



天蓝黄链霉菌胞外合成纳米银的生化机制研究

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2019.02.005

马 靛^{1,2} 黄惠文¹
云佩仪¹ 唐宇琪¹
刘学英^{1,2}

1. 湖南工业大学

生命科学与化学学院

湖南 株洲 412007

2. 湖南工业大学

生物医用纳米材料与

器件湖南省重点实验室

湖南 株洲 412007

摘要:以天蓝黄链霉菌(*S. coelicoflavus*)菌体浸出液为还原剂和包覆剂于胞外合成纳米银,对纳米银的形貌结构、晶体结构、粒度分布、元素组成及表面包覆基团进行表征分析,并通过研究主要生物活性分子在纳米银合成过程中的重要作用,探索了纳米银胞外合成的生化反应机制。表征分析结果表明,合成的纳米银颗粒主要为球形或近似球形,少量为截边三角形、四边形或六角形;平均粒径约为34.50 nm,呈中度多分散性;具有良好的结晶度和多晶结构。生化合成机制研究表明,蛋白质和还原型谷胱甘肽(GSH)在纳米银的合成过程中起主要作用;跨膜蛋白和细菌铁蛋白包覆于形成的纳米银颗粒表面,以保持其在反应体系中的高度稳定性;硝酸还原酶可能与其他生物活性组分共同催化银离子的还原过程。

关键词:天蓝黄链霉菌;胞外合成;纳米银;微生物学;生化合成机制

中图分类号:Q939.99;TB31

文献标志码:A

文章编号:1674-7100(2019)02-0028-09

引文格式:马 靛,黄惠文,云佩仪,等.天蓝黄链霉菌胞外合成纳米银的生化机制研究[J].包装学报,2019,11(2):28-36.

1 研究背景

近年来,纳米技术的快速发展引起了世界各国的广泛关注。与宏观尺度材料相比,纳米粒子不仅具有更大的比表面积和更高的反应活性,还具有表面等离子体共振(surface plasmon resonance technology, SPR)、共振瑞利散射(resonance Rayleigh scattering, RRS)和表面增强拉曼散射(surface enhancement of Raman scattering, SERS)等特点^[1-2]。目前,纳米粒子已广泛应用于药物输送、抗菌剂、药物纳米工程、

催化、传感器开发、电子等领域。随着新型包装材料技术的不断进步,纳米包装材料也逐渐成为纳米技术的重要应用领域之一。相对于其他传统的包装材料而言,纳米包装材料在理化性能、机械性能和加工性能方面具有较为明显的优势^[3-4]。

在众多的纳米材料中,纳米银因其具有良好的耐光性、耐热性、化学稳定性、抗菌性和保鲜性,在食品包装领域的应用具有极大的发展前景。然而,随着纳米银工业化需求的不断增加,传统纳米银合

收稿日期:2019-01-03

基金项目:湖南省自然科学基金省市联合基金资助项目(2018JJ4061);湖南省自然科学基金资助项目(2017JJ2069);湖南省教育厅优秀青年基金资助项目(18B290)

作者简介:马 靛(1982-),女,湖南株洲人,湖南工业大学讲师,博士,主要从事微生物资源开发与利用、纳米材料生物合成方法及其生物学效应方面的研究,E-mail:maliangcc@126.com

通信作者:刘学英(1981-),女,山东泰安人,湖南工业大学讲师,博士,主要从事生物酶催化反应作用机理方面的研究,E-mail:liuxueying@hut.edu.cn

成技术的瓶颈也日渐突显。物理合成法具有能耗大、对设备要求高、生产费用昂贵、合成速度慢等缺点,而化学合成法涉及有毒还原剂和分散剂的添加,除了对环境危害较大之外,还大大降低了纳米银的生物安全性,严重限制了其在食品包装领域的应用。近年来,随着纳米工程、生物工程和材料工程等学科的不断发展,多学科的相互渗透拓宽了传统的研究领域。基于微生物还原法制备具有低毒性、高稳定性和生物相容性的纳米银绿色合成技术引起了人们的极大兴趣。

与其他合成方法相比,微生物还原法在纳米银的大规模、工业化合成方面具有独特的优势。首先,微生物来源广泛,菌体产量大、分离简单;其次,在纳米银的胞外合成过程中,微生物菌体浸出液中大量的生物活性物质除了可以作为纳米银合成的还原剂和包覆剂,还可以在人为调节其浓度的条件下实现对纳米银形貌、尺寸和结晶度的可控合成;再次,得到的纳米银颗粒表面包覆着丰富的蛋白质、脂类、多聚糖等物质,较传统方法合成的纳米银而言,基于微生物还原法制备的纳米银具有独特的生物学特性和良好的生物亲和性及安全性^[5-6]。

放线菌是合成次级代谢产物的重要资源,从各种生态环境中分离的放线菌在不同的金属纳米粒子合成方面也表现出了巨大的潜力^[7-8]。总体来说,关于放线菌合成纳米银的研究起步较晚,相关生化合成机制的研究报道也较少。根据已有的研究结论推测,在放线菌介导的金属纳米颗粒合成过程中,与氮素循环相关的电子穿梭酶与金属离子的还原密切相关^[9]。此外,由于放线菌自身分泌的天然抗菌成分可能掺杂于其合成的纳米颗粒中,因此由放线菌合成的纳米颗粒可能呈现出更强的抗菌活性^[10-11]。为了进一步阐明放线菌介导的纳米银的生化合成机制,本课题组以天蓝黄链霉菌(*Streptomyces coelicoflavus*, *S. coelicoflavus*)的菌体浸出液作为还原剂和包覆剂于胞外合成纳米银。通过不同的表征手段分析纳米银的形貌结构、晶体结构、粒度分布、元素组成及表面包覆基因;测定了纳米银合成前后反应体系中可溶性还原糖、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)及蛋白质的含量,分离鉴定了纳米银颗粒表面包覆的蛋白分子,同时还检测了*S. coelicoflavus*胞内硝酸还原酶的活性,探索了纳米银合成过程的生化反应机制,为大批量可控合成具有低毒性、高稳定性和生物相容性的纳米银提供一定的理论依据和实验参考。

2 实验部分

2.1 实验材料及仪器

2.1.1 实验材料

硝酸银(AgNO_3),分析纯,购自美国 Sigma-Aldrich Chemicals 公司;氯化钠、氢氧化钠、结晶苯酚、亚硫酸钠、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸,分析纯,购自国药集团上海有限公司;硝酸、盐酸、冰醋酸,分析纯,购自福晨(天津)化学试剂有限公司;麦芽提取物、葡萄糖、酵母提取物、蛋白胨,生化试剂,购自英国 Oxoid 公司;GSH 标准品、5,5'-二硫硝基苯甲酸(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB)、牛血清白蛋白、Folin-酚试剂盒、萘基乙炔胺,生化试剂,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;三羟甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane, Tris)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),分子生物学试剂,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;还原型辅酶 I(reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH),生化试剂,购自美国 Roche 公司;对-氨基苯磺酸,分析纯,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;乙腈、甲酸、三氟乙酸,色谱纯,购自国药集团上海有限公司;*S. coelicoflavus*由湖南工业大学生物医用纳米材料与器件湖南省重点实验室分离、鉴定并保存(GenBank 登录号:KP293775.1)。

2.1.2 实验仪器

气浴全温振荡器,ZD-88型,金坛市科杰仪器厂;生化培养箱,PYX-250S-A型,韶关市泰宏医疗器械有限公司;双光束紫外-可见分光光度计,TU-1901型,北京普析通用仪器有限责任公司;场发射透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM),G2 F20型,美国 FEI 公司;纳米粒度仪,Zetasizer Nano型,英国 Malvern 公司;傅里叶变换红外光谱仪(fourier transform infrared, FTIR),Frontier型,美国 PerkinElmer 股份有限公司;冷冻干燥离心浓缩仪,SPD111V型,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;垂直板电泳槽,DYCZ-24DN型,北京六一生物科技有限公司;双稳定时电泳仪,DYY-2C型,上海江莱生物科技有限公司;脱色摇床,TY-80B型,常州市金坛友联仪器研究所;液相色谱仪,EASY-nLC1200型,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;质谱仪,Q-Exactive型;美国

Thermo Fisher Scientific 公司。

2.2 *S. coelicoflavus* 介导胞外合成纳米银

将 3 mL *S. coelicoflavus* 孢子悬液（每毫升悬液含有 8×10^6 个孢子）接种于 100 mL 酵母麦芽肉汤培养基（配方：质量浓度为 3 g/L 的麦芽提取物、10 g/L 的葡萄糖、3 g/L 的酵母提取物、5 g/L 的蛋白胨，pH 值为 7.0）中，于 30 °C、160 r/min 振荡培养 72 h。待培养结束后，将发酵液于 5 000 r/min 离心 5 min，洗涤并收集菌体。按照菌体湿重（g）与水体积（mL）比为 10:100 的比例将湿菌体重悬于无菌水中，于 30 °C、160 r/min 振荡浸提 72 h，以促进菌体细胞自溶，充分将胞内物质释放于水中。将菌体浸出液于 20 °C、5 000 r/min 离心 5 min 以去除菌体，上清液用 Whatman No.1 滤纸过滤数次以收集含有生物活性物质的无细胞菌体浸出液。将浓度为 1 mmol/L 的硝酸银溶液加入至菌体浸出液（pH 值为 7.5~8.0）中，于 30 °C、160 r/min 避光振荡反应 72 h，同时设计未添加硝酸银的菌体浸出液作为对照。反应结束后，观察反应前后混合液的颜色变化，通过检测反应液的紫外-可见光吸收光谱（ultraviolet-visible absorption spectrometry, UV-Vis）以验证反应液中纳米银颗粒的形成。将反应液于 12 000 r/min 离心 20 min 后收集沉淀，用无水乙醇洗涤沉淀 3 次，置于真空干燥箱中 20 °C 干燥过夜以获得纳米银粉末。

2.3 纳米银的表征分析

1) 电镜分析

吸取纳米银的乙醇分散液滴加于碳膜包覆的铜网上，待铜网自然风干后使用透射电子显微镜及高分辨透射电子显微镜（high-resolution transmission electron microscopy, HR-TEM）检测纳米银颗粒的形貌结构、粒径范围及晶体结构。检测加速电压为 200 kV，最大放大倍数为 105 万倍，点分辨率为 0.24 nm，线分辨率为 0.102 nm。选取不同视野范围内的 TEM 图片，对图中一定数量的纳米颗粒进行粒径测量和粒度分布统计。

2) 粒径分析

基于动态光散射（dynamic light scattering, DLS）法，用纳米粒度仪在 25 °C、散射角为 90° 的条件下测量纳米银颗粒的多分散指数（polydispersity index, PDI）。

3) 元素组成分析

将载有纳米银颗粒的碳包覆铜网直接用于能量

色散 X 射线（energy dispersive of X-ray, EDX）分析，以检测纳米银颗粒的元素组成及各元素相对含量。检测元素范围 5(B)~92(U)，能量分辨率 130 eV（Mn 靶， K_{α} 辐射光源）。

4) 红外光谱分析

采用傅里叶变换红外光谱仪检测包覆于纳米银颗粒表面的主要功能性基团，以分析纳米银颗粒的组成。检测中红外分束器光谱范围为 2 000~1 000 cm^{-1} ；溴化钾分光光束分辨率为 0.4 cm^{-1} ；检测器为 DTGS；信噪比为 11 000:1。

2.4 纳米银的生化合成机制研究

2.4.1 纳米银合成前后反应体系中生物活性组分的含量变化

将 *S. coelicoflavus* 的菌体浸出液平均分为两份，其中一份加入硝酸银溶液，另一份作为对照加入与硝酸银相同体积的无菌水，按照上述反应条件进行纳米银的胞外合成。反应结束后，分别采用 3, 5-二硝基水杨酸法^[12]、DTNB 衍生-光度法^[13]和 Folin-酚试剂盒法检测 *S. coelicoflavus* 菌体浸出液和反应上清液中还原糖、GSH 和蛋白质含量的变化。

2.4.2 纳米银颗粒表面覆盖蛋白质电泳分析

采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）对纳米银颗粒表面覆盖蛋白进行分析。将纳米银颗粒重悬于无菌水中，加入质量浓度为 0.4 g/L 的 SDS 固体，于 100 °C 煮沸 2 min 以解离纳米银颗粒表面覆盖的微生物蛋白，然后立即置于 4 °C、8 000 r/min 离心 30 min 去除沉淀；将收集的上清液冻干浓缩后，溶解于 SDS 裂解液中。于室温下孵育 3 h，12 000 r/min 离心数次并收集上清液，即为待测的微生物总蛋白溶液。采用分离胶体积分数为 12%、浓缩胶体积分数为 5% 的 SDS-PAGE 分离样品中的微生物蛋白组分，采用考马斯亮蓝染色法进行染色。

2.4.3 蛋白质组分的分析及鉴定

通过液相色谱-串联质谱（liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS/MS）分析和鉴定纳米银颗粒表面覆盖的蛋白质组分。将经 SDS-PAGE 分离的主要蛋白条带切下，进行脱色、还原处理，再加入胰蛋白酶于 37 °C 酶解 16 h，将获得的酶解消化产物冻干浓缩。先用 EASY-nLC1200 液相色谱仪进行分离，随后再用 Q-Exactive 质谱仪进行质谱分析。蛋

白质鉴定数据处理采用 Matrix Science Mascot 2.3 软件进行, 每个蛋白质鉴定结果依据 2 个或多个肽段在相应数据库中的搜索结果来确定, 蛋白得分 C.I.% (protein score C.I.%) 大于 95% 为鉴定成功。

2.4.4 硝酸还原酶活性的测定

参照文献 [14] 的方法, 取 *S. coelicoflavus* 的新鲜菌体于液氮中充分研磨后与 16 mL 提取缓冲液混合匀浆, 离心取上清液即制得粗酶提取液; 将 0.8 mL 粗酶液、2.4 mL 浓度为 0.1 mol/L 的硝酸钾磷酸缓冲液和 0.8 mL 质量浓度为 2 mg/mL 的 NADH 溶液混合均匀, 于 25 °C 下反应 30 min 后, 反应结束后立即加入 2.0 mL 质量浓度为 10 g/L 的对 - 氨基苯磺酸溶液终止酶反应, 再加入 2.0 mL 质量浓度为 0.2 g/L 的萘基乙烯胺溶液, 显色 15 min, 随后离心取上清液于 540 nm 下测定吸光度, 并计算反应液中所产生的亚硝态氮总量, 通过以下公式计算单位鲜重菌体中硝酸还原酶活性。

$$\text{硝酸还原酶活性} = \frac{X \times V_1}{W \times T \times V_2} \text{。}$$

式中: X 为反应液酶催化产生的亚硝态氮总量, μg ; V_1 为提取酶时加入的缓冲液体积, mL; V_2 为酶反应时加入的粗酶液体积, mL; W 为菌体鲜重, g; T 为反应时间, h。

3 结果与讨论

3.1 *S. coelicoflavus* 介导胞外合成纳米银结果分析

图 1 为 *S. coelicoflavus* 介导胞外合成纳米银前后反应液的颜色变化图。由图可知, *S. coelicoflavus* 的菌体浸出液与 1 mmol/L 硝酸银溶液在 30 °C、160 r/min 下避光反应 72 h 后, 反应液由浅黄色逐渐变为红棕色, 其原因可能是浸出液中的还原性生物活性分子使硝酸银溶液中的银离子还原为纳米银颗粒, 纳米银的 SPR 特征使溶液呈现特殊的红棕色。

图 2 为纳米银合成反应液、菌体浸出液以及硝酸银溶液的紫外 - 可见光吸收光谱图。由图可知, 在波长为 441 nm 处出现了纳米银的特征性 SPR 吸收峰, 而硝酸银和未添加硝酸银的菌体浸出液则无此现象, 说明 *S. coelicoflavus* 的菌体浸出液作为还原剂和包覆剂介导了纳米银的胞外合成过程。并且, 将纳米银的合成反应液置于常温下避光保存 4~8 周后, 纳米银溶液颜色仍无明显变化, 也无明显的颗粒团聚和沉淀现象。这是由于 *S. coelicoflavus* 菌体浸出液中含有的

大量生物活性物质 (如蛋白质), 其作为包覆剂附着于纳米银颗粒的表面, 有效地阻止了纳米银颗粒因粒子间碰撞而引起团聚和粒径增大, 从而保证了纳米银在水溶液中较高的稳定性。

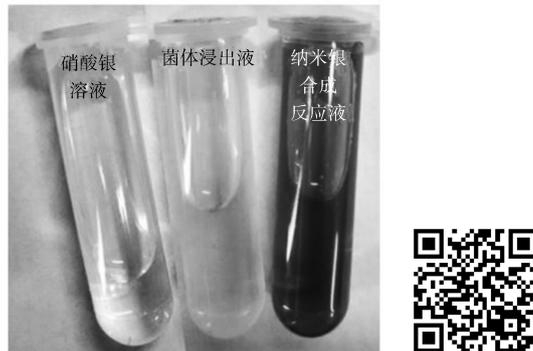


图 1 *S. coelicoflavus* 合成纳米银前后反应液的颜色变化
Fig. 1 The cell-free filtrate of *S. coelicoflavus* before and after exposure to AgNO_3

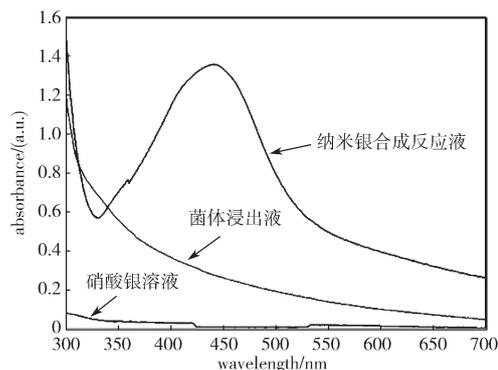


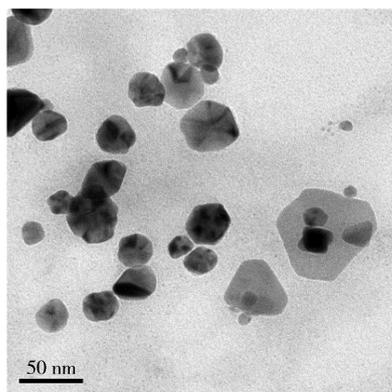
图 2 *S. coelicoflavus* 合成纳米银反应液的 UV-Vis 吸收光谱图

Fig. 2 UV-Vis spectra of reaction mixture after biosynthesis of AgNPs by *S. coelicoflavus*

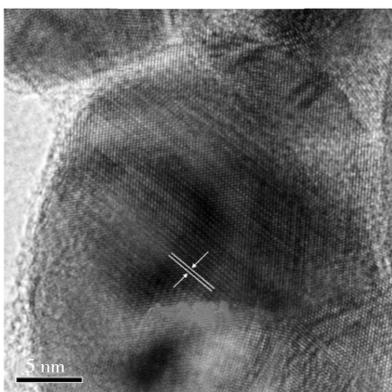
3.2 纳米银的表征结果分析

1) 电镜结果分析

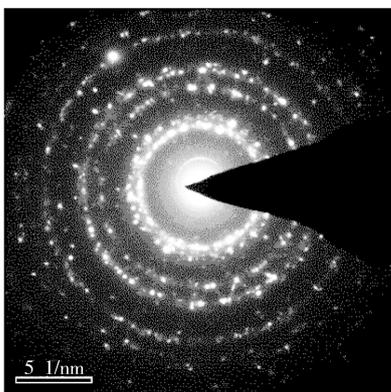
利用 TEM 和 HR-TEM 对 *S. coelicoflavus* 介导合成的纳米银颗粒进行形貌结构、粒径及晶体结构表征, 结果如图 3 所示。由图可知, 纳米银颗粒主要呈球形或近似球形, 此外还存在少量呈截边三角形、四边形和六角形的纳米银颗粒。P. Manivasagan 等^[15] 利用放线菌 *Nocardiopsis sp.* MBRC-1 介导, 胞外合成了具有与本实验结果形貌类似的纳米银颗粒。此外, 通过纳米银颗粒的 HR-TEM 图和选区电子衍射 (selected area electron diffraction, SAED) 图可以清晰地观察到纳米银颗粒呈多晶结构, 其晶面间距 d 为 2.26 Å。



a) TEM 图



b) HR-TEM 图



c) SAED 图

图 3 *S. coelicoflavus* 合成的纳米银的 TEM、HR-TEM 及 SAED 图

Fig. 3 TEM, HR-TEM and SAED images of AgNPs biosynthesized by *S. coelicoflavus*

2) 粒径分布结果分析

通过统计来自不同视野范围 TEM 图片中的纳米银颗粒, 可得 *S. coelicoflavus* 合成纳米银的粒度分布图, 如图 4 所示。由图可知, 10.15% 的纳米银粒径为 0~15 nm, 87.7% 的纳米银粒径为 15~75 nm, 2.15% 的纳米银粒径为 75~90 nm, 平均粒径约为 34.50

nm。并且 DLS 结果显示, 纳米银合成反应液的 PDI 值为 0.549, 表明合成的纳米银在水溶液中呈中度多分散性 (0.08~0.7) [16]。

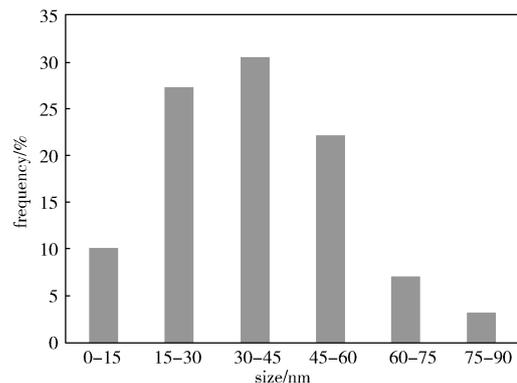


图 4 *S. coelicoflavus* 合成纳米银的粒度分布图

Fig. 4 The size distribution of AgNPs biosynthesized by *S. coelicoflavus*

3) 元素组成结果分析

利用 EDX 光谱对 *S. coelicoflavus* 合成的纳米银颗粒进行元素组成分析。如图 5 所示, 在 3 keV 处出现的特征性吸收峰信号证实了合成的纳米颗粒中银元素的存在。此外, 该谱图上还存在碳、氧、磷、硫等元素的信号, 它们可能来自于纳米银颗粒表面包覆的生物活性组分, 而铜元素信号则可能来自于承载纳米银颗粒的碳包覆铜网。

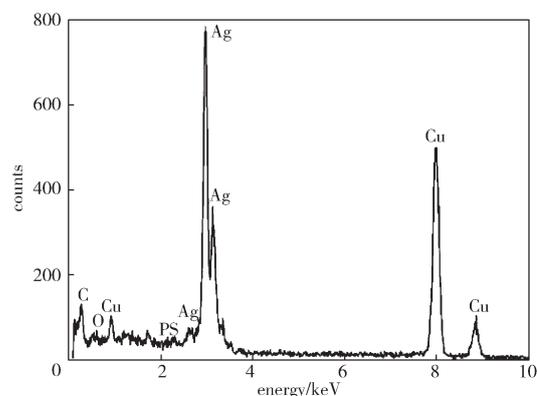


图 5 *S. coelicoflavus* 合成的纳米银的 EDX 图

Fig. 5 EDX spectrum of AgNPs biosynthesized by *S. coelicoflavus*

4) 红外光谱结果分析

FTIR 光谱可检测纳米银颗粒表面来自生物活性组分的包覆基团, 结果如图 6 所示。由图可知, 在波长为 $2\ 000.00\sim 1\ 000.00\text{ cm}^{-1}$ 的范围内存在由不同化学键伸缩振动而引起的吸收峰。其中 $1\ 637.58\text{ cm}^{-1}$

和 $1\ 617.76\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰可归属于蛋白质酰胺 I 和酰胺 II 中酰胺键的 N—H 和 C=O 振动, $1\ 384.60\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 153.62\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰则可归属于蛋白质中芳香族胺和脂肪族胺的 C—N 振动^[17]。该结果证实, 在 *S. coelicoflavus* 合成纳米银的过程中, 其分泌的胞内或胞外蛋白质可能介导了纳米银的合成过程。根据已发表的文献报道^[18-19], 微生物分泌的蛋白质可以通过游离胺基团、半胱氨酸残基或带有负电荷的羧酸盐基团产生静电吸引而与纳米颗粒发生相互作用。这些蛋白质同时作为还原剂和包覆剂, 负责纳米银合成过程中银离子的还原和纳米银的稳定性。

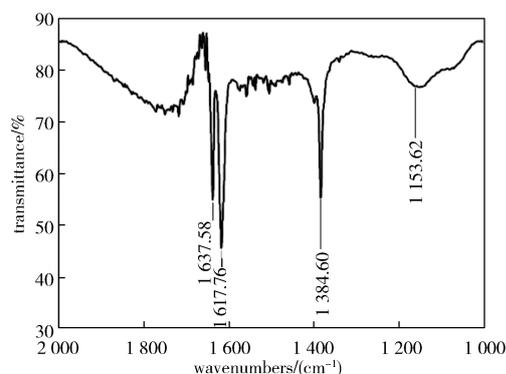


图 6 *S. coelicoflavus* 合成的纳米银的 FTIR 图
Fig. 6 FTIR spectrum of AgNPs biosynthesized by *S. coelicoflavus*

3.3 *S. coelicoflavus* 介导纳米银生化合成机制的研究

3.3.1 参与纳米银合成的主要生物活性组分分析

通过 3, 5-二硝基水杨酸法、DTNB 衍生-光度法和 Folin-酚试剂盒法分别检测纳米银合成前后反应体系中还原糖、GSH 和蛋白质的含量, 结果如表 1 所示。由表可知, GSH 和蛋白质在纳米银合成过程中都存在一定程度的消耗, 而还原糖的消耗量极少。由此可知, 在 *S. coelicoflavus* 菌体浸出液中, 蛋白质是参与纳米银合成过程的主要生物活性组分, 同时 GSH 也在此过程中起辅助作用。该结果与 FTIR 分析结论相互印证。

表 1 纳米银合成前后生物活性组分含量的变化

Table 1 Changes in the contents of bioactive components before and after biosynthesis of AgNPs

组分	质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		反应前后含量 减少百分比 / %
	浸出液	反应上清液	
还原糖	42.19	40.08	5.00
GSH	50.53	33.68	33.35
蛋白质	341.25	210.68	38.26

3.3.2 纳米银颗粒表面包覆蛋白质的纯化及 SDS-PAGE 电泳分析

将纯化后的纳米银颗粒用 SDS 法进行解离, 并浓缩纳米银颗粒表面包覆的蛋白质组分, 采用 SDS-PAGE 电泳进行分离, 结果如图 7 所示。由图可知, 在 18.4~116.0 kDa 范围内, *S. coelicoflavus* 合成的纳米银颗粒表面结合蛋白主要呈现 2 个清晰的条带, 其中条带 a 约为 35.0~45.0 kDa, 条带 b 约为 18.4~25.0 kDa。结果表明 *S. coelicoflavus* 合成纳米银的过程中, 存在不同种类的蛋白质分子包覆于纳米银颗粒的表面, 参与纳米银形成后的稳定化过程。

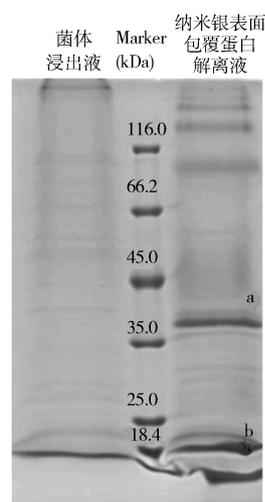


图 7 纳米银表面包覆蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of proteins capped on the surface of AgNPs

3.3.3 蛋白质组分的 LC-MS/MS 检测及鉴定分析

将 SDS-PAGE 法分离得到的主要蛋白条带用于 LC-MS/MS 检测及鉴定。表 2 和图 8 分别为两条蛋白条带的 LC-MS/MS 鉴定结果及部分肽段对应的质谱离子峰。根据质谱搜库结果显示, 蛋白条带 a 和 b 分别鉴定为跨膜蛋白 (transmembrane protein) 和细菌铁蛋白 (bacterioferritin)。跨膜蛋白在细胞中的功能主要表现为启动响应细胞外部环境的信号, 而引起细胞其他结构的变化。细菌铁蛋白的生理功能目前尚不清楚, 有文献报道大肠杆菌铁蛋白因其特殊的自组装行为已被用于研究最小蛋白质纳米笼的自组装模型^[20]。此外, Zhang X. R. 等^[21]在研究真菌 *Fusarium sp.* 胞内合成纳米金的过程中也发现, 纳米金颗粒表面结合了与细胞内能量代谢有关的脂膜 ATP 酶 (plasma membrane ATPase)、3-葡聚糖结合

蛋白(3-glucan binding protein)和3-酸甘油脱氧蛋白(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)等,

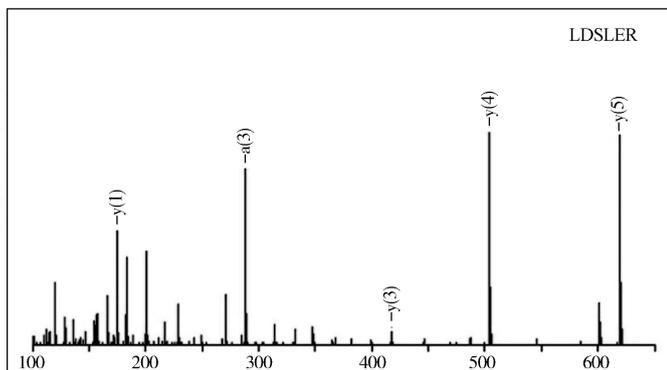
说明微生物合成的金属纳米颗粒表面包覆的蛋白质分子具有相似的类型和功能。

表2 纳米银颗粒表面包覆蛋白的LC-MS/MS鉴定结果

Table 2 LC-MS/MS analysis of proteins capped on the surface of AgNPs

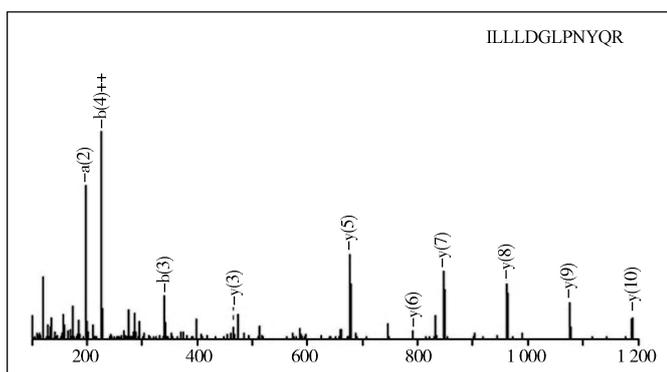
蛋白条带	分子量/kDa	蛋白鉴定结果	所属物种	P值	肽段序列
a	39.538	transmembrane protein	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> ZG0656	0.0021	R.LDSLER.K
b	19.222	bacterioferritin	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> ZG0656	3.3E-06	R.ILLLDGLPNYQR.L

1 MRLTDISLNW LLPGAVLLLG MLAAVAVLAR GKRSSGKDAG ADDSWERMEE
51 RRRRKEALYG TFSYVLLPCC AAVAAALSPH GLVGFGEQNL GLSDGWQYLV
101 PFGLDGAMF CSVLAVREAS HGDAALGSRI LWAFAFAAA WFNWVHAPRG
151 LGHAGAPHF AGMSLSAAVL FDRALKQTRR AALRBQGLVP RPLPQIRMVR
201 WLRAPRETRY AWSLMLLEGV RSLDEAVEEV RDRRREKEEK KLRRRQERL
251 ERAQLKAISR GHCHRGFGR GGRQVEVEVQ QVERGSEAT AEPALSTPEQ
301 LPAGTRRPSL QPVRSGSEQM AVETVDLTAE DDTQALPRLD SLERKLDLE
351 QQPG-



a) 蛋白条带 a

1 MQGQPEVIEF LNEQLTAELT AINQYPLHAK LQDHKGWTKL AKYTRA
51 EBRHAEVLTD RILLLDGLPN YQRLPHVRVG QSVTEMPQAD REIELE.....
101 LRRGIEVMRA KHDITSANVF EAILADEEHH IDYLETQLDL IEKLGESLYL
151 STVIEQTQPD PSGPGSL-



b) 蛋白条带 b

图8 纳米银颗粒表面包覆蛋白的LC-MS/MS鉴定结果

Fig. 8 LC-MS/MS analysis of proteins capped on the surface of AgNPs

3.3.4 *S. coelicoflavus* 胞内硝酸还原酶活性的测定

硝酸还原酶在微生物氮素代谢过程中起关键作用。虽然微生物合成纳米银的生化机制具有物种特异性,但该过程几乎都存在NADH、还原型辅酶II(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)、依赖型硝酸还原酶、醌或萘醌等电子穿梭体以及蛋白质的参与^[22-23]。经检测,由*S. coelicoflavus*新鲜菌块制得的粗酶液中亚硝态氮的含量约为4.05 μg,代入公式得硝酸还原酶活性约为162.13 μg/(g·h)。由此推测,以上*S. coelicoflavus*

菌体细胞中存在具有一定活性的硝酸还原酶,在微生物菌体细胞的水浸提过程中可能由胞内部分释放至胞外,与微生物细胞分泌的其他生物活性组分共同催化银离子的还原过程。

4 结论

本文报道了*S. coelicoflavus*介导胞外合成高稳定性纳米银颗粒的方法。整个合成过程环境友好、绿色安全,不添加任何有毒的化学还原剂和稳定剂。具体

结论如下:

1) 通过检测纳米银合成前后反应体系中生物活性组分的含量变化可知, *S. coelicoflavus* 菌体浸出液中的蛋白质和 GSH 共同介导了纳米银胞外合成过程中的银离子还原和纳米银颗粒的稳定化。

2) 对纳米银颗粒表面包覆的蛋白质进行分离和鉴定, 结果表明 *S. coelicoflavus* 分泌的跨膜蛋白和细菌铁蛋白在纳米银颗粒形成后的稳定化过程中起到了重要的作用。

3) 通过对 *S. coelicoflavus* 胞内的硝酸还原酶活性进行检测可知, *S. coelicoflavus* 胞内的硝酸还原酶可能与其他生物活性组分共同催化了银离子的还原过程。

参考文献:

- [1] SINGH P, KIM Y J, ZHANG D B, et al. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms[J]. Trends in Biotechnology, 2016, 34(7): 588-599.
- [2] QING Y, CHENG L, LI R Y, et al. Potential Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and the Optimization of Orthopedic Implants by Advanced Modification Technologies[J]. International Journal of Nanomedicine, 2018, 13: 3311-3327.
- [3] 李嘉慧, 徐祖贤, 卢田田, 等. 纳米材料在食品包装中的应用[J]. 化工设计通讯, 2018, 44(7): 68, 146. LI Jiahui, XU Zuxian, LU Tiantian, et al. Application of Nanomaterials in Food Packaging[J]. Chemical Engineering Design Communications, 2018, 44(7): 68, 146.
- [4] 屠 度. 纳米二氧化硅及载银抗菌剂制备与表征[J]. 包装学报, 2011, 3(1): 48-52. TUO Du. Preparation and Characterization of Silver Loaded Nanosilica Antibacterial Agent[J]. Packaging Journal, 2011, 3(1): 48-52.
- [5] SALUNKE B K, SAWANT S S, LEE S I, et al. Microorganisms as Efficient Biosystem for the Synthesis of Metal Nanoparticles: Current Scenario and Future Possibilities[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(5): 88.
- [6] MA L, SU W, LIU J X, et al. Optimization for Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Penicillium aculeatum* Su1 and Their Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect Compared with Silver Ions[J]. Materials Science and Engineering: C, 2017, 77: 963-971.
- [7] ABD-ELNABY H M, ABO-ELALA G M, ABDEL-RAOUF U M, et al. Antibacterial and Anticancer Activity of Extracellular Synthesized Silver Nanoparticles from Marine *Streptomyces rochei* MHM13[J]. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 2016, 42(3): 301-312.
- [8] MA L, LIU J X, SU W, et al. Extracellular Biosynthesis, Characterization and Cytotoxic Effect of Silver Nanoparticles by *Streptomyces coelicoflavus* KS-3[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2018, 18(12): 8133-8141.
- [9] MANIMARAN M, KANNABIRAN K. Actinomycetes-Mediated Biogenic Synthesis of Metal and Metal Oxide Nanoparticles: Progress and Challenges[J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 64(6): 401-408.
- [10] NAIN S J, DEVI C S, MOHANASRINIVASAN V, et al. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 Crude Extract[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2015, 58(2): 198-207.
- [11] SHETTY P R, BUDDANA S K, TATIPAMULA V B, et al. Production of Polypeptide Antibiotic from *Streptomyces parvulus* and Its Antibacterial Activity[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2014, 45(1): 303-312.
- [12] 曾志恒, 曾 辉, 程 翊, 等. 双孢蘑菇发酵液还原糖和总糖的含量测定[J]. 中国食用菌, 2018, 37(6): 40-43, 49. ZENG Zhiheng, ZENG Hui, CHENG Yi, et al. Determination of Reducing Sugar and Total Sugar Content in Fermentation Liquid of *Agaricus bisporus*[J]. Edible Fungi of China, 2018, 37(6): 40-43, 49.
- [13] 陈 龙, 袁宏丽, 陈栋梁, 等. 发酵液中谷胱甘肽含量测定方法的比较[J]. 理化检验(化学分册), 2010, 46(8): 876-878. CHEN Long, YUAN Hongli, CHEN Dongliang, et al. Comparative Study on Methods for Determination of Glutathione in Fermentation Liquor[J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2010, 46(8): 876-878.
- [14] 宋景荣, 徐文静, 赵 曦, 等. 球孢白僵菌硝酸还原酶缺陷型突变体的筛选与鉴定[J]. 黑龙江农业科学, 2010(5): 3-6. SONG Jingrong, XU Wenjing, ZHAO Xi, et al. Screening and Identification of Nitrate Reductase-Deficient Mutants of *Beauveria bassiana*[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2010(5): 3-6.

- [15] MANIVASAGAN P, VENKATESAN J, SENTHIL-KUMAR K, et al. Biosynthesis, Antimicrobial and Cytotoxic Effect of Silver Nanoparticles Using a Novel *Nocardiopsis sp.* MBRC-1[J]. Biomed Research International, 2013, 2013: 1–9.
- [16] CHAN Y S, MAT DON M. Biosynthesis and Structural Characterization of Ag Nanoparticles from White Rot Fungi[J]. Materials Science and Engineering: C, 2013, 33(1): 282–288.
- [17] PEREIRA L, DIAS N, CARVALHO J, et al. Synthesis, Characterization and Antifungal Activity of Chemically and Fungal-Produced Silver Nanoparticles Against *Trichophyton rubrum*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 117(6): 1601–1613.
- [18] GHOLAMI-SHABANI M, AKBARZADEH A, NOROUZIAN D, et al. Antimicrobial Activity and Physical Characterization of Silver Nanoparticles Green Synthesized Using Nitrate Reductase from *Fusarium oxysporum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(8): 4084–4098.
- [19] SINGH R, SHEDBALKAR U U, WADHWANI S A, et al. Bacteriogenic Silver Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(11): 4579–4593.
- [20] ARDEJANI M S, LI N X, ORNER B P. Stabilization of a Protein Nanocage Through the Plugging of a Protein-Protein Interfacial Water Pocket[J]. Biochemistry, 2011, 50(19): 4029–4037.
- [21] ZHANG X R, HE X X, WANG K M, et al. Different Active Biomolecules Involved in Biosynthesis of Gold Nanoparticles by Three Fungus Species[J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2011, 7(2): 245–254.
- [22] KHODASHENAS B, GHORBANI H R. Optimisation of Nitrate Reductase Enzyme Activity to Synthesise Silver Nanoparticles[J]. IET Nanobiotechnology, 2016, 10(3): 158–161.
- [23] HAMED I S, GHASEMINEZHAD M, SHOKROLLAHZADEH S, et al. Controlled Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Nitrate Reductase Enzyme Induction of Filamentous Fungus and Their Antibacterial Evaluation[J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2017, 45(8): 1588–1596.

(责任编辑: 黄海波)

Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Streptomyces coelicoflavus* and Its Biochemical Synthesis Mechanism

MA Liang^{1,2}, HUANG Huiwen¹, YUN Peiyi¹, TANG Yuqi¹, LIU Xueying^{1,2}

(1. College of Life Sciences and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China;

2. Hunan Key Laboratory of Biomedical Nanomaterials and Devices, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: The cell-free filtrate of *S. coelicoflavus* was used as a reducing agent and a capping agent for the biosynthesis of low-toxic, high-stable and biocompatible silver nanoparticles (AgNPs). The morphology, crystal structure, size distribution, elemental composition and surface-capping groups of biosynthesized AgNPs were characterized. Moreover, the biochemical mechanism for the extracellular synthesis of AgNPs was also explored by analyzing the important roles of the bioactive molecules secreted by *S. coelicoflavus* during the biosynthesis process. The results demonstrated that the prepared AgNPs presented in spherical or approximately spherical shape followed by a small amount of truncated triangular, quadrangular and hexagonal nanoplates with an average particle size of 34.50 nm, mid-range polydisperse, with good crystallinity and polycrystalline structure. Proteins and reduced glutathione (GSH) secreted by *S. coelicoflavus* were responsible for the process of AgNPs biosynthesis. Transmembrane protein and bacterioferritin were capped on the surface of the prepared AgNPs to maintain the high stability of AgNPs in the reaction system. Nitrate reductase was likely to co-catalyze the reduction of silver ions with other bioactive components.

Keywords: *Streptomyces coelicoflavus*; extracellular biosynthesis; silver nanoparticles (AgNPs); microbiology; biochemical synthesis mechanism