,随着反应体系pH增大,AgNPs的UV-Vis峰强度增大,表明体系中产生的AgNPs数量增多。当pH大于7时,吸收峰位置蓝移,且其半峰宽逐渐变窄,说明高pH下,形成的银纳米离子粒径略微减小、粒径分布变得均匀。pH越高,合成反应速率越快,pH为10、11时,仅2 h,反应液就变为亮红色,吸收峰的强度达最高。

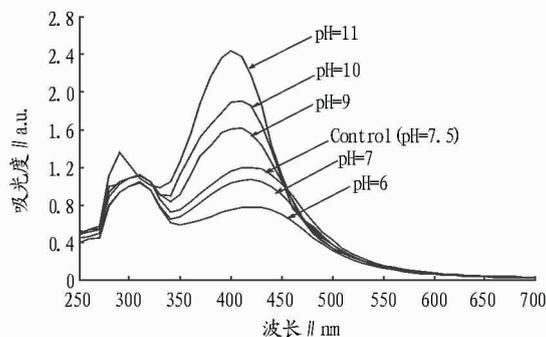


图2 不同pH条件下合成的纳米银溶胶的UV-Vis吸收光谱

2.4 光照和微波辐照对纳米银合成的影响 如图3所示,光照条件下,合成的纳米银UV-Vis峰强度增大,吸收峰位置蓝移,峰宽无明显变化,这表明在光照辅助下,产黄青霉合成纳米银的速率提高,产量增加,纳米离子粒径减小。Mokhtari等发现,可见光可提高细菌肺炎克雷伯菌合成纳米银的速率^[7],Wei等发现解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)水提液在太阳光辅助下可合成纳米银^[1],由此可见,光照是合成纳米粒子的一种重要辅助手段。

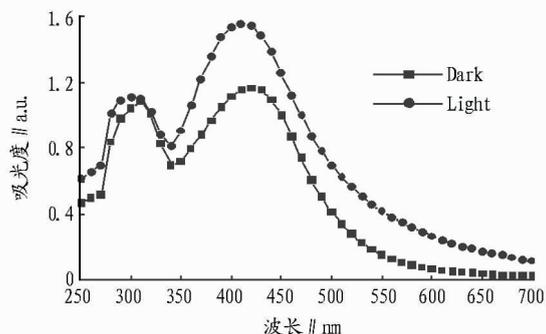


图3 光照和避光条件下合成纳米银的UV-Vis吸收光谱

作为一种新的加热方法,微波辐射在材料科学领域中的应用得到了迅速发展,其经常作为一种辅助手段,用以提高化学合成纳米银的效率^[8]。文中考察了微波辅助对产黄青霉合成上清液的作用。由图4可知,经过微波处理5 min后的上清液与硝酸银反应,合成的纳米粒子的吸收峰发生红移,说明银粒子的粒径变大;合成的纳米银溶液在放置1个月后颜色变黑,说明纳米银不稳定,而对照组放置了半年无明显变化。如果将菌液的上清液与硝酸银混合后再分别进行微波处理5、10 min,合成纳米银溶液的UV-Vis光谱峰强度会增大,吸收峰发生蓝移,其中处理10 min光谱强度大于处理5 min的样品。这表明,微波可辅助生物合成纳米银,提高合成效率。Saifuddin等利用枯草芽胞培养液上清液合成

(下转第506页)

高,苗期整齐度好,生长势强。在全部的8个处理中,E处理出苗率最高,苗期整齐度最好,生长势最强;其次是A、F、B、C、G和H处理;处理D出苗率最低,整齐度最差,生长势最弱。

表3 不同处理出苗率、整齐度和生长势情况

处理	出苗率/%	整齐度	生长势
A	97.5	较整齐	强
B	95.2	较整齐	较强
C	93.8	较整齐	较强
D	89.1	不整齐	弱
E	98.6	整齐	强
F	96.7	较整齐	强
G	93.8	较整齐	较强
H	92.9	较整齐	弱

3 结论与讨论

(1)带壳花生其壳内含有单宁物质,可抑制病菌的侵害,且在一定程度上减轻了地下害虫对籽仁的侵害。

(2)带壳花生可保护种子活力^[5]。1950年国际种子科学与技术会议,把种子活力作为鉴定种子品质的一个重要指标,并区别于种子发芽力。根据种子活力的原理和检验方法可较准确地预测作物田间生产性能,概括地说,除发芽这项基本指标外,活力还应包括萌发速度、整齐度、萌发后的生长势、抗逆力和适应性芽。带壳花生不需剥皮,这样即保护了

种子活力,提高了种子的萌发速度、出苗整齐度、生长势、抗逆性和适应性。

(3)带壳播种的花生在一定程度上减轻了气体条件对萌芽的影响,播前的浸泡使花生籽仁吸收了一定的水分,提高了对于春旱的抵抗能力,防止了芽干。

(4)带壳花生保护了“种子元气”,避免浸种催芽时养分流失,常规条件下,籽仁浸泡后往往变成红褐色,粘稠状,这说明花生种子内含物外渗很多,籽仁养分流失,而带荚的花生浸泡后,养分不外渗,留在种子中,这样对于出苗期的营养供应相对充分,保证了壮苗,对以后的产量提高也起一定的作用。

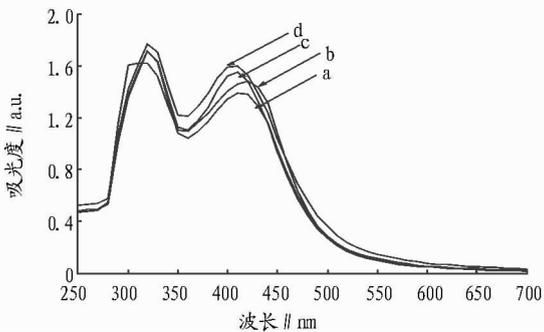
(5)使用化肥不但往往会造成烧苗,而带壳播种的花生无需使用化肥,其种皮内含单宁、纤维等物质,保证了出苗。现在辽宁省的农田基本设施薄弱,综合抗灾抗力差,地力减退土壤有机质含量少,带壳播种方法简单,不需其他机器设备,对克服上述不利因素起到了一定的作用。

参考文献

- [1] 西北农学院.作物育种学[M].北京:农业出版社,1981:353-354.
- [2] 樊天霖.带壳种花生[J].植物杂志,1985(5):13-14.
- [3] 南京农业大学.田间试验与统计方法[M].北京:农业出版社,1991:146-156.
- [4] 山东农业大学.作物栽培学[M].北京:中国农业出版社,1995:348-352.
- [5] 王景升.种子科学与技术[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1991:116-118.

(上接第504页)

纳米银时也得到了相同的结果^[9]。



注:a.对照(无微波处理);b.微波处理上清液5min;c.微波处理上清液和硝酸银混合液5min;d.微波处理上清液和硝酸银混合液10min。

图4 微波辐照处理形成的纳米银溶胶的UV-Vis吸收光谱

3 结论

随着微生物合成方法研究的不断深入,实现纳米银的可控合成将成为今后研究的重点。该试验表明,以产黄青霉上清液制备纳米银时,适当控制硝酸银的初始浓度和反应体系的pH值,有利于合成反应更快进行,也有助于合成粒径较小、分散型好的银纳米粒子。另外,可见光和微波辐照是提

高生物合成纳米银的反应速率、控制粒径的2种有效手段。

参考文献

- [1] WEI X T, LUO M F, LI W, et al. Synthesis of silver nanoparticles by solar irradiation of cell-free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and $AgNO_3$ [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 103: 273-278.
- [2] KOWSHILK M, ASHTAPUTRE S, KHARRAZI S, et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3 [J]. *Nanotechnology*, 2003, 14(1): 95-100.
- [3] MUSARRAT J, DWIVEDI S, SINGH B R, et al. Production of antimicrobial silver nanoparticles in water extracts of the fungus *Amylomyces rouxii* strain KSU-09 [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101: 8772-8776.
- [4] PASTORIZA-SANTOS I, LIZ-MARZÁN L M. Formation and stabilization of silver nanoparticles through reduction by N,N-Dimethylformamide [J]. *Langmuir*, 1999, 15: 948-951.
- [5] PASTORIZA-SANTOS I, SERRA-RODRÁGUEZ C, LIZ-MARZÁN L M. Self-Assembly of Silver Particle Monolayers on Glass from Ag^+ Solutions in DMF [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2000, 221: 236-241.
- [6] 宋永辉, 梁工英, 张秋利, 等. 球形纳米银粉的制备研究 [J]. *稀有金属材料与工程*, 2007, 36(4): 709-713.
- [7] MOKHTARI N, DANESHPAJOUH S, SEYEDBAGHERI S, et al. Biological synthesis of very small silver nanoparticles by culture supernatant of *Klebsiella pneumoniae*: the effects of visible-light irradiation and the liquid mixing process [J]. *Mater Res Bull*, 2009, 44: 1415-1421.
- [8] 李梅, 赵景琨, 韩莉, 等. 微波法制备纳米银晶及X射线衍射分析 [J]. *实验室研究与探索*, 2006, 25(1): 24-40.
- [9] SAIFUDDIN N, WONG C W, NUR YASUMIRA A A, et al. Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Bacteria with Microwave Irradiation [J]. *E-Journal of Chemistry*, 2009, 6(1): 61-70.