

# 唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌的工艺研究

胡文锋<sup>1,2</sup>, 刘小阳<sup>1</sup>, 张明<sup>1</sup>, 沈敏<sup>1</sup>, 庞旭<sup>3</sup>, 周海泳<sup>3</sup>, 朱剑锋<sup>3</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 苏州万生源生物科技有限公司, 江苏苏州 215000)

(3. 生物源生物技术(深圳)有限公司, 深圳南山 518055)

**摘要:** 为获得晶体粒径为纳米级别且对致病菌有明显抑菌效果的纳米氧化锌产品, 对乳酸菌生物合成纳米氧化锌的工艺条件进行探索。从断奶 7~10 d 健康仔猪的粪便中筛选出一株对高浓度锌离子具有耐受性菌株, 并以此菌株为模板, 氯化锌溶液为原料, 分别研究了作用温度、作用时间、发酵后菌液的 pH 值、氯化锌原液的添加量四个因素对最终产品氧化锌的粒径、转化率及其对致病菌抑菌效果的影响。研究表明, 当 0.25 M ZnCl<sub>2</sub> 底物浓度、体系 pH 值为 7.0, 70 °C 水浴温度下作用 25 min 时得到的氧化锌晶体粒径在 70 nm 左右, 晶体形状均匀, 且对大肠杆菌、沙门氏菌以及金黄色葡萄球菌等致病菌的抑菌效果较好, 其最小抑菌浓度分别为 0.024 mg/mL、0.029 mg/mL、0.016 mg/mL。将纳米氧化锌替代普通锌源添加在动物饲养中能有效改善猪仔生长性能。

**关键词:** 乳酸菌; 生物合成; 纳米氧化锌; 粒径; 转化率

文章编号: 1673-9078(2013)9-2192-2198

## Biosynthesis of ZnO Nanoparticles by *Lactobacillus salivarius* L3

HU Wen-feng<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-yang<sup>1</sup>, ZHANG Ming<sup>1</sup>, SHEN Min<sup>1</sup>, PANG Xu<sup>3</sup>, ZHOU Hai-yong<sup>3</sup>, ZHU Jian-feng<sup>3</sup>

(1. College of Food, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Suzhou Wanshengyuan Biotech Co., Ltd, Suzhou 250061, China) (3. Bioforte Biotechnology (ShenZhen) Co., Ltd, Shenzhen 518055, China)

**Abstract:** In order to obtain the inerratic crystal of ZnO nanoparticles, ZnO nanoparticles was biosynthesized by using *Lactobacillus salivarius* L3. *Lactobacillus salivarius* L3 strain was isolated from faeces of healthy weaning piglets weaned at 7~10 d age. Effect of temperature, action time, raw liquor of pH value and the concentration of zinc solution on the synthesis were investigated. The optimum synthesis factors were determined by orthogonal experiment as follows: 0.25 M ZnCl<sub>2</sub>, pH 7.0, water bath temperature 70 °C and reaction time 25 minute. Under the optimum synthesis conditions, the size of the zinc oxide crystal grain were nearby 70 nm. Meanwhile the crystal shape was uniform and had a strong antibacterial capability against *E. coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*. The minimum inhibitory concentration was 0.024 mg/mL to *E. coli*, 0.029 mg/mL to *Salmonella*, and 0.016 mg/mL to *Staphylococcus aureus*. Using ZnO nanoparticles instead of normal ZnO into animal feed will effectively enhance the growth performance of weanling pigs.

**Key words:** *Lactobacillus salivarius*; biosynthesis; ZnO nanoparticle; crystal grain size; conversion rate

纳米材料(nanomaterial)是指结构单元的尺寸在 1~100 nm、介于宏观物体和原子簇之间的粒子。纳米氧化锌是又称为超微细氧化锌, 由于颗粒尺寸处于纳米级别, 比表面积急剧增加, 使得纳米氧化锌产生了其本体块状材料所不具备的表面效应、小尺寸效应和宏观量子隧道效应等, 因而具有比本体块状材料更强的生物活性。

目前, 纳米氧化锌的工业化生产方法很多, 如沉淀法等, 但这些传统方法多为高温高耗能, 对环境破坏大<sup>[1]</sup>。而最近几年来, 生物方法制备纳米材料得到了一定的发展, 如 DNA 分子、蛋白质、微生物、动物和植物体<sup>[2]</sup>等被用来制备纳米材料。Sangeetha, G 等用芦荟提取物成功合成纳米氧化锌材料<sup>[3]</sup>。王娜等用

收稿日期: 2013-04-14

作者简介: 胡文锋(1964-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 应用微生物

蛋壳薄膜作为生物活性载体, 设计了一种在有生物活性材料参与的条件室温原位合成硒化铅纳米团簇的新方法。该方法利用膜上特定周期性分布的大分子与无机前驱体离子之间的螯合作用和电荷作用来控制硒化铅微晶的形成、聚集和分布, 成功地制备出了具有规则形状的硒化铅纳米团簇<sup>[4]</sup>。这些生物材料都是由无机成分和特殊的有机基质(蛋白质、脂类或多糖)组成的复合材料, 有机基质主要控制无机化合物的形态, 即这些无机结构的成核和生长主要由蛋白质和其他生物大分子控制。使用生物体吸附有毒重金属离子, 并在细胞内或外将其还原制成纳米材料, 这些生物体近来被认为是可能的环境友好型“纳米工厂”。

纳米氧化锌不仅在光化学领域有很好的应用, 在食品以及动物饲料中也发挥很大作用<sup>[5]</sup>。目前猪场养殖发现高锌能有效防止断奶猪仔的腹泻问题。将纳米

氧化锌替代普通锌源, 添加在动物饲养中, 其高生物活性、对肠道致病菌的抗菌性<sup>[6]</sup>和吸收率可以有效地减少腹泻, 降低料肉比, 而且剂量更少, 对环境污染小, 为人类健康造福, 是目前代替高锌最理想的饲料添加剂<sup>[7]</sup>, 在饲料行业的应用前景广阔。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

#### 1.1.1 样品来源

##### 1.1.1.1 断奶 7~10 d 仔猪粪便

样品取自广州温氏集团养殖基地断奶 7~10 d 仔猪粪便, 经过实地观察都是健康猪样。

##### 1.1.1.2 指示菌

大肠杆菌 O78, 金黄色葡萄球菌, 沙门氏菌等由华南农业大学食品学院微生物实验室提供。

#### 1.1.2 主要仪器设备

SM510 型高压蒸汽灭菌锅, Yamato 有限公司; LRH-250A 型生化培养箱, 广东医疗器械厂; SW-CJ-2FO 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; GB204 型电子天平, 瑞典 Mettler Toledo 公司; FEI-Tecna 12 分析型透射电子显微镜, 荷兰 FEI 公司; Vertex70 傅立叶变换红外光谱仪, 德国 Bruker 公司; 恒温摇床培养箱, 低速离心机, 恒温水浴锅, pH 计, 磁力搅拌机。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 耐高锌乳酸菌的筛选

##### 1.2.1.1 乳酸菌的富集

将采集的断奶 7~10 d 的仔猪粪便加入到灭菌含玻璃珠的高锌液体 MRS 培养基中 37 °C 恒温静置富集培养 24~48 h。

##### 1.2.1.2 乳酸菌的分离纯化与鉴定

将富集的菌液进行分离纯化得到多种乳酸菌疑似菌株, 并进行形态学和生理生化鉴定试验, 同时通过抑菌实验筛选出抑菌效果较好的某菌株进行进一步的 16 S rRNA 序列分析法鉴定。

#### 1.2.2 纳米氧化锌的生物制备

##### 1.2.2.1 纳米氧化锌生物制备工艺流程

耐锌的乳酸菌培养完成之后调节菌液的 pH 值, 在磁力搅拌器作用下边搅拌边缓慢加入氯化锌溶液, 一定温度下水浴孵化一定时间。水浴结束将混合液恒温静置陈化一段时间, 最后离心收集产物<sup>[8-9]</sup>。

##### 1.2.2.2 纳米氧化锌生物制备工艺条件的优化

根据单因素试验结果, 选取氯化锌底物浓度、孵

化的水浴温度、孵化时间以及孵化时溶液的 pH 值作为试验因素, 设计四因素三水平  $L_9(3^4)$  正交试验。通过透射电镜对每组试验得到的产物进行晶体粒径分析, 以粒径为指标, 通过对结果的极差分析和方差分析确定纳米氧化锌的乳酸菌生物合成优化工艺条件。

##### 1.2.3 验证试验

根据正交试验最佳组合选择乳酸菌合成纳米氧化锌的优化工艺条件, 参照上述试验操作流程得到的产物离心洗涤干燥后进行透射电镜分析和红外光谱测试以及产品致病菌抑菌效果的检测<sup>[10]</sup>, 分别测定目标产物纳米氧化锌对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度<sup>[11]</sup>。并选用普通氧化锌作为对照试验。

##### 1.2.4 纳米氧化锌含量测定

离心收集得到的沉淀中除了目标产物纳米氧化锌外同时还含有少量氢氧化锌沉淀, 而氢氧化锌在 125 °C 是能分解成氧化锌和水, 利用煅烧前后质量差计算产物中目标产物氧化锌的含量, 并根据总锌离子添加量计算出转化率。

##### 1.2.5 纳米氧化锌晶体的透射电镜分析

采用支持膜法, 以水作为分散剂将固体粉末产物分散在水中, 同时用工作电压为 300 W 的超声波震荡 5 min, 超声结束用滴管吸取一滴滴在支持膜上, 晾干后上镜观察。透射电子显微镜工作参数为点分辨率: 0.34 nm, 加速电压 100 kV, 放大倍率 50 倍~37 万倍。

##### 1.2.6 纳米氧化锌晶体的傅里叶红外光谱分析

将生物合成得到的固体产物灰化去除菌体后与 KBr 按 1:100 的比例研磨混匀后进行压片, 成片后放入样品室扫描检测, 仪器工作参数为波数范围: 4000~400  $\text{cm}^{-1}$ , 分辨率: 4  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数: 32 次。

##### 1.2.7 纳米氧化锌的抑菌试验

无菌试管加入近似  $5 \times 10^9$  CFU 细菌(致病菌)细胞、5 mL MH 肉汤液体培养基, 添加不同浓度的纳米氧化锌产品。同时取另一支不加菌的试管, 其他添加物一致作为对照组。在 37 °C 培养 24 h, 管中细菌细胞没有明显增长的浓度即为纳米氧化锌产品对该致病菌的最小抑菌浓度 MIC。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乳酸菌的筛选与分离鉴定

#### 2.1.1 初步分离与镜检结果

经过反复分离纯化, 结合镜检, 初步分离出四株疑似乳酸菌株, 分别命名为 L1、L2、L3 和 L4。其镜检图如图 1~图 4, 表 1 为这四株菌株的形态学特征。

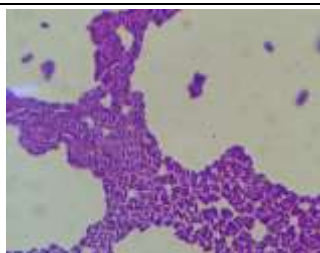


图 1 L1 菌株镜检图 (×1000)

Fig.1 Microscopic image of the L1 strain (×1000)

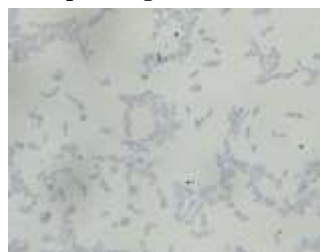


图 2 L2 菌株镜检图 (×1000)

Fig.2 Microscopic image of the L2 strain (×1000)



图 3 L3 菌株镜检图 (×1000)

Fig.3 Microscopic image of the L3 strain (×1000)



图 4 L4 菌株镜检图 (×1000)

Fig.4 Microscopic image of the L4 strain (×1000)

表 1 待检菌株的形态学特征

Table 1 Morphological characteristics of the indeterminacy strains

编号	菌落形态	革兰氏染色	个体形态
L1	乳白色, 圆形, 边缘完整、光滑、直径 0.5~1.5 mm	G <sup>+</sup>	长杆状, 单个或成链
L2	灰白白色、边缘完整、光滑、直径 0.5~2.0 mm	G <sup>+</sup>	长杆状, 无规则排
L3	白色, 边缘完整、光滑、直径 0.5~2.0 mm	G <sup>+</sup>	短杆状, 无规则排
L4	乳白色, 圆形, 边缘完整、光滑、直径 0.5~2.0 mm	G <sup>+</sup>	长杆状, 单个或成链

2.1.2 乳酸菌的生理生化鉴定结果

2.1.2.1 乳酸定性试验结果

L1、L2、L3 和 L4 四支试管管口的滤纸都变黑, 证明有乳酸生成, 乳酸转化为乙醛, 乙醛受热后挥发,

从而导致滤纸条变黑。根据镜检和产乳酸试验, 四株试验菌基本符合乳酸杆菌的特征。

2.1.2.2 待检菌的生理生化特征

表 2 分离菌株的生化鉴定结果

Table 2 The biochemical identification results of the separated strains

菌株	接触酶试验	乳酸定性试验	需氧试验	淀粉水解试验	吲哚试验	明胶液化试验	V-P 试验	甲基红试验	产硫化氢试验	运动性试验
L1	-	+	兼性	-	-	-	-	+	-	-
L2	-	+	兼性	-	-	-	-	+	-	-
L3	-	+	兼性	-	-	-	-	+	-	-
L4	-	+	兼性	-	-	-	-	+	-	-

注: +为阳性反应, -为阴性反应, 下同。

表 3 碳水化合物发酵与种的鉴别特征

Table 3 The identification features of carbohydrate fermentation and species

菌株	葡萄糖产酸	葡萄糖产气	葡萄糖酸钠	乳糖	蔗糖	木糖	山梨醇	麦芽糖	果糖	半乳糖	水杨苷	纤维二糖
L1	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
L2	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
L3	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
L4	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-

由表 2 可知, L1、L2、L3 和 L4 菌兼性厌氧; 接触酶试验, 淀粉水解试验, 吲哚试验, 明胶液化试验,

V-P 试验, 产硫化氢试验均为阴性, 并进行了各种碳水化合物的发酵实验, 结果如表 3 所示。将表 2 和表



3 的结果与乳杆菌属内种的生理生化特征作比较, 可发现 L1、L2、L3 和 L4 菌株的生理生化特征与唾液乳杆菌属基本符合。

### 2.1.3 抑菌试验结果

四种疑似菌株的抑菌效果如表 4。

表 4 不同乳酸菌菌株代谢产物对常见肠道致病菌的抑菌圈直径 (mm)

Table 4 The antibacterial ring diameter of lactic acid bacteria

metabolites to pathogenic bacteria		
项目	大肠杆菌	沙门氏菌
L1	18.8	15.8
L2	18.2	16.7
L3	24.6	18.8
L4	21.5	13.5

注: 表中的抑菌圈直径为 2 次平行试验的平均值表示。

由表 4 可以看出, 四株菌株对大肠杆菌以及沙门氏菌都有一定的抑制作用。所有菌株对大肠杆菌的抑菌效果最好, 抑菌圈直径在 18~25 mm 之间, 菌株抑菌圈直径由大到小依次为 L3>L4>L1>L2; 对沙门氏菌抑制效果相对较低, 抑菌圈直径在 13~19 mm 之间, 各菌株抑菌圈直径由大到小依次为 L3>L2>L1>L4。比较 L1、L2、L3、L4 菌株对大肠杆菌和沙门氏菌抑菌效果发现, L3 菌株的抑制效果最明显, 其抑菌圈直径显著大于其余三株菌株。因此挑选出 L3 菌株作重点的菌种鉴定分析, 为后续的动物试验提供参考依据和菌种保证。本抑菌试验证实了从仔猪粪便分离出的乳酸菌对肠道细菌, 如大肠杆菌、沙门氏菌等引起的肠道感染有拮抗作用。这些抑菌物质可能是乳酸菌在生长过程中产生的代谢产物, 包括有机酸 (如乙酸、丙酸以及乳酸等), 抗生素或细菌素类物质, 双乙酰等。

### 2.1.4 菌株 L3 DNA 的提取及 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与分析测序

利用 27F 和 1541R 一对引物进行 PCR 扩增, 测序 PCR 产物, 基因测序的结果显示, L3 菌的 16S rRNA 序列含有 1379 bp 核苷酸。在 NCBI 网站上 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 将测序结果与数据库中已有的乳酸杆菌序列进行比对, 从基因序列同源性比对结果可知, 该乳酸杆菌与唾液乳杆菌的同源性最高, 为 100%。

综上所述, 结合生理生化鉴定结果, 确定该乳杆菌株 L3 应为唾液乳杆菌, 暂命名为唾液乳杆菌 L3 (*Lactobacillus salivarius* L3), 并以该菌作为生物合成纳米氧化锌的菌株。

## 2.2 纳米氧化锌的生物合成

### 2.2.1 氯化锌底物浓度对合成纳米氧化锌的影响

根据纳米氧化锌的生物合成工艺, 唾液乳杆菌 L3 发酵培养结束后调节体系 pH 值到预设值, 分别加入 0.15 M、0.25 M、0.35 M、0.45 M、0.55 M 五个梯度氯化锌底物进行试验, 70 °C 水浴保温反应 20 min 后, 置于 37 °C 恒温箱陈化 12 h, 陈化结束后离心收集产物, 同时将产物洗涤三次后烘干至恒重。采用透射电镜分析检测氧化锌产物粒径大小。

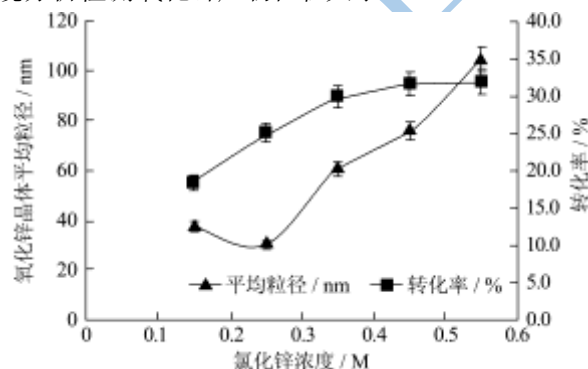


图 5 氯化锌浓度对唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌的影响

Fig. 5 Effect of zinc chloride concentration on zinc oxide crystal grain

结果如图 5。由图 5 可知, 底物氯化锌的浓度对纳米氧化锌粒径的大小影响较大。当氯化锌底物浓度为 0.25 M 时, 氧化锌晶体粒径最小, 为 30 nm。随着氯化锌浓度的增加, 氧化锌的粒径不断增大, 纳米氧化锌的转化率也逐渐增加, 这是因为浓度越大, 溶液的过饱和度增大, 在加速晶核的生成速度同时晶体的成长速度也增大, 因此转化率也随之增大, 但体系达到一定平衡时, 晶体的析出速率也会趋向平衡, 转化率也趋向稳定。另外氧化锌物质的本性对晶体的形成有决定作用, 当晶核形成速度<晶体成长速度时, 形成晶体粒径较大<sup>[12]</sup>。综合上述, 本试验选取 0.25 M 作为氯化锌底物的最佳添加浓度。

### 2.2.2 体系 pH 值对合成产物纳米氧化锌的影响

在本试验纳米氧化锌乳酸菌生物合成工艺中, 唾液乳杆菌 L3 发酵结束后体系 pH 值一般为 3.0~3.8。而锌是一种两性金属, 锌离子在酸性或碱性环境中性质活泼, 能结合其他离子生成多种盐<sup>[6]</sup>, 因此调节合成前发酵液的 pH 值对产物的形成非常重要。乳酸菌发酵培养结束后调节体系 pH 值至 5.5、6.0、6.5、7.0 以及 7.5, 共 5 个梯度进行单因素试验, 结果如图 6。图 6 表明 pH 从 5.5 上升到 7.0 时, 氧化锌的晶体粒径逐渐从 144 nm 缩小到 35 nm 左右, 在 pH 值达到 6.5 后, 氧化锌晶体的粒径变化趋于平稳, 粒径大小在 30

nm~50 nm 之间。同时 pH6.5~7.0 之间纳米氧化锌的转化率最高，当 pH>7.0 时，碱性环境下锌离子多以 Zn(OH)<sub>2</sub> 形式存在，析出结晶，导致氧化锌的转化率降低<sup>[13]</sup>。因此 pH 值为 6.5~7.0 时，为最适 pH 值范围。

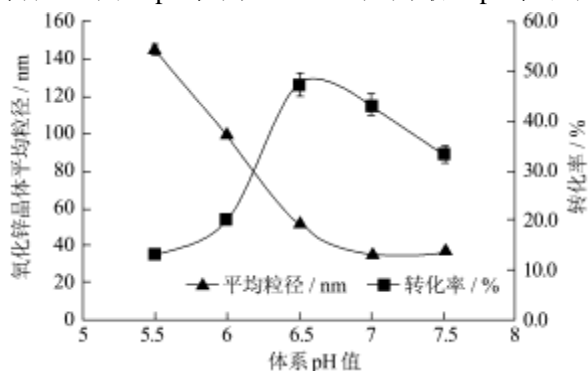


图 6 体系 pH 值对唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌的影响  
Fig.6 Effect of fermented liquid pH on the zinc oxide crystal grain

### 2.2.3 水浴保温的温度对合成纳米氧化锌的影响

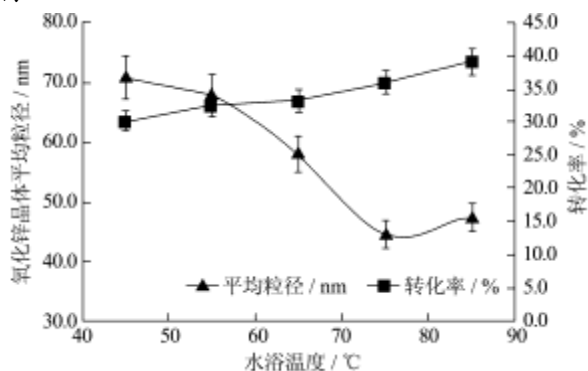


图 7 水浴温度对唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌的影响  
Fig.7 Effect of bath temperature on the zinc oxide crystal grain

反应温度的高低影响整个反应体系的能量大小，温度越高，反应体系能量越大，体系中各分子获得较大能量分子运动加快，分子间碰撞机会增大，其参与的反应平衡也会发生相应变化<sup>[13]</sup>。利用唾液乳杆菌 L3 生物制备纳米氧化锌过程中，水浴保温的反应温度的不同将导致氧化锌晶体的粒径明显差异。温度过低，分子分散性差，形成粒径较大的氧化锌晶体，纳米氧化锌的转化率也较低。本试验选取 45 °C、55 °C、65 °C、75 °C 以及 85 °C，共 5 个梯度进行单因素试验，透射电镜观察分析。结果如图 7。从图 7 可以看出，反应温度为 75 °C 时，合成效果较好，产物纳米氧化锌的晶体粒径最小，约为 45 nm；同时，纳米氧化锌的转化率也较高，约 36%。

### 2.2.4 水浴保温反应时间对合成产物纳米氧化锌的影响

根据纳米氧化锌的生物合成工艺，加入氯化锌底

物后恒温水浴反应时间长短也是影响氧化锌晶体粒径的一个因素。本试验反应温度为 75 °C，反应时间分别为 10 min、20 min、30 min、40 min 和 50 min，对产品进行分析检测，透射电镜镜检，结果如图 8。

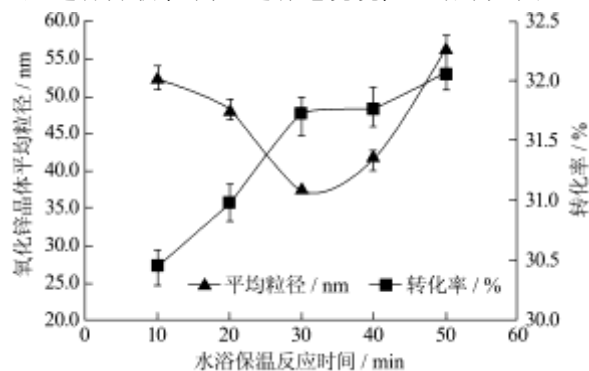


图 8 水浴保温反应时间对唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌的影响  
Fig.8 Effect of reaction time on zinc oxide crystal grain

结果表明，水浴保温反应时间为 30 min 时，氧化锌晶体的粒径为 40 nm 以下。当 t<30 min，或 t>30 min，纳米氧化锌粒径明显增大。这可能是由于随着反应时间的延长，晶体不断生长聚积，形成更大的颗粒；另一方面，在长时间高温水浴中乳酸菌细胞结构被破坏，细胞壁破裂，无法为晶体生长提供着生点。图 8 中系列 2 纳米氧化锌的转化率结果表明水浴保温反应时间对其影响较小。因此，本试验 30 min 水浴保温反应时间为唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌的反应时间。

### 2.2.5 唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌工艺条件优化

采用正交试验 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)对不同氯化锌底物浓度、发酵结束后反应母液 pH 值、水浴温度和水浴反应时间对唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌工艺条件进行优化。正交因素水平设计见表 5，正交试验结果及方差分析见表 6。

表 5 乳酸菌生物合成纳米氧化锌工艺条件优化正交因素表  
Table 5 Factors and levels array of orthogonal experiment about the biosynthesis of ZnO nanoparticles

水平	因素			
	A(氯化锌底物浓度/M)	B(发酵液的 pH 值)	C(水浴温度/°C)	D(水浴时间/min)
1	0.2	6.5	65	25
2	0.25	7	70	30
3	0.3	7.5	75	35

根据表 7 的方差分析结果，p<0.05，表明底物氯化锌浓度、体系 pH 值、水浴温度和反应时间四个因素对纳米氧化锌的晶体粒径有显著影响。由表 6 看出，

四个因素的极差大小: A (底物氯化锌浓度) > B (体系 pH 值) > C (水浴温度) > D (水浴反应时间), 即底物氯化锌浓度是影响目标纳米氧化锌晶体粒径的最主要因素, 体系 pH 值次之, 水浴温度的影响较小, 水浴保温反应时间影响最小。根据正交分析利用唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌的工艺条件最优组合是 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>, 即氯化锌浓度 0.25 M、体系液 pH 7.0、水浴温度 70 °C、水浴反应时间 25 min。

表 6 唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米工艺条件优化正交结果表

Table 6 Results of orthogonal experiment about the biosynthesis of ZnO nanoparticles

实验号	因素				实验结果 氧化锌粒径
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	44.25±1.77
2	1	2	2	2	30.75±1.41
3	1	3	3	3	55.00±2.12
4	2	1	2	3	35.00±1.41
5	2	2	3	1	35.75±1.06
6	2	3	1	2	47.00±2.12
7	3	1	3	2	65.00±2.82
8	3	2	1	3	46.50±1.77
9	3	3	2	1	50.75±2.47
K <sub>1</sub>	129.999	144.249	137.751	130.749	
K <sub>2</sub>	117.75	113.001	116.499	142.749	
K <sub>3</sub>	162.249	152.751	155.751	136.5	
k <sub>1</sub>	43.333	48.083	45.917	43.583	
k <sub>2</sub>	39.250	37.667	38.833	47.583	
k <sub>3</sub>	54.083	50.917	51.917	45.500	
最优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	
R	14.833	13.250	13.084	4.000	

表 7 工艺条件正交试验方差分析结果

Table 7 Variance analysis results of orthogonal experiment about the biosynthesis of ZnO nanoparticles

源	III 型平方和	df	均方	F	Sig.
校正模型	1851.444 <sup>a</sup>	8	231.431	47.338	0.000
截距	37355.556	1	37355.556	7640.909	0.000
A	704.528	2	352.264	72.054	0.000
B	584.194	2	292.097	59.747	0.000
C	514.694	2	257.347	52.639	0.000
D	48.028	2	24.014	4.912	0.036
误差	44.000	9	4.889		
总计	39251.000	18			
校正的总计	1895.444	17			

注: 主体间效应检验, 因变量: 氧化锌粒径; a: R<sup>2</sup>=0.977 (调整 R<sup>2</sup>=0.956)。

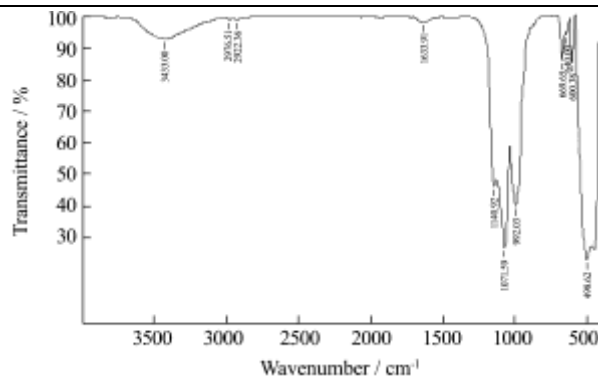


图 9 唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌的红外光谱图谱

Fig.9 FTIR results of the biosynthesized zinc oxide

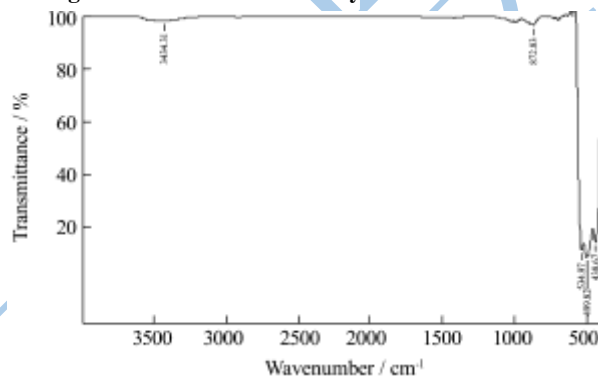


图 10 标准纳米氧化锌的红外光谱图谱

Fig.10 FTIR results of the standard nanoparticle zinc oxide

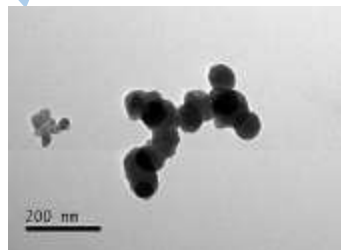


图 11 唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌透射电镜照片

Fig.11 Transmission electron microscopic image of the biosynthesis zinc oxide nanoparticle suspension

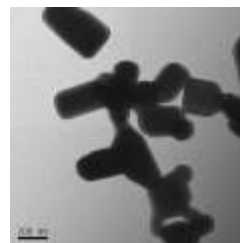


图 12 标准纳米氧化锌透射电镜照片

Fig.12 Transmission electron microscopic image of the standard zinc oxide nanoparticle suspension

### 2.2.6 唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌对致病菌的抑制作用

利用唾液乳杆菌生物合成的纳米氧化锌分别对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色普通球菌进行抑菌效果测试<sup>[4]</sup>, 以最小抑菌浓度 (MIC) 为指标, 与普通氧



化锌和市售的标准纳米氧化锌对照,结果如图 13 所示。唾液乳杆菌 L3 生物合成纳米氧化锌对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色普通球菌的最小抑菌浓度分别为 0.024 mg/mL、0.029 mg/mL、0.016 mg/mL,其结果与标准纳米氧化锌的抑菌效果相当接近,其中对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 浓度较标准纳米氧化锌更低。而普通氧化锌对该三种致病菌大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色普通球菌的抑菌效果较差,最小抑菌浓度分别为 0.5 mg/mL、0.67 mg/mL、0.32 mg/mL。因此唾液乳杆菌生物合成的纳米氧化锌对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果明显优于普通氧化锌。

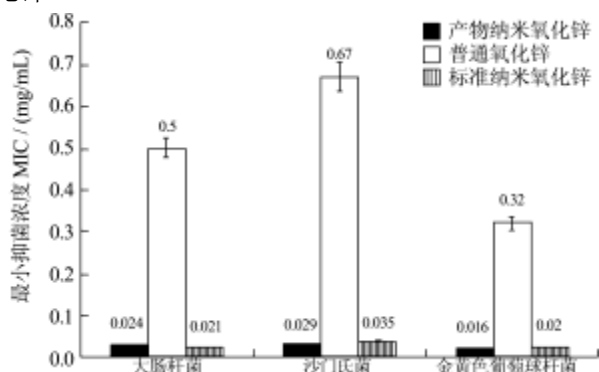


图 13 不同氧化锌对致病菌的最小抑菌浓度试验

Fig.13 The minimum Inhibition concentration tests of different ZnO to pathogenic bacteria

### 3 结论

本研究利用乳酸菌生物合成纳米氧化锌,相比其他方法更节省了能源的消耗。同时细菌繁殖较快且容易获得使得该生物方法简单方便,得到的那么氧化锌产物相比普通氧化锌对大肠杆菌等致病菌的抑菌效果更佳<sup>[15]</sup>。以菌体为生物媒介,为纳米氧化锌的晶核形成和晶体的生长提供条件,不仅能温和控制晶体生长,得到的产物中所包含得乳酸菌又能发挥乳酸菌的益生优势,应用于乳猪饲料中产生协同效应,改善肠道健康,防止断奶仔猪腹泻情况发生。

### 参考文献

[1] 商连弟,武换荣.氧化锌生产方法及研究进展[J].无机盐工业,2008,3:4-7  
Liandi Shang, Huanrong Wu. Production methods of zinc oxide and research progress thereof [J]. Inorganic Chemicals Industry, 2008, 3: 4-7

[2] Iwahori K, Takagi R, Kishimoto N, et al. A size controlled synthesis of CuS nano-particles in the protein cage, [12] 曹素忱.化学试剂与精细化学品合成基础(无机分册)[M].

apoferritin [J]. Materials Letters, 2011, 65(21-22): 3245-3247

[3] Sangeetha G, Rajeshwari S, Venkatesh R. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: Structure and optical properties [J]. Materials Research Bulletin, 2011, 46(12): 2560-2566

[4] 王娜.生物拟态法合成硫组化合物纳米复合材料的研究[D].上海:上海交通大学,2007  
Na Wang. Bioinspired route to hybrid chalcogenides-biomaterials nanocomposites [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2007

[5] 李佳洁,李江华.纳米保健食品安全性及研究动向[J].食品科学, 2011, 17: 366-370  
Jiajie Li, Jianghua Li. Safety and Prospects of Nanotechnology in Functional Foods [J]. Food Science, 2011, 17: 366-370

[6] Yanping Xie, Yiping He, Peter L Irwin, et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 7: 2325- 2331

[7] 游兆彤,胡彩虹,宋娟,等.纳米氧化锌对断奶仔猪生长、腹泻、肠道微生物和通透性的影响[J].中国畜牧杂志,2012, 21:43-46  
Zhaotong You, Caihong Hu, Juan Song, et al. Effects of Nano Zinc Oxide on Performance, Diarrhea, Intestinal Microflora and Permeability of Weanling Pigs [J]. Nutrition and Feedstuffs, 2012, 21: 43-46

[8] He W, Zhou W J, Wang Y J, et al. Biomimetic synthesis of iron phosphate nanoparticles in yeast cells [J]. Materials Science & Engineering C-biomimetic and Supramolecular Systems, 2009, 29(4): 1348-1350

[9] Kachi M, Sakamoto W, Ichida M, et al. Synthesis of Er-doped ZnO nanoparticle/organic hybrid from metal-organics [J]. Journal of Materials Science, 2012, 47(13): 5128-5133

[10] 武志富,李素娟.氢氧化锌和氧化锌的红外光谱特征[J].光谱实验室,2012,4:2172-2175  
Zhifu Wu, Sujuan Li. Infrared Spectra Characteristics of Zinc Hydroxide and Zinc Oxide [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2012, 4: 2172-2175

[11] Jones N, Ray B, Ranjit K T, et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms [J]. Fems Microbiology Letters, 2008, 279(1): 71-76  
上海:高等教育出版社,1991

- Suchen Cao. Base of inorganic chemicals and fine chemicals synthesis [M]. Shanghai: Higher Education Press, 1991
- [13] 马正先,韩跃新,郑龙熙.水溶液中直接形成纳米氧化锌的热力学分析[J].矿冶,2004,3:50-53  
Zhengxian Ma, Yuexin Han, Longxi Zheng. Thermodynamic Analysis of Nano ZnO Formed Directly in Aqueous Solution [J]. Mining & Metallurgy, 2004, 3: 50-53
- [14] Liu Y, He L, Mustapha A, et al. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(4): 1193-1201
- [15] Sevinc B A, Hanley L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B-applied Biomaterials, 2010, 94B(1): 22-31