文章编号：1001-3555(2013)02-0192-06

甲烷氧化菌素催化纳米金合成

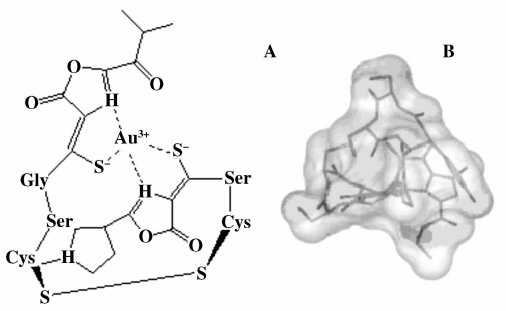
张铁男[1]，辛嘉英[1,2*]，张秀凤[1]，陈林林[1]，梁金钟[1]，夏春谷[2]
(1. 哈尔滨商业大学 食品科学与工程重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150076；
2. 中国科学院兰州化学物理研究所 羰基合成与选择氧化国家重点实验室，甘肃 兰州 730000)

摘要：甲烷氧化菌素(methanobactin，mb)是具有过氧化氢还原酶活性的荧光肽. 从甲基弯菌 *Methylosinus trichosporium* IMV3011 限铜培养介质中分离 mb，采用紫外可见全波长扫描法观察 mb 催化对苯二酚还原氯金酸合成纳米金的作用和影响，当 mb/氯金酸/对苯二酚反应液中 mb 的浓度分别是 2.5×10^{-5} mol/L、5.0×10^{-5} mol/L 和 1.0×10^{-4} mol/L 时，形成的纳米金溶液的特征峰分别是 561.5 nm($OD_{561}=0.158$)、548.0 nm($OD_{548}=0.426$)、536.5 nm($OD_{536}=0.541$)，特征峰波长减小，对应的吸光值增大，表明 mb 能够催化对苯二酚还原氯金酸合成纳米金，并且可以通过调控 mb 的浓度控制纳米金的合成量及粒径大小.

关键词：甲烷氧化菌素；催化；对苯酚；纳米金
中图分类号：O643.32　　**文献标志码**：A

纳米金不仅具备纳米微粒的通性，如表面效应、量子效应、小尺寸效应以及宏观量子隧道效应等，还具有自己独特的物理、化学性能，在纳米器件、生物医学、信息科技、肿瘤治疗、细胞成像和药物载体等领域应用广泛. 传统的制备纳米金的方法主要是物理和化学方法，这些方法需要严格的条件，耗能高，使用的试剂昂贵[1]. 如果将某些具有催化金属离子还原能力的微生物代谢产物应用到纳米金合成过程，可以使传统的物理和化学合成过程变得环境友好、可持续发展，并且反应条件温和可控，产量高，目前成为纳米金合成领域的研究热点.

许多文献报道在低铜条件下培养甲基球菌 *Methylococcus capsulatus* Bath 和甲基弯菌 *Methylosinus trichosporium* OB3b 都会向介质中释放甲烷氧化菌素(methanobactin，mb)[2-5]. mb 是一种荧光肽，在低铜环境中由甲烷氧化菌分泌到细胞外[6]，*Methylosinus trichosporium* OB3b 分泌的 mb 结构见图示 1[7-8]. 已有研究报道 mb 具有过氧化氢还原酶(Hydrogen Peroxide Reductase，HPR)活性，在无还原剂的情况下，mb 和 H_2O_2 反应体系中无氧气产生，有还原剂存在的情况下可以还原 H_2O_2 产生氧气[9].



图示 1 *Methylosinus trichosporium* OB3b 分泌的 mb 结构[3,8]
Scheme 1 Structure of mb[3,8]
A. Schematic drawing of methanobactin;
B. Crystal structure of mb

Choi 等以对苯二酚(hydroquinone，HQ)为还原剂，证明了 2 种Ⅰ型甲烷氧化菌 *Methylococcus capsulatus* Bath 和 *Methylomicrobium album* BG8 代谢产生的 Cu-mb 配合物有 HPR 活性，催化 H_2O_2 氧化 HQ[10]，我们也发现了Ⅱ型甲烷氧化菌 *Methylosinus trichosporium* IMV3011 代谢产生 Cu-mb 配合物能催化 H_2O_2 氧化 HQ. 我们采用氯金酸替换反应体系(Cu-mb/HQ/H_2O_2)中的 H_2O_2，观察 mb 是否具有催化 HQ 还原 Au(Ⅲ)为 Au(0)的能力，结果表明 mb 在有还原剂 HQ 存在条件下，可催化 HQ 将 Au

收稿日期：2012-12-12；**修回日期**：2013-02-26.
基金项目：国家自然科学基金(20873034，21073050)、黑龙江省教育厅重点项目(11551z007)和面上项目(12521138).
作者简介：张铁男(1977-)，男，博士，讲师. E-mail：hrbcu17@gmail.com.
* 通讯联系人，E-mail：xinjiaying@yahoo.com.cn.

(Ⅲ)持续还原合成纳米金，并且 mb 的浓度影响纳米金形貌粒径.

1 实验部分

1.1 试验仪器与试剂

UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司)，真空冷冻干燥机(德国 CHRIST)，透析袋 MD10(spectra 公司)，HP-20 大孔吸附树脂(Sigma 公司)，氯金酸(Sigma 公司)，HQ 分析纯 AR (Sigma 公司).

1.2 菌种与培养基

甲基弯菌 (*Methylosinus trichosporium*) IMV3011，由俄罗斯科学院催化研究所提供；培养基组成参考文献[11].

1.3 mb 的分离与纯化

将培养 5 ~ 7 d 甲基弯菌 IMV3011 的发酵液置于 4 ℃，10 000 g 条件下离心 20 min，取上清重新置于 4 ℃，10 000 g 再离心 20 min，采用动态吸附法使用活化的 Diaion HP-20 大孔径树脂 (美国 Supelco 公司，1.1 cm×80 cm 层析柱)进行吸附，再用 60% 乙醇洗脱吸附的 mb，洗脱液使用截留分子量为 500 Da 的透析袋除去其中残留的乙醇，将截留物进行真空干燥[12]，按照上述操作获得的黄褐色粉末状 mb 粗品，以备后续实验使用.

1.4 Cu-mb 催化 HQ 还原 H_2O_2 全波长扫描

将培养 5 ~ 7 d 甲基弯菌 IMV3011 的发酵液置于 4 ℃，10 000 g 离心 20 min 取上清液，上清液中添加 $CuSO_4$ 至 5 mmol/L 静置 5 h 后采用使上清液通过 HP-20 大孔吸附树脂，再用 60% 乙醇洗脱，洗脱液使用截留分子量为 500 Da 的透析袋除去其中残留的乙醇，将截留物进行真空干燥后备用，按照上述操作获得的黄褐色粉末状 Cu-mb 配合物. 在装有磷酸缓冲液的容量瓶中依次加入催化剂 Cu-mb、H_2O_2 和一定浓度的底物 HQ，并用 pH=7.0 的缓冲溶液定容至刻度，使溶液中 Cu-mb 的初始浓度为 2×10^{-5} mol/L，H_2O_2 的初始浓度为 7×10^{-3} mol/L，HQ 的初始浓度为 5×10^{4} mol/L，20 min 后对反应液进行紫外可见全波长扫描，mb 定量参考 Schwyn 建立的络天青 S 测量大肠杆菌转铁蛋白螯合铁活性方法[13].

1.5 mb 催化 HQ 还原氯金酸合成纳米金表征

配制 1.0×10^{-2} mol/L 氯金酸、5.0×10^{-4} mol/L HQ 溶液、5.0×10^{-5} mol/L mb 溶液. 取 3 支一次性比色皿中，分别编号为 1、2、3，1 中加入 1 mL 氯金酸溶液、1 mL HQ 溶液，振荡 10 min；2 中加入 1 mL 氯金酸溶液、0.8 mL mb 溶液，振荡 10 min；3 中加入 1 mL 氯金酸溶液、0.8 mL mb 溶液，振荡 10 min 后，加入 1 mL HQ 溶液，再振荡 10 min；以上 3 组每间隔一定时间进行一次紫外可见全波长扫描. 采用日本 JEOL 公司生产 JEM2100 透射电镜观察反应液微观形貌.

1.6 mb 浓度对 HQ 还原氯金酸合成纳米金影响

取 4 支一次性比色皿中，分别编号为 A、B、C、D，其中均添加 1 mL 氯金酸溶液(1.0×10^{-2} mol/L)、0.5 mL mb 溶液(浓度分别为 2.5×10^{-5}mol/L、5.0×10^{-5}mol/L、1.0×10^{-4}mol/L 和 2.0×10^{-4}mol/L)，以上 4 组振荡 10 min 后，再添加 HQ 溶液(5.0×10^{-4} mol/L)各 1 mL，振荡 10 min；以上 4 组每间隔一定时间进行一次紫外可见全波长扫描.

1.7 HQ 浓度对 mb 催化 HQ 的影响

取 5 支一次性比色皿中，分别编号为 a、b、c、d、e，每个比色皿添加 1mL 氯金酸溶液(1.0×10^{-2} mol/L)、0.5 mL mb 溶液(5.0×10^{-5}mol/L)，以上 5 组振荡 10 min 后，再添加 HQ 溶液各 1 mL(浓度分别为 1.75×10^{-4} mol/L、2.5×10^{-4} mol/L、5.0×10^{-4} mol/L、7.5×10^{-4} mol/L、1.0×10^{-3} mol/L)，振荡 10 min；以上 5 组每间隔一定时间进行一次紫外可见全波长扫描.

1.8 pH 值对 mb 催化 HQ 的影响

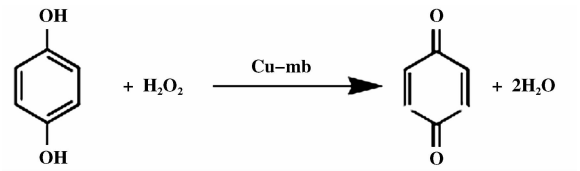
取 6 支一次性比色皿中，分别编号为 1、2、3、4、5、6，1 号比色皿加入氯金酸溶液(1.0×10^{-2} mol/L)、HQ 溶液(5.0×10^{-4} mol/L)后，pH 调整为 5，2 ~ 6 号比色皿加入氯金酸溶液(1.0×10^{-2} mol/L)、mb 溶液(5.0×10^{-5}mol/L)、HQ 溶液(5.0×10^{-4} mol/L)，pH 分别调整为 3、5、7、9、11，以上 6 组振荡 10 min 后进行紫外可见全波长扫描.

2 结果与讨论

2.1 mb 催化 HQ 还原 H_2O_2

采用紫外可见全波长扫描对 Cu-mb 催化 HQ 还原 H_2O_2 的反应进行分析，结果如图 1 所示，HQ 在 288 nm 处特征峰的吸光值降低，表明 HQ 发生了氧化反应生成对苯二醌，为证明这一推论，在相同的方法条件下用对 HQ 标准品进行紫外可见全波长扫描，结果表明 HQ 的特征吸收峰在 288 nm 处. 由于对苯二醌在 288 nm 处无紫外吸收，可利用 288 nm

的吸光值变化来研究 mb 催化 HQ 还原 H_2O_2. 图 1 显示 Cu-mb 可以催化 HQ 还原 H_2O_2，电子可以由 HQ 经 Cu 传给 H_2O_2，进而推测也可能由 HQ 传给 Au-mb 配合物中的 Au(Ⅲ)并将其还原. mb 催化 HQ 还原 H_2O_2 催化反应方程式如下：



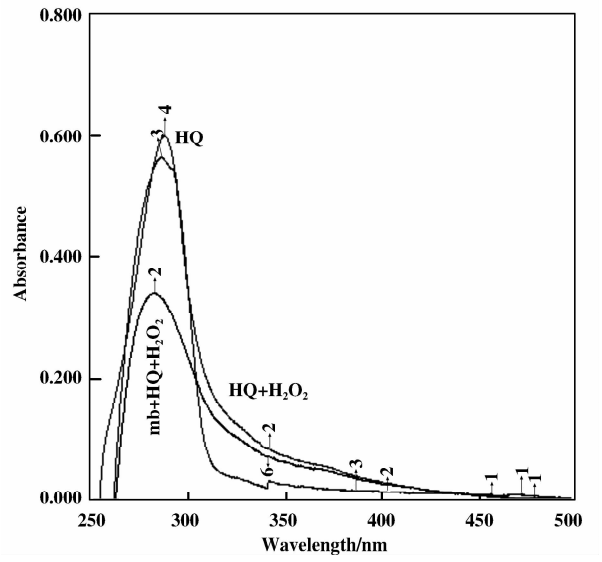


图 1 Cu-mb 催化 HQ 还原 H_2O_2

Fig. 1 HQ reduction of H_2O_2 catalyzed by Cu-mb

2.2 mb 催化对苯酚还原氯金酸合成纳米金

金纳米颗粒具有独特的光学性质——表面等离子体共振(surface plasma resonance, SPR)性质[14-15]，所以分别对 HQ/氯金酸、mb/氯金酸、mb/氯金酸/HQ 反应液进行紫外-可见全波长光谱分析，如图 2 所示，HQ/氯金酸反应液紫外可见全波长光谱在 500～700 nm 范围内无特征峰出现，这说明 HQ/氯金酸反应液中无纳米金合成，与 Perrault 实验结论相符[4]. mb 与氯金酸反应一定时间后紫外可见全波长光谱在 552.0 nm (OD_{552} = 0.066) 附近出现特征峰，mb/氯金酸反应液振荡 10 min 后再添加 HQ 的反应液紫外可见全波长光谱在 550.5 nm (OD_{550} = 0.361)附近出现特征峰，并且与 mb/氯金酸反应液相比吸光值增大，另外从图 2 样品的透射电子显微镜图片可以看出 mb/氯金酸、mb/氯金酸/HQ 反应液中均有纳米金合成，这说明 mb 能够催化 Au(Ⅲ)还原形成纳米金，但由于没有电子供体，产生的纳米金含量很少，而 HQ 能够作为 mb 催化 Au(Ⅲ)还原的电子供体，用于 mb 催化 HQ 还原氯金酸纳米金合成反应.

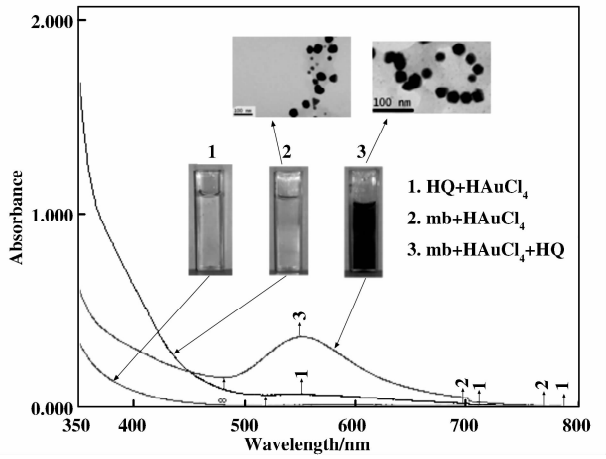


图 2 氯金酸/HQ/mb 反应液紫外可见全波长扫描和透射电子显微镜

Fig. 2 UV-visible absorption spectra and TEM of $HQ/HAuCl_4$/mb reaction mixture

2.3 提高 mb 浓度促进 HQ 还原氯金酸合成纳米金

紫外可见全波长光谱特征峰对应的吸光值与纳米颗粒量成正比，紫外可见全波长光谱特征峰对应的波长与粒径大小成反比[16]，mb 浓度对催化 HQ 还原氯金酸合成纳米金产量的影响如图 3 所示，当 mb/氯金酸/HQ 反应液中 mb 的浓度分别是 2.5×10^{-5} mol/L、5.0×10^{-5} mol/L、1.0×10^{-4} mol/L 时，特征峰分别是 561.5 nm (OD_{561} = 0.158)、548.0 nm (OD_{548} = 0.426)、536.5 nm (OD_{536} = 0.541). 紫外可见全波长光谱特征峰出现蓝移且峰形分布变窄，说明随着反应液中 mb 浓度的增加，反应合成的纳米金粒径有变小的趋势；特征峰对应的吸光值增加，说明随着反应液中 mb 浓度的增加，合成纳米金的浓度也在增加，mb 浓度影响其催化 HQ 还原氯金酸合成纳米金. 但是，当反应液中 mb 的浓度提高到 2.0×10^{-4} mol/L，紫外可见全波长光谱特征峰出现在 553.0 nm (OD_{553} = 0.195)附近，对应的吸光值也在减小，表明 mb/氯金酸 HQ 反应液中合成的纳米金在减少，粒径却在增大，这可能是由于 mb 的 4-硫酰-5-羟唑酮和 4-羟基-5-硫酰咪唑基团(图示 1)具有螯合金离子的活性，当 mb 浓度增加到一定程度时，反而降低了参与纳米金合成反应的金离子浓度，导致 mb/氯金酸/HQ 反应液中合成的纳米金

量减少，粒径变大[17].

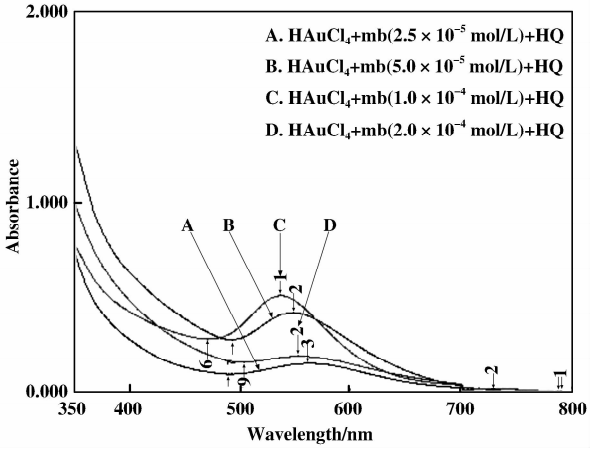


图 3 不同 mb 浓度对合成纳米金的影响

Fig. 3 The effect of mb concentration on the synthesis of gold nanoparticles

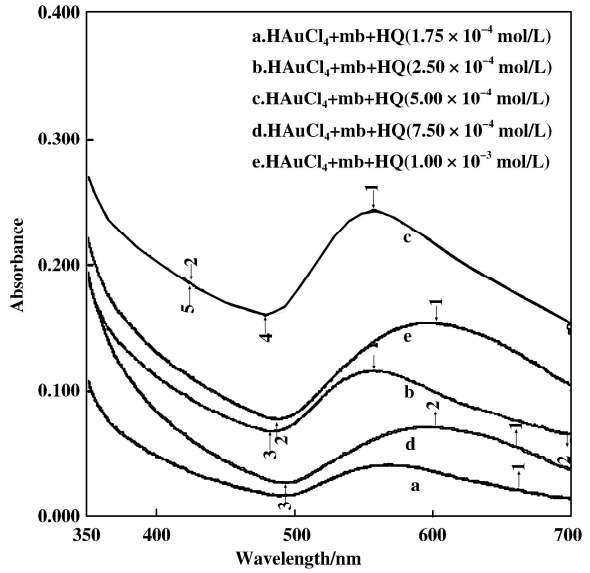


图 4 不同 HQ 浓度对合成纳米金的影响

Fig. 4 The effect of HQ concentration on the synthesis of gold nanoparticles

2.4 提高 HQ 浓度增加合成纳米金的量

HQ 浓度对 HQ 还原氯金酸合成纳米金产量的影响如图 4 所示，当 mb/氯金酸/HQ 反应液中 HQ 的浓度分别是 1.75×10^{-4} mol/L、2.50×10^{-4} mol/L、5.00×10^{-4} mol/L、7.50×10^{-4} mol/L、1.00×10^{-3} mol/L 时，特征峰分别是 661.0 nm（OD_{661} = 0.022）、557.0 nm（OD_{557} = 0.116）、556.0 nm（OD_{556} = 0.244）、601.0 nm（OD_{601} = 0.072）、602.0 nm（OD_{602} = 0.154）. 紫外可见全波长光谱特征峰吸光值先增加后减少，这说明 HQ 浓度过低不能为 Au(Ⅲ)提供足够的电子还原为 Au(0)，HQ 浓度过高提供过量的电子导致 Au(0)粒子团聚，在 1.75 ~ 5.0×10^{-4} mol/L 浓度范围内，HQ 提供电子的数量与还原氯金酸合成纳米金的量成正比.

2.5 弱酸体系还原氯金酸合成纳米金

pH 对 HQ 还原氯金酸合成纳米金的影响如图 5 所示，当 mb/氯金酸/HQ 反应液中 pH 分别是 3、5、7、9、11 时，紫外可见全波长光谱特征峰分别是 549.5 nm（$OD_{549.5}$ = 0.055）、549.5 nm（$OD_{549.5}$ = 0.329）、539.0 nm（OD_{539} = 0.332）、539.0 nm（OD_{539} = 0.176）、546.0 nm（OD_{546} = 0.351），氯金酸/HQ 反应液中 pH 为 5，特征峰是 551.0 nm（$OD_{551.0}$ = 0.022）. 紫外可见全波长光谱特征峰吸光值的变化，说明 pH 分别为 5、7 和 11 时合成纳米金的量比较大，但是 Sirajuddin 研究结果显示当 pH 为 7 以上时，HQ 还原氯金酸合成纳米金反应剧烈

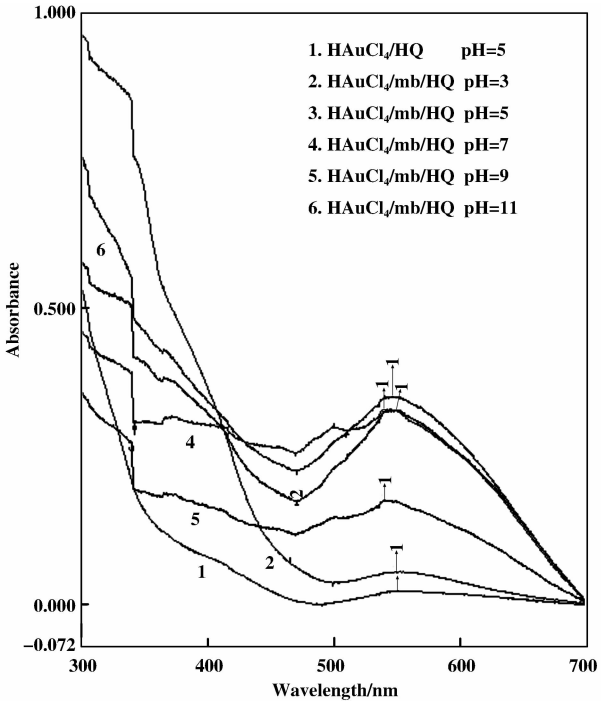


图 5 不同 pH 对合成纳米金的影响

Fig. 5 The effect of pH on the synthesis of gold nanoparticles

形成沉淀，本实验结果与此结论一致[18]. 观察 mb/氯金酸/HQ(pH = 5)与/氯金酸/HQ(pH = 5)的紫外可见全波长光谱发现，含有 mb 的反应液中有大量的纳米金合成，而不含 mb 反应液紫外可见全波长光谱特征峰吸光值很小(见图 5)，说明 mb 在

弱酸环境中(pH=5)具有催化 HQ 还原氯金酸合成纳米金生物活性.

3 结 论

通过氯金酸/HQ 和 mb/氯金酸/HQ 反应体系紫外可见全波长扫描结果差异,说明 mb 具有 HPR 活性,以 HQ 为还原剂将 Au(Ⅲ)还原为 Au(0)合成纳米金. 同时由于 mb 具有螯合金属离子的活性,所以在 mb/氯金酸/对苯酚反应体系中,调控 mb 浓度可以影响纳米金的大小和产量,反应体系中 mb 的最佳浓度是 1.0×10^{-4} mol/L. 我们的研究为 HQ 还原氯金酸合成纳米金提供了一种微生物源催化剂.

参考文献:

[1] Castro-Longoria E, Vilchis-Nestor A R, Avalos-Borja M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa* [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, **83** (1): 42-48.

[2] Zahn J A, DiSpirito A A. Membrane-associated methane monooxygenase from *methylococcus capsulatus* bath[J]. *J Bacteriol*, 1996, **178** (4): 1018-1029.

[3] Knapp C W, Fowle D A, Kulczycki E, *et al.* Methane monooxygenase gene expression mediated by methanobactin in the presence of mineral copper sources[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104** (29): 12040-12045.

[4] Perrault S D, Chan W C. Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50-200 nm. *J Am Chem Soc*, 2009, **131** (47): 17042-17043.

[5] DiSpirito A A, Zahn J A, Graham D W, *et al.* Copper-binding compounds from *methylosinus trichosporium* OB3b. *J Bacteriol*, 1998, **180**(14): 3606-3613.

[6] Fitch M W, Graham D W, Arnold R G, *et al.* Phenotypic characterization of copper-resistant mutants of methylosinus trichosporium OB3b[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(9): 2771-2776.

[7] Behling L A, Hartsel S C, Lewis D E, *et al.* NMR, mass spectrometry and chemical evidence reveal a different chemical structure for methanobactin that contains oxazolone rings[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(38): 12604-12605.

[8] Kim H J, Graham D W, DiSpirito A A, *et al.* Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane-oxidizing bacteria [J]. *Science*, 2004, **305** (5690): 1612-1615.

[9] Choi D W, Kunz R C, Boyd E S, *et al.* The membrane-associated methane monooxygenase (pMMO) and pMMO-NADH: Quinone oxidoreductase complex from*methylococcus capsulatus* bath[J]. *J Bacteriol*, 2003, **185** (19): 5755-5764.

[10] Choi D W, Semrau J D, Antholine W E, *et al.* Oxidase, superoxide dismutase, and hydrogen peroxide reductase activities of methanobactin from types I and II methanotrophs[J]. *J Inorg Biochem*, 2008, **102**(8): 1571-1580.

[11] Xin J Y, Zhang Y X, Zhang S, *et al.* Methanol production from CO(2) by resting cells of the methanotrophic bacterium methylosinus trichosporium IMV 3011[J]. *J Basic Microbiol*, 2007, **47**(5): 426-435.

[12] Bandow N L, Gallagher W H, Behling L, *et al.* Isolation of methanobactin from the spent media of methane-oxidizing bacteria[J]. *Methods Enzymol*, 2011, **495**: 259-269.

[13] Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. *Anal Biochem*, 1987, **160**(1): 47-56.

[14] El-Sayed I H, Huang X, El-Sayed M A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer[J]. *Nano Lett*, 2005, **5**(5): 829-834.

[15] Liang H P, Wan L J, Bai C L, Jiang L. Gold hollow nanospheres: tunable surface plasmon resonance controlled by interior-cavity sizes [J]. *J Phys Chem B*, 2005, **109**(16): 7795-7800.

[16] Daniel M C, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology [J]. Chem Rev, 2004, **104**: 293-346.

[17] Choi D W, Do Y S, Zea C J, *et al.* Spectral and thermodynamic properties of Ag(I), Au(III), Cd(II), Co(II), Fe(III), Hg(II), Mn(II), Ni(II), Pb(II), U(IV), and Zn(II) binding by methanobactin from Methylosinus trichosporium OB3b [J]. *J Inorg Biochem*, 2006, **100**(12): 2150-2161.

[18] Sirajuddin, Mechler A, Torriero A, *et al.* The formation of gold nanoparticles using hydroquinone as a reducing agent through a localized pH change upon addition of NaOH to a solution of $HAuCl_4$[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010, **370**(40603): 35-41.

Methanobactin-catalyzed Synthesis of Gold Nanoparticles

ZHANG Tie-nan [1], XIN Jia-ying [1,2*], ZHANG Xiu-feng [1], CHEN Lin-lin[1], LIANG Jin-zhong[1], XIA Chun-gu [2]

(1. *Key Laboratory for Food Science and Engineering*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150076, *China*;
2. *State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation*, *Lanzhou Institute of Chemical Physics*, *Chinese Academy of Sciences*, *Lanzhou* 730000, *China*)

Abstract: Methanobactin(mb) is a fluorescent peptide that appears to function of hydrogen peroxide reductase. The mb was found to be accumulated in the spent medium of *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 under copper-limited condition. The role and impact of mb catalysis on the synthesis of gold nanoparticles by hydroquinone reduction of a chloroauric acid ($HAuCl_4$) was observed by the UV-visible absorption spectra. Characteristic peaks of gold nanoparticles was 561.5 nm($OD_{561}=0.158$), 548.0 nm($OD_{548}=0.426$), 536.5 nm($OD_{536}=0.541$) when the mb concentration in mixture was 2.5×10^{-5} mol/L, 5.0×10^{-5} mol/L, 1.0×10^{-4} mol/L, respectively. Wavelength of characteristic peak decreased with increasing absorption value. The results suggested that the synthesis of gold nanoparticles by hydroquinone reduction of a $HAuCl_4$ can be catalyzed by mb, and the synthetic quantity and the size of gold nanoparticles can be controlled by regulating the concentration of mb as well.

Key words: methanobactin; catalysis; hydroquinone; gold nanoparticles