Vol. 30, No. 3 Jun. 2016

文章编号:1001-3555(2016)03-0276-06

甲烷氧化菌素介导一步法合成纳米银

范洪臣¹,辛嘉英^{1,2},王 艳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:以硝酸银为前体物,甲烷氧化菌素(Mb)将Ag(I)还原Ag(0),并形成纳米银粒子(AgNPs),同时Mb吸附 在形成的AgNPs表面,起到保护剂作用避免AgNPs聚集沉淀.采用紫外-可见光谱、荧光光谱、红外光谱、透射电 镜和X射线电子能谱等对合成的AgNPs粒子过程、Mb合成AgNPs官能团、AgNPs形貌和AgNPs结构及价态等进 行了分析.结果表明Mb可以一步法合成AgNPs离子.

关键词:甲烷氧化菌素;纳米银粒子;一步法

中图分类号: 0643.32 文献标志码: A

纳米银粒子(AgNPs)在显影、催化剂、抗菌材 料领域广泛应用^[1],许多方法可以制备 AgNPs,如 化学还原法、模板法、电化学法、超声辅助还原法、 光催化还原法,微波辅助合成,辐射还原法等^[2]. 在这些还原方法里化学还原法因在短时间内可以产 生大量的 AgNPs 而广为采用, 最常用的还原剂为柠 檬酸钠^[3-4]和硼氢化钠^[5-6].还有些化学还原剂像 胺类、醇类、膦类和植物提取液用于合成 AgNPs^[7],但合成条件稍有不适会使纳米粒子聚集 形成大颗粒,从而导致失去 AgNPs 的一些优良性 质. 通常防止聚集加入一些有机保护剂如表面活性 剂、聚合物等稳定剂,这些有机化合物能够阻止纳 米粒子间的接触起到防止聚集的作用. 大多数化学 合成 AgNPs 反应需要高温且要加入保护剂, 过程比 较复杂,而且很多化学试剂是有毒的^[2],因此寻找 一种简单绿色合成 AgNPs 的物质是十分必要的. Mb 是由甲烷氧化菌向胞外分泌的与铜结合的小 肽^[8], MethylosinustrichosporiumOB3b 产 Mb 分子量 大小为1 154.26 Da, 化学组成 C45 N12 O14 H62 S5 其结 构见图 1^[9]. Mb 除与铜结合外也能与金、铁、镍、 锌、钴、钙和汞等金属结合^[10]. Mb 能够将 Au (III)还原成 Au (0)形成纳米金, Mb 起到双重 作用既为还原剂又为保护剂^[8].同时 Mb 介导合成 的纳米金在大小和形态上与其他方法相比有着明显



图 1 Methylosinustrichosporium OB3b 产 Mb 结构图 Fig. 1 Proposed structure of Mb from Methylosinustrichosporium OB3b

我们以硝酸银为前体,用 Mb 一步法合成 Ag-NPs,并利用紫外-可见光谱、荧光光谱、红外光谱、 透射电镜和 X 射线电子能谱等对样品进行了表征,

收稿日期: 2016-04-11;修回日期: 2016-04-27.

基金项目:国家自然科学基金(NO.21073050);国家自然科学基金(NO.21573055)(The National Natural Science Foundation of China (NO. 21073050)); The National Natural Science Foundation of China (NO.21573055)).

作者简介:范洪臣(1978-),男,博士研究生.研究方向:生物催化.(Fan Hong-chen(1978-), male, phD. Research field: biocatalysis).

^{*} 通讯联系人, E-mail: xinjiayingvip@163.com.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

硝酸银(分析纯)购自中国国药集团化学试剂 有限公司,Mb制备见文献[8].紫外-可见分光光 度计:UV-2550型,日本Shimadzu公司;荧光光谱 仪:F-7000型,日本Hitachi公司;冷冻干燥机: FDU-1200型,日本TOKOY RIKAKIKAI公司;透射 电镜:JEM-2100F型,日本JEOL公司;高速冷冻离 心机:2-16K型,美国Sigma公司;红外光谱仪: PerkinElmer100型,美国PerkinElmer公司;X射线 光电子能谱仪:K-Alpha型,美国ThermoFisher公 司;旋转蒸发仪:RV8V型,德国IKA公司;恒温振 荡器:哈尔滨东联电子技术开发公司;发酵 罐:5BG型,上海保兴生物设备工程公司;蛋白层 析系统:上海金达生化仪器公司;超声波细胞粉 碎机:JY92-IIDN型,宁波新芝生物科技股份有限 公司.

1.2 Mb 合成 AgNPs

将 100 μL 1×10⁻² mol L⁻¹ 氯化银加入装有 2 mL 2.5×10⁻⁴mol L⁻¹、5×10⁻⁴mol L⁻¹和 10×10⁻⁴mol L⁻¹Mb 的小玻璃试管中,获得不同 Ag(I)与 Mb 摩 尔比反应液, pH 自然,在 50 ℃反应 4 h,溶液变为 亮黄色出现说明 AgNPs 合成出来.

1.3 Mb 合成 AgNPs 的表征

取 Mb 与 AgNO₃ 反应一定时间的溶液加入到石 英比色皿中,在 Shimadzu UV-2550 紫外分光光度计 下进行 200~800 nm 的波长扫描;形成的 AgNPs 粒 子中银元素的化合价用 Thermo Fisher K-Alpha 型 X 射线电子能谱仪检测; Mb 与硝酸银反应过程在荧 光光度仪(HitachiF-7000)以激发波长 335,发射狭 缝 5.0 nm,电压为 700 V,扫描速度为 2 400 nm/ min 检测下进行;纳米金粒子在红外光谱仪(PE Spectrum Two FT-IR)扫描波长 450~4 000 cm⁻¹ 进 行; AgNPs 粒径大小和形貌在 JEM-2100 电子透射 电镜(TEM)速电压 200 kV 下观察.

2 结果与讨论

2.1 Mb 合成 AgNPs 紫外光谱分析

紫外光谱用来表征不同浓度 Mb 对 AgNPs 合成的影响如图 2.

从图 2 中可以看出紫外吸收强度随着 Mb 浓度



国之小时低度 MD 广市风 AgNYs 桠丁系外图 Fig. 2 UV-vis spectra of the AgNPs at different Mb concentrations

增加(2.5×10⁻⁴ mol L⁻¹到 10.0×10⁻⁴ mol L⁻¹)而增 大,紫外吸收波长位置分别在437、424 和418 nm. Dubas^[11]、Limsavarn^[12]和 Vahid^[13]发现了 AgNPs 在380~450 nm 之间有紫外吸收,紫外吸收波长位 置随着 AgNPs 粒子的增大出现红移,而 AgNPs 粒 子的减小出现蓝移的规律. 从图 2 可以看出在 400~450 nm 有紫外吸收且随着 Mb 浓度的增大紫 外吸收位置出现蓝移,按照 Dubas、Limsavarn 和 Vahid 发现的规律判断 AgNPs 随着反应中 Mb 浓度 的增大粒径在减小.

2.2 Mb 合成 AgNPs 荧光光谱分析

荧光光谱对 AgNPs 合成的影响如图 3.



图 3 Mb 在不同时间合成 AgNPs 过程中荧光图 Fig. 3 Fluorescent spectra of Mb (excited at 335nm) prepared at different reaction time

从图 3 得出,激发光波长 335 nm 下发射光波 长 435 nm 有特征的荧光光谱,随着反应时间增长 荧光强度减小,最后完全淬灭.众所周知 Mb 的氧 唑环在溶液中具有荧光性^[14],Mb 在激发光波长 335 nm 下发射光波长 435 nm 有特征的荧光光 谱^[8].从图中得出反应开始时 Mb 具有完整的氧唑 环结构,此时荧光强度最大,随着反应进行,Mb 与 硝酸银反应氧唑环结构受到了破坏,荧光强度逐渐 变小.从荧光光谱判断 Mb 的氧唑环在合成 AgNPs 的反应中发挥了作用.

2.3 Mb 合成 AgNPs 红外光谱分析

Mb 反应前后红外光谱和 AgNPs 红外光谱如图 4 所示.

从图 4 通过 Mb 反应前后(曲线 b 和曲线 c) 红外光谱对比发现在波长 1 640.5 和 1 608.4 cm⁻¹ 处出现不同,可以得出 Mb 参与还原反应,官 能团变化导致反应前后红外波长变化,而在先前研 究纳米钯合成中证实 Mb 氧唑环的变化导致了红外 光谱 1 640.5 和 1 608.4 cm⁻¹ 的变化,从红外光谱 图判断氧唑环在合成 AgNPs 的反应中发挥了作用. 对 AgNPs 进行红外光谱分析,在红外图谱上出现了



图 4 Mb 合成 AgNPs(a)、反应前 Mb 和反应后 Mb 红外光谱图

Fig. 4 Typical FT-IR spectra of the AgNPs synthesized by Mb and the FT-IR spectra of the Mb before reaction (b) and the Mb after reaction(c)

隶属 O—H 键(3 425.2 cm⁻¹)的伸缩振动和 C=C 或 C=O 双键(1 608.4 cm⁻¹)伸缩振动,说明 Ag-NPs 有 Mb 附着.

2.4 Mb 合成 AgNPs 电镜图片分析

Mb 合成的 AgNPs 的大小和形貌如图 5 所示.



图 5 不同浓度 Mb(A=2.5×10⁻⁴ mol L⁻¹; B=5×10⁻⁴ mol L⁻¹; C=10.0×10⁻⁴ mol L⁻¹)下合成 AgNPs 透射电镜图及 粒径大小分布图

Fig. 5 TEM images of the AgNPs synthesized at the different concentrations of Mb (A=2.5×10⁻⁴ mol L^{-1} ; B=5×10⁻⁴ mol L^{-1} ; C=10.0×10⁻⁴ mol L^{-1}) with particle size distribution diagram

从图 5 得出随着 Mb 浓度的增大,合成的 Ag-NPs 粒径在变小,分别为 26.08±7.89 nm, 22.77± 5.59 nm, 16.78.±3.43 nm,电镜图可以得出 Mb 的 浓度对合成的 AgNPs 粒径影响是比较大的,可以调 整 Mb 浓度获得相应 AgNPs.同时验证了紫外吸收 取得的 AgNPs 粒径大小与蓝移规律与电镜图片中 AgNPs 粒子大小规律是对应的.

2.5 Mb 合成 AgNPs 电子能谱分析

Mb 合成的 AgNPs Ag 3d_{5/2}和 Ag 3d_{3/2} 电子能谱 图如图 6 所示, Mb 合成的 AgNPs 表面元素电子能 谱图如 7 所示.









图 7 AgNPs 表面元素电子能谱图 Fig. 7 XPS spectra of the surface elements of the AgNPs

从图 6 可以得出 Ag 3d_{5/2} 为 367.9 eV, Ag 3d_{3/2} 为 373.9 eV, 所得的结果与文献[15]报道的是一致 的.同时从图 7 电子能谱还可以得出 AgNPs 粒子表 面有 C, O 和 N 元素存在,这些元素说明 AgNPs 粒 子表面有 Mb 残留.

2.6 Mb 合成 AgNPs 机制

红外光谱图 4 曲线 a 1 608 cm⁻¹ 消失, 曲线 b 1 640 cm⁻¹ 出现新的吸收峰,由图 1Mb 结构,根据 SadtlerHandbook 查的红外数据可知 1 608 cm⁻¹ 红外 峰与氧唑环的—C==C 和—C==N 共轭有关,氧唑 环将 Ag(I)结合并将之还原,—C==C 或—C==N 提供电子并被氧化导致共轭结构被破坏 1 608 cm⁻¹ 消失,而—C==C (1 640 cm⁻¹)得到强化.从荧光图 谱 3 得出荧光基团淬灭看也能推断氧唑环与 Ag 结 合发生了反应导致荧光基团受到破坏.从电子能谱 图 7 分析看 AgNPs 有 C、O 和 N 元素存在,这些元 素可能是与 AgNPs 结合的—C==O 或者 N 基团,功 能基团来自 Mb,从红外光谱也可以说明 AgNPs 粒 子有 Mb 结合.这也解释了 AgNPs 放置较长时间不 聚集沉淀的原因.根据以上分析推测 Mb 合成的 AgNPs 机制如图 8 所示.



图 8 Mb 合成 AgNPs 的可能机制 Fig. 8 Proposed mechanism of the formation of AgNPs by Mb

3 结论

Mb 能以硝酸银为前体将 Ag(I)一步还原为 Ag(0)生成 AgNPs, Mb 既起到还原剂作用又起到 稳定剂的作用.通过荧光光谱,红外光谱,电镜和 电子能谱等发现 AgNPs 离子生成过程中 Mb 结构中 氧唑环起到了还原作用.

参考文献:

- Junejo Y, Karaoĝlu E, Baykal A, et al. Cefditorene-mediated synthesis of silver nanoparticles and its catalytic activity[J]. J Inorg Org J Inorg Org Pol Mater, 2013, 23(4): 970–975.
- [2] Zhang W Z, Qiao X L, Chen J G. Synthesis of silver nanoparticles-effects of concerned parameters in water/oil microemulsion[J]. *Mater Sci Engin*: B, 2007, 142(1): 1–15.
- [3] Felicia A. Enhanced localized surface plasmon resonance dependence of silver nanoparticles on the stoichiometric ratio of citrate stabilizers[J]. J Nan Res, 2013, 15(5): 1442-1455.
- [4] Pham V D , Chu H H, Le T B, et al. Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nano-particles [J]. Inter Nan Lett, 2012, 2(1): 1–9.
- [5] Wei H, Li J, Wang Y L, et al. Silver nanoparticles coated with adenine: Preparation, self-assembly and application in surface-enhanced ramanscattering[J]. Nanotechnology, 2007, 18(17): 175610-17615.
- [6] Sergeev B M, Lopatina L I, Prusov A N, et al. Formation of silver clusters by borohydride reduction of AgNO₃ in polyacrylate aqueous solutions [J]. Coll J, 2005, 67 (1): 72-78.
- [7] Stuart T G, Stephen J F, Krchnavek R. Controlled particle growth of silver sols through the use of hydroquinone as a selective reducing agent [J]. Langmuir, 2009, 25 (5): 2613-2621.
- [8] Xin J Y, Cheng D D, Zhang L X, et al. Methanobactinmediated one-step synthesis of gold nanoparticles[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(11): 21676-21688.
- [9] Benjamin D K, Heidi J M, Jeremy D S, et al. A comparison of methanobactins from methylosinus trichosporium OB3b and methylocystis strain SB2 predicts methanobactins are synthesized from diverse peptide precursors modified to create a common core for binding and reducing copper ions [J]. Biochem, 2010, 49 (47): 10117 – 10130.

- [10] Choi D W, Zea C J, Do Y S, et al. Spectral, kinetic, and thermodynamic properties of Cu (I) and Cu (II) binding by methanobactin from methylosinustrichosporium OB3b[J]. Biochem, 2006, 45(5): 1442–1453.
- [11] Dubas S T, Pimpan V. Humic acid assisted synthesis of silver nanoparticles and its application to herbicide detection[J]. *Mater Lett*, 2008, 62(17/18): 2661-2663.
- [12] Limsavarn L, Sritaveesinsub V, Dubas S T. Polyelectrolyte assisted silver nanoparticles synthesis and thin film formation[J]. *Mater Lett*, 2007, 61 (14/15): 3048-3051.
- [13] Vahid B, Majid M, Tayebeh T, et al. Photochemical reduction of silver nitrate to nano silver using stannous chlortde, CTAB and daylight irradiation[J]. Nan: Appl Pro, 2011, 1(1): 183-190.
- [14] Choi D W, Zea C J, Do Y S, et al. Spectral, kinetic, and thermodynamic properties of Cu (I) and Cu (II) binding by methanobactin from methylosinustrichosporium OB3b[J]. Biochem, 2006, 45(5): 1442–1453.
- [15] Kang F X, Pedro J A, Zhu D-Q. Microbial extracellular polymeric substances reduce Ag⁺ to silver nanoparticles and antagonize bactericidal activity [J]. *Envir*, Sci. *Technol*, 2014, **48**(1): 316–322.

Methanobactin-Mediated One-Step Synthesis of Silver Nanoparticles

FAN Hong-chen¹, XIN Jia-ying^{1,2}, WAN Yan¹, XIA Chun-gu²

(1. Key Laboratory for Food Science & Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. State Key Laboratory for Oxo Synthesis & Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics,

Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Silver nanoparticles (AgNPs) were prepared by reduction method in which silver nitrate was taken as the metal precursor and Methanobactin(Mb) was principally responsible for the catalyzed reduction of Ag(I) to Ag(0) and the stabilization of AgNPs. UV – vis spectroscopy, Fluorescent spectra, Fourier transform infrared, Transmission electron microscopy (TEM) and X-ray photoelectron spectroscopy were used to characterize the synthetic AgNPs. The formations of the AgNPs were monitored using UV-Vis absorption spectroscopy. Functional groups in Mb were located using Fluorescent spectra and Fourier transform infrared. The spherical morphology and size of the AgNPs were confirmed using TEM. XPS was used to study the elemental valence of AgNPs. A mechanism for the formation of AgNPs was proposed in the presence of Mb. Moreover, the size of the resultant AgNPs could be easily tuned by changing the ratio of Mb to silver nitrate.

Key words: silver nanoparticles; methanobactin; one-step

欢迎订阅《分子催化》

《分子催化》是由中国科学院主管、科学出版社出版,由中国科学院兰州化学物理研究所主办的向国内 外公开发行的学术刊物.主要报导有关分子催化方面的最新进展与研究成果.辟有学术论文、研究简报、 研究快报及进展评述等栏目.内容侧重于络合催化、酶催化、光助催化、催化过程中的立体化学问题、催化 反应机理与动力学、催化剂表面态的研究及量子化学在催化学科中的应用等.工业催化过程中均相催化 剂、固载化的均相催化剂、固载化的酶催化剂等的活化、失活和再生,以及用于新催化过程的催化剂的优选 与表征等方面的稿件,本刊也很欢迎.读者对象主要是科研单位及工矿企业中从事催化工作的科技人员、 研究生、高等院校化学系和化工系师生.欢迎相关专业人员投稿.

本刊为双月刊,每逢双月末出版,大16开本,约16万字,每册定价30.00元.

本刊为国内外公开发行. 中国标准刊号: ISSN 1001-3555/CN 62-1039/O6. 邮发代号: 54-69. E-mail 信 箱: FZCH@ licp. cas. cn 网址: www.jmcchina. org 通过兰州市邮局发行. 亦可向本刊编辑部直接函购.

本部地址:甘肃兰州市中国科学院兰州化学物理研究所《分子催化》编辑部 邮政编码:730000;电话:(0931)4968226;传真:(0931)8277088.