



(21) 申请号 202211509934.9

(22) 申请日 2022.11.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115838770 A

(43) 申请公布日 2023.03.24

(83) 生物保藏信息
CCTCC NO:M 20221472 2022.09.21

(73) 专利权人 安徽科技学院
地址 233100 安徽省滁州市凤阳县东华路

(72) 发明人 黄胜威

(74) 专利代理机构 合肥市浩智运专利代理事务
所(普通合伙) 34124
专利代理师 缪璐欢

(51) Int.Cl.

C12P 3/00 (2006.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

C12R 1/07 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105420280 A, 2016.03.23

CN 106190905 A, 2016.12.07

CN 109402007 A, 2019.03.01

CN 109504635 A, 2019.03.22

CN 114686395 A, 2022.07.01

US 2010189634 A1, 2010.07.29

审查员 冯晓亮

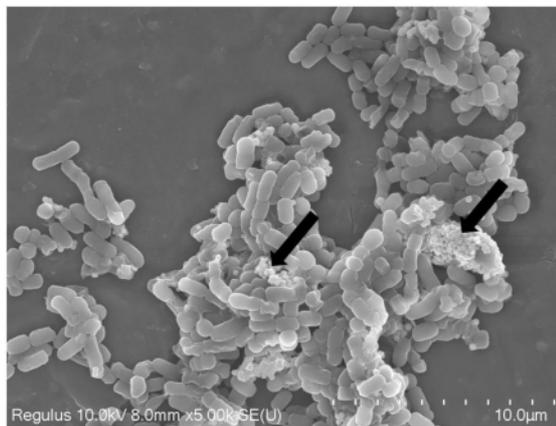
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种利用芽孢杆菌Bacillus.sp HZ3制备生物纳米硒的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用芽孢杆菌Bacillus.sp HZ3制备生物纳米硒的方法,具体涉及微生物应用技术领域。本发明选育的芽孢杆菌Bacillus.sp HZ3可以高效还原亚硒酸钠,生产纳米硒SeNPs。制备方法包括以下步骤:(1) 高效亚硒酸钠还原微生物的培养;(2) 添加诱导剂;(3) 添加亚硒酸钠;(4) 诱导培养;(5) 分离提取生物纳米硒。有益效果:本发明根据芽孢杆菌Bacillus.sp HZ3还原亚硒酸钠的特点,在培养过程中添加有助于增强纳米硒外排到胞外的诱导剂,并通过低温诱导培养-常温培养相结合的方法,最大程度提高纳米硒的胞外合成效率。



1. 一种利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 高效亚硒酸钠还原微生物的培养:挑取*Bacillus.sp* HZ3单菌落,加入至YSP培养基中培养,至培养基中*Bacillus.sp* HZ3菌群数量达到 10^7 CFU/mL,获得菌种培养液;

(2) 添加诱导剂:向步骤(1)获得的培养液中,加入诱导剂,继续培养至培养液中*Bacillus.sp* HZ3菌群数量达到 10^8 - 10^9 CFU/mL;所述诱导剂为谷胱甘肽,硝酸钠,CTAB, Triton X-114中的一种或多种;

(3) 添加亚硒酸钠:向步骤(2)获得的培养液中,加入亚硒酸钠溶液;

(4) 诱导培养:亚硒酸钠添加完成后,先采用低温培养,再转入常温培养,至培养液颜色由无色变为红色,颜色不再继续加深时,视为培养中亚硒酸钠全部被还原,培养完成;

(5) 分离提取生物纳米硒:将步骤(4)获得的培养液置于负压膜过滤器中,收集滤液,将滤液进行离心操作,收集沉淀,重溶于TE缓冲液中,即为生物纳米硒初提物;

所述芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3的保藏编号为:CCTCC NO:M 20221472;

所述步骤(4)中低温是指15-20℃,常温是指28-37℃;先采用低温培养,再转入常温培养具体为:先在15-20℃,150-200rpm振荡培养12-18h,随后在28-37℃,150-200rpm振荡培养2-3天。

2. 根据权利要求1所述的利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法,其特征在于,所述步骤(1)中的YSP液体培养基由蛋白胨5-10g,牛肉浸粉5-10g,酵母粉5-10g,无水氯化钙0.01-0.05g,无水硫酸镁0.02-0.08g,生物素2-8mg,纯水1000mL制成。

3. 根据权利要求1或2所述的利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法,其特征在于,所述步骤(2)中诱导剂的浓度为1-10mg/L。

4. 根据权利要求3所述的利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法,其特征在于,所述步骤(3)中亚硒酸钠溶液的浓度为1mol/L,所述亚硒酸钠溶液与培养液的体积比为(2-5):1000。

5. 根据权利要求1所述的利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法,其特征在于,所述步骤(5)中离心的转速为20000-30000r/min,时间10-20min。

6. 根据权利要求1所述的利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法,其特征在于,所述步骤(5)中负压膜过滤器的滤膜孔径为0.45μm。

7. 根据权利要求1所述的利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法,其特征在于,所述步骤(1)、步骤(2)中培养的条件均为28-37℃、150-200rpm振荡培养。

8. 根据权利要求1所述的利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法,其特征在于,所述步骤(1)中培养的时间为1-2d;所述步骤(2)中培养的时间为6-8h。

一种利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物应用技术领域,具体涉及一种利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法。

背景技术

[0002] 硒是人和动物所必需的微量元素之一,在机体的抗氧化、免疫功能、抗病毒、抗癌等方面起着重要作用。与无机硒和有机硒相比,红色纳米硒具有毒性低、生物活性高等特征,在动物生产、医药及保健品方面有着广泛的应用。近年来,纳米硒在抗菌方面的应用潜力也逐渐为人们所认识。医疗器械上的微生物定植和生物膜的形成是引起医院感染的普遍问题。最新研究发现,纳米硒作为广谱抗菌剂,对病原细菌、真菌和寄生虫具有重要的抗菌活性,尤其对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌等耐药菌显示出良好的抗菌作用,可以抑制金黄色葡萄球菌等耐药菌在不同表面(聚苯乙烯、玻璃和导管)的黏附、生物膜和微菌落的形成过程,有望开发成新的耐药菌防治策略,市场前景巨大。

[0003] 目前纳米硒的合成主要通过化学反应,结晶技术,反向胶束法等技术生成。但这些技术会受到高温、高压、催化剂等条件限制,而且容易对环境造成危害,生产的纳米硒在没有保护剂存在的条件下,容易团聚,理化性质不稳定,常温下就容易失去生物活性,而转变成灰黑色晶型的单质硒。因此,生产上亟需一种清洁,无毒,环保的方法来生产稳定的纳米硒。

[0004] 微生物在硒的自然界中的循环发挥着重要作用。已发现许多细菌,如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、红螺菌(*Rhodospirillum Molisch*)等可将氧化态硒还原为红色纳米硒,而且合成的生物纳米硒性质稳定,活性高,故利用细菌合成生物纳米硒,是硒的高效生物转化方式,也是降低硒环境风险的解决方式之一。但是,目前报道和应用的细菌,合成的纳米硒在细胞内外都有分布。导致提取纯化纳米硒的时候,需要破碎细胞,一方面增加了生产成本,另一方面提取的纳米硒含有细胞裂解物等碎片,后续需要进一步纯化,否则会影响后续使用。

[0005] 公开号为CN104310319A的中国专利,公开了一种纳米硒的制备方法,包括以下步骤:一种纳米硒的制备方法,包括以下步骤:1)亚硒酸盐溶液与还原剂溶液在酸液和稳定剂存在的条件下发生还原反应,得到纳米硒悬浮液;其中,亚硒酸盐溶液与还原剂溶液按溶质质量比1:2~30;2)将纳米硒悬浮液离心,去上清液,得成品胶态纳米硒;加去离子水重悬浮后,经冷冻干燥,即得成品固态纳米硒。该方法得到的成品纳米硒在2~6℃保存。测算每个粒径纳米硒的回收率,可知随着纳米硒粒径的降低,纳米硒的生成比例会逐渐增加。该方法反应操作简单,安全稳定,时间短。但是该方法需要用到酸液和稳定剂,依然存在操作繁琐以及潜在的环境污染风险的问题。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题在于如何解决现有技术制备纳米硒操作繁琐、成本

高、效率低的问题。

[0007] 本发明通过以下技术手段实现解决上述技术问题的：

[0008] 菌株说明：本发明所使用的芽孢杆菌 *Bacillus.sp* HZ3，保藏编号：CCTCC NO：M20221472，保藏日期：2022年9月21日，保藏单位：中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)，保藏地址：湖北省武汉市武昌区八一路珞珈山。

[0009] 本发明提供一种利用芽孢杆菌 *Bacillus.sp* HZ3 制备生物纳米硒的方法，包括以下步骤：

[0010] (1) 高效亚硒酸钠还原微生物的培养：挑取 *Bacillus.sp* HZ3 单菌落，加入至 YSP 培养基中培养，至培养基中 *Bacillus.sp* HZ3 菌群数量达到 10^7 CFU/mL，获得菌种培养液；

[0011] (2) 添加诱导剂：向步骤 (1) 获得的培养液中，加入诱导剂，继续培养至培养液中 *Bacillus.sp* HZ3 菌群数量达到 $10^8 - 10^9$ CFU/mL；

[0012] (3) 添加亚硒酸钠 (Na_2SeO_3)：向步骤 (2) 获得的培养液中，加入亚硒酸钠溶液；

[0013] (4) 诱导培养：亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 添加完成后，先采用低温培养，再转入常温培养，至培养液颜色由无色变为红色，颜色不再继续加深时，视为培养液中亚硒酸钠全部被还原，培养完成；

[0014] (5) 分离提取生物纳米硒：将步骤 (4) 获得的培养液置于负压膜过滤器中，收集滤液，将滤液进行离心操作，收集沉淀，重溶于 TE 缓冲液中，即为生物纳米硒初提物。

[0015] 有益效果：本发明通过采用特殊的菌株芽孢杆菌 *Bacillus.sp* HZ3，生物法合成纳米材料，反应条件温和，成本低廉，操作简便，提高了制备纳米硒的效率。

[0016] 优选的，所述步骤 (1) 中的 YSP 液体培养基由蛋白胨 5-10g，牛肉浸粉 5-10g，酵母粉 5-10g，无水氯化钙 0.01-0.05g，无水硫酸镁 0.02-0.08g，生物素 2-8mg，纯水 1000mL 制成。

[0017] 优选的，所述步骤 (2) 中诱导剂为谷胱甘肽 (GSH)，硝酸钠，CTAB，Triton X-114 中的一种或多种。

[0018] 优选的，所述步骤 (2) 中诱导剂的浓度为 1-10mg/L。

[0019] 优选的，所述步骤 (3) 中亚硒酸钠溶液的浓度为 1mol/L，所述亚硒酸钠溶液与培养液的体积比为 (2-5) : 1000。

[0020] 优选的，所述步骤 (4) 中低温是指 15-20℃，常温是指 28-37℃。

[0021] 优选的，所述步骤 (4) 中，先在 15-20℃，150-200rpm 振荡培养 12-18h，随后在 28-37℃，150-200rpm 振荡培养 2-3 天。

[0022] 优选的，所述步骤 (5) 中离心的转速为 20000-30000r/min，时间 10-20min。

[0023] 优选的，所述步骤 (5) 中负压膜过滤器的滤膜孔径为 0.45μm。

[0024] 优选的，所述步骤 (1)、步骤 (2) 中培养的条件均为 28-37℃、150-200rpm 振荡培养。

[0025] 优选的，所述步骤 (1) 中培养的时间为 1-2d；所述步骤 (2) 中培养的时间为 6-8h。

[0026] 本发明的优点在于：

[0027] (1) 本发明通过采用特殊的菌株芽孢杆菌 *Bacillus.sp* HZ3，生物法合成纳米材料，反应条件温和，成本低廉，操作简便，提高了制备纳米硒的效率。

[0028] (2) 本发明公开了一株可以还原亚硒酸钠合成纳米硒的微生物及利用该微生物高效生产胞外纳米硒的方法。包括生物纳米硒的胞外合成、生物纳米硒的分离、以及合成的生物纳米硒的抑菌效果研究。该方法对设备要求低，工艺简单，成本低，产物纯度高，环境友

好,克服了传统微生物合成纳米硒时,需破碎细胞提取纳米硒引入细胞碎片等杂质、生产成本高等缺点,胞外纳米硒的得率超过90%,具有广阔的推广价值。

附图说明

[0029] 图1为本发明实施例2芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3及胞外纳米硒的扫描电镜观察图;

[0030] 图2为本发明实施例2芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3合成的纳米硒颗粒纯化后的扫描电镜观察图;

[0031] 图3为本发明实施例2纯化后的纳米硒颗粒的元素组成的EDS分析图;

[0032] 图4为添加不同的诱导剂处理对芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3胞外合成纳米硒颗粒的影响图;

[0033] 图5为不同温度培养处理对芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3胞外合成纳米硒效率的影响图。

具体实施方式

[0034] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0035] 实施例1:

[0036] 一种利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法,包括以下步骤:

[0037] (1) 高效亚硒酸钠还原微生物的培养:挑取*Bacillus.sp* HZ3单菌落,加入至YSP培养基中,28℃、150rpm振荡培养2d,至培养基中*Bacillus.sp* HZ3菌群数量达到 10^7 CFU/mL,获得菌种培养液;YSP液体培养基由蛋白胨5g,牛肉浸粉5g,酵母粉5g,无水氯化钙0.01g,无水硫酸镁0.02g,生物素2mg,纯水1000mL制成;

[0038] (2) 添加诱导剂:向步骤(1)获得的培养液中,加入诱导剂(谷胱甘肽GSH),使得诱导剂终浓度为1mg/L,继续28℃、150rpm振荡培养8h,至培养液中*Bacillus.sp* HZ3菌群数量达到 $10^8 - 10^9$ CFU/mL;

[0039] (3) 添加亚硒酸钠(Na_2SeO_3):向步骤(2)获得的培养液中,加入亚硒酸钠溶液;亚硒酸钠溶液的浓度为1mol/L,

[0040] (4) 诱导培养:亚硒酸钠(Na_2SeO_3)添加完成后,先在15℃,150rpm振荡培养18h,随后在28℃,150rpm振荡培养3天,至培养液颜色由无色变为红色,颜色不再继续加深时,视为培养液中亚硒酸钠全部被还原,培养完成;

[0041] (5) 分离提取生物纳米硒:将步骤(4)获得的培养液置于负压膜过滤器(滤膜孔径0.45 μm)中,收集滤液,将滤液进行离心20000r/min,时间20min,收集沉淀,重溶于TE缓冲液(pH 8.0)中,即为生物纳米硒初提物。

[0042] 本实施例制得的纳米硒颗粒,利用纳米激光粒度仪测量,粒径范围为100-300nm。采用扫描电子显微镜及能谱仪(SEM-EDX),观察到粒径为100-300的纳米颗粒,EDX能谱显示出Se的特征峰,表明制备的纳米颗粒为纳米硒颗粒。ICP-AES测定结果表明,加入的亚硒酸

钠(Na_2SeO_3)有56.8%被还原成胞外纳米硒。

[0043] 实施例2:

[0044] 一种利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法,包括以下步骤:

[0045] (1) 高效亚硒酸钠还原微生物的培养:挑取*Bacillus.sp* HZ3单菌落,加入至YSP培养基中,32℃、180rpm振荡培养1.5d,至培养基中*Bacillus.sp* HZ3菌群数量达到 10^7 CFU/mL,获得菌种培养液;YSP液体培养基由蛋白胨8g,牛肉浸粉8g,酵母粉8g,无水氯化钙0.03g,无水硫酸镁0.05g,生物素6mg,纯水1000mL制成;

[0046] (2) 添加诱导剂:向步骤(1)获得的培养液中,加入诱导剂(谷胱甘肽GSH,硝酸钠,CTAB,质量比1:2:1),使得诱导剂终浓度为8mg/L,继续32℃、180rpm振荡培养7h,至培养液中*Bacillus.sp* HZ3菌群数量达到 10^8 - 10^9 CFU/mL;

[0047] (3) 添加亚硒酸钠(Na_2SeO_3):向步骤(2)获得的培养液中,加入亚硒酸钠溶液;亚硒酸钠溶液的浓度为1mol/L;

[0048] (4) 诱导培养:亚硒酸钠(Na_2SeO_3)添加完成后,先在18℃,180rpm振荡培养14h,随后在32℃,180rpm振荡培养2.5天,至培养液颜色由无色变为红色,颜色不再继续加深时,视为培养液中亚硒酸钠全部被还原,培养完成;

[0049] (5) 分离提取生物纳米硒:将步骤(4)获得的培养液置于负压膜过滤器(滤膜孔径0.45 μm)中,收集滤液,将滤液进行离心25000r/min,时间15min,收集沉淀,重溶于TE缓冲液(pH 8.0)中,即为生物纳米硒初提物。

[0050] 本实施例制得的纳米硒颗粒,利用纳米激光粒度仪测量,粒径范围为100-300nm。采用扫描电子显微镜及能谱仪(SEM-EDX),观察到粒径为100-300的纳米颗粒,EDX能谱显示出Se的特征峰,表明制备的纳米颗粒为纳米硒颗粒。

[0051] ICP-AES测定结果表明,加入的亚硒酸钠(Na_2SeO_3)有90.8%被转化成纳米硒。

[0052] 实施例3:

[0053] 一种利用芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3制备生物纳米硒的方法,包括以下步骤:

[0054] (1) 高效亚硒酸钠还原微生物的培养:挑取*Bacillus.sp* HZ3单菌落,加入至YSP培养基中,37℃、200rpm振荡培养1d,至培养基中*Bacillus.sp* HZ3菌群数量达到 10^7 CFU/mL,获得菌种培养液;YSP液体培养基由蛋白胨10g,牛肉浸粉10g,酵母粉10g,无水氯化钙0.05g,无水硫酸镁0.08g,生物素8mg,纯水1000mL制成;

[0055] (2) 添加诱导剂:向步骤(1)获得的培养液中,加入诱导剂(谷胱甘肽GSH,硝酸钠,CTAB,Triton X-114,质量比1:2:1:1),使得诱导剂终浓度为10mg/L,继续37℃、200rpm振荡培养6h,至培养液中*Bacillus.sp* HZ3菌群数量达到 10^8 - 10^9 CFU/mL;

[0056] (3) 添加亚硒酸钠(Na_2SeO_3):向步骤(2)获得的培养液中,加入亚硒酸钠溶液;亚硒酸钠溶液的浓度为1mol/L;

[0057] (4) 诱导培养:亚硒酸钠(Na_2SeO_3)添加完成后,先在15℃,150rpm振荡培养18h,随后在37℃,200rpm振荡培养2天,至培养液颜色由无色变为红色,颜色不再继续加深时,视为培养液中亚硒酸钠全部被还原,培养完成;

[0058] (5) 分离提取生物纳米硒:将步骤(4)获得的培养液置于负压膜过滤器(滤膜孔径0.45 μm)中,收集滤液,将滤液进行离心30000r/min,时间10min,收集沉淀,重溶于TE缓冲液(pH 8.0)中,即为生物纳米硒初提物。

[0059] 本实施例制得的纳米硒颗粒,利用纳米激光粒度仪测量,粒径范围为100-300nm。采用扫描电子显微镜及能谱仪(SEM-EDX),观察到粒径为100-300的纳米颗粒,EDX能谱显示出Se的特征峰,表明制备的纳米颗粒为纳米硒颗粒。

[0060] ICP-AES测定结果表明,加入的亚硒酸钠(Na_2SeO_3)有75.3%被转化成纳米硒。

[0061] 图1为本发明实施例2芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3及胞外纳米硒的扫描电镜观察图片(黑色箭头指示的即为胞外存在的纳米硒颗粒);

[0062] 图2为本发明实施例2芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3合成的纳米硒颗粒纯化后的扫描电镜观察图片;

[0063] 图3为本发明实施例2纯化后的纳米硒颗粒的元素组成的EDS分析图,从图中可以看出,显示出明显的Se特征峰;

[0064] 图4为添加不同的诱导剂处理对芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3胞外合成纳米硒颗粒的影响图(A:添加实施例1中的诱导剂,B:添加实施例2中的诱导剂);

[0065] 图5为不同温度培养处理对芽孢杆菌*Bacillus.sp* HZ3胞外合成纳米硒效率的影响图;(A:实施例1中的低温诱导处理;B:实施例2中的低温诱导处理)。

[0066] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

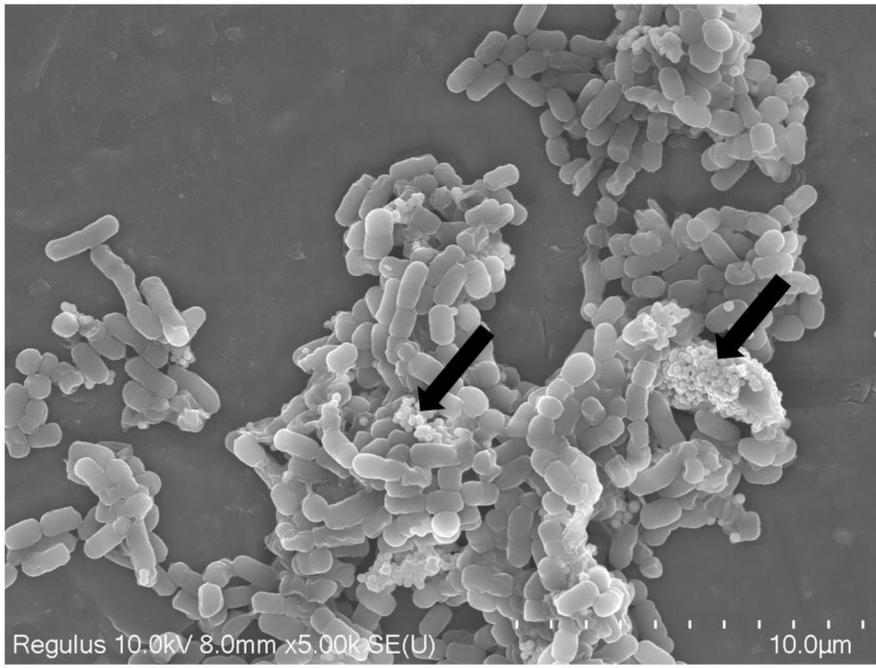


图1

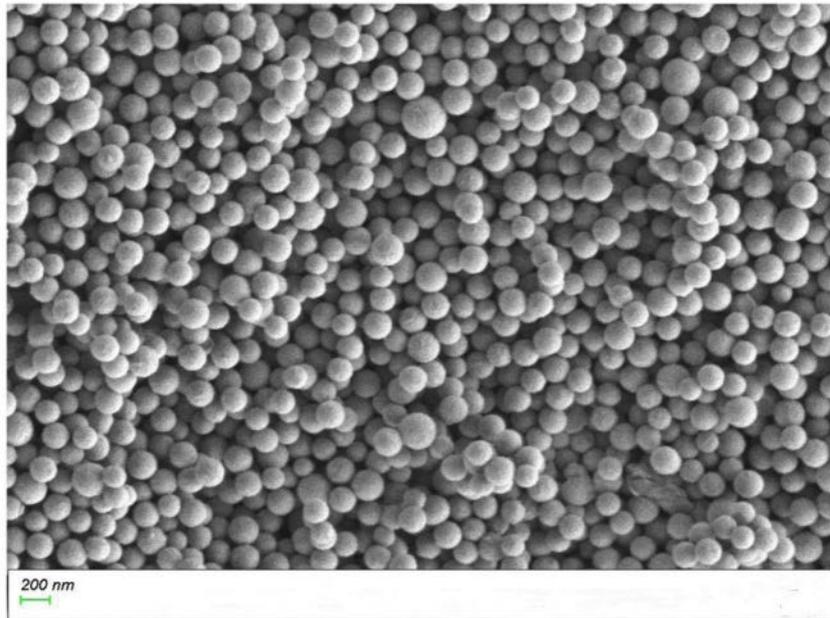


图2

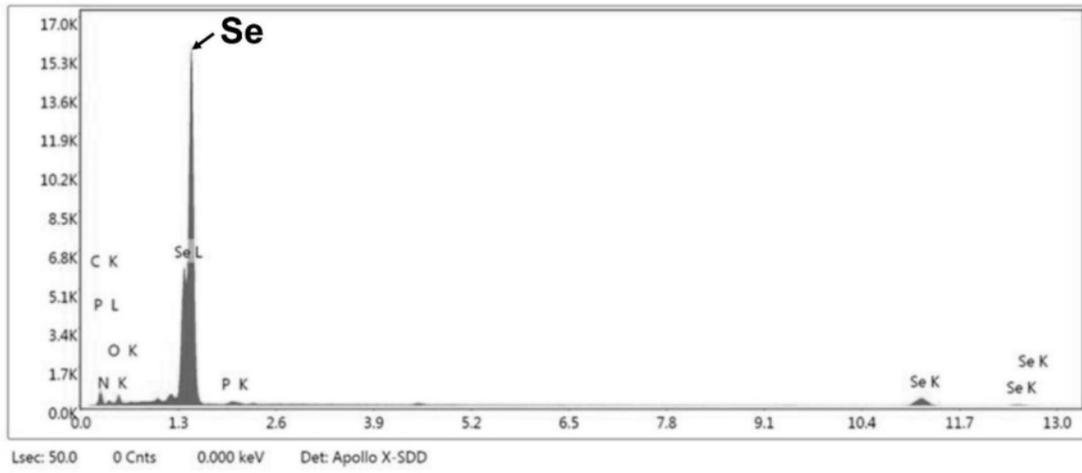


图3

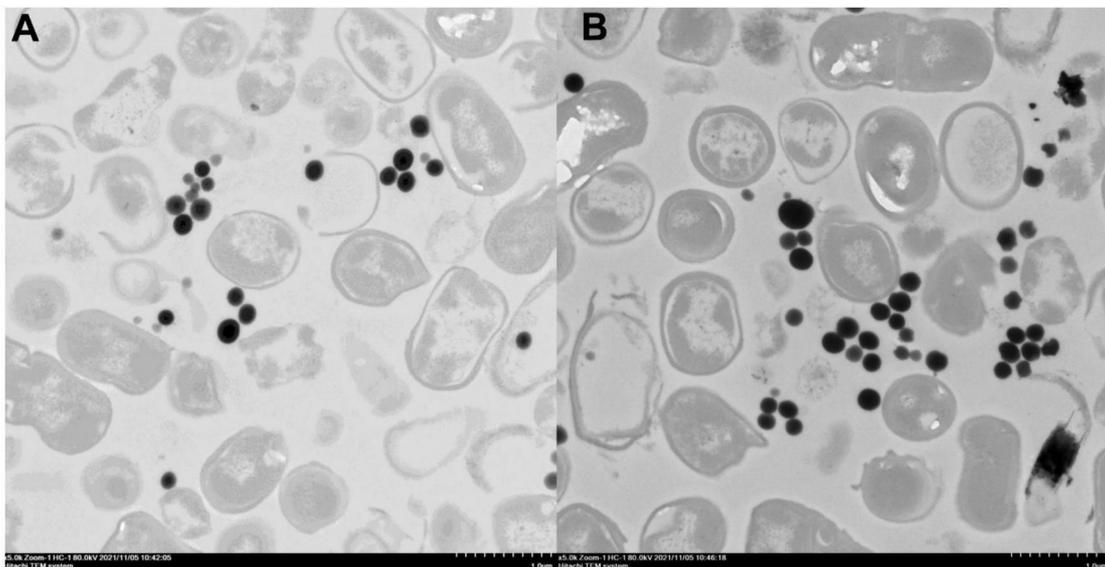


图4

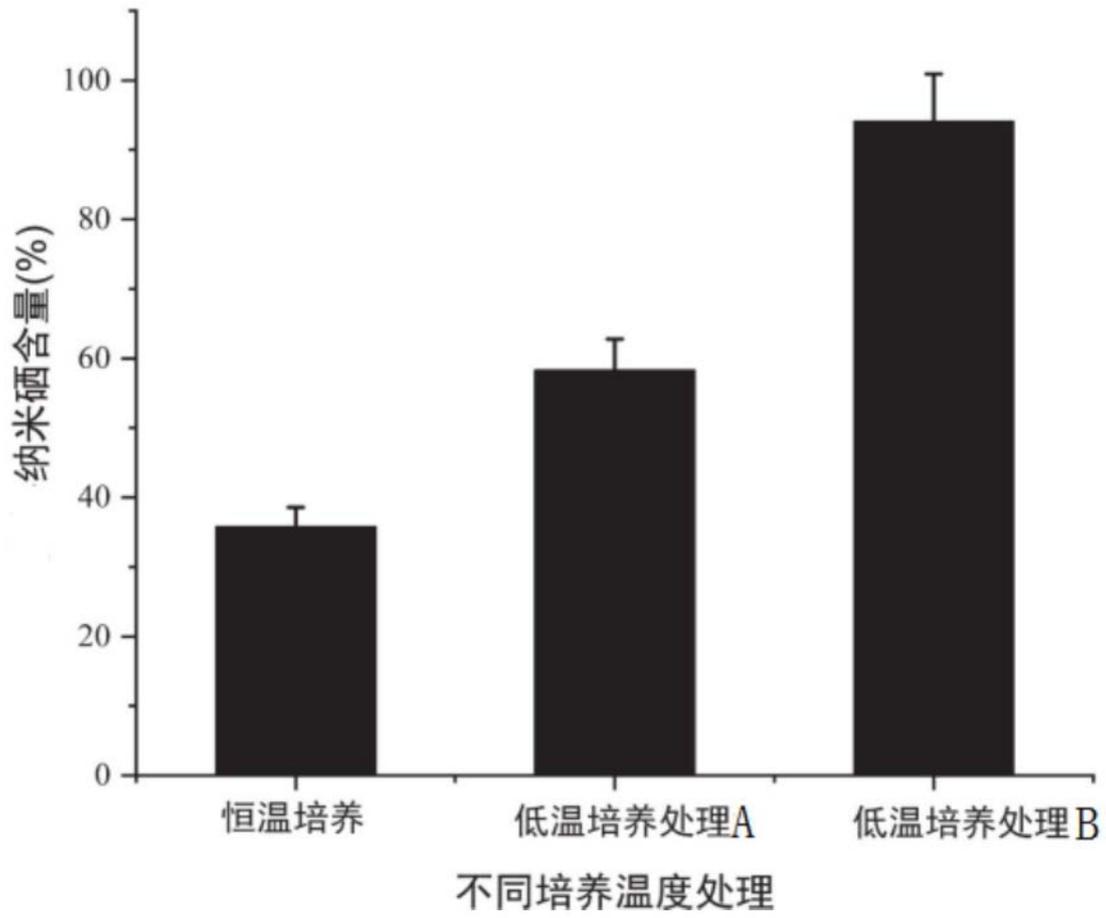


图5