



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109702218 B

(45)授权公告日 2020.09.29

(21)申请号 201811586940.8

A01G 13/00(2006.01)

(22)申请日 2018.12.25

A01G 22/22(2018.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109702218 A

(56)对比文件

CN 102240815 A, 2011.11.16

CN 101912976 A, 2010.12.15

(43)申请公布日 2019.05.03

CN 103949658 A, 2014.07.30

(73)专利权人 浙江大学

CN 106513707 A, 2017.03.22

地址 310013 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

US 9428399 B1, 2016.08.30

CN 107309438 A, 2017.11.03

(72)发明人 李斌 洪纤纤 姚榕 刘梦菊

邱文 张阳 马媛媛 马宋

廖正萍等. 余甘多糖绿色合成纳米银复合粒子的制备及响应面优化.《天然产物研究与开发》.2017,

(74)专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

审查员 李雪梅

代理人 胡红娟

(51)Int. Cl.

B22F 9/24(2006.01)

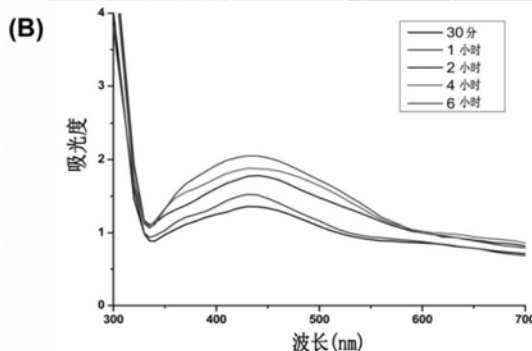
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

一种利用余甘果提取液制备纳米银颗粒的方法及产品和应用

(57)摘要

本发明公开了一种利用余甘果提取液制备纳米银颗粒的方法及其产品和应用,制备方法包括如下步骤:1)将余甘果洗净、烘干、切碎后与去离子水混合榨成汁,充分过滤后得到余甘果提取液;2)将余甘果提取液与AgNO₃溶液混合反应,再将得到的混合液经过离心、洗涤、真空冷冻干燥得到所述纳米银颗粒。得到的纳米银颗粒平均粒径小、结构稳定,能有效抑制水稻细菌性褐条病菌的活性,具有极强的杀菌效果,将其作为农用抗菌剂应用于防治水稻细菌性褐条病中绿色有效且对人体也没有潜在危害,在农业生产领域中具有广阔的应用和推广前景。



1. 一种利用余甘果提取液制备的纳米银颗粒作为农用杀菌剂在防治水稻细菌性褐条病中的应用,其特征在於,

所述纳米银颗粒的制备方法包括如下步骤:

(1) 将新鲜余甘果洗净、烘干、切碎后,称取10g余甘果与100ml去离子水混合,用功率为150W的榨汁机榨成汁,通过棉布和滤纸进行双重过滤,确保其中的固体杂质去除干净,从而得到余甘果提取液;

(2) 取15ml步骤(1)得到的余甘果提取液与100ml浓度为1mM AgNO_3 溶液混合,60℃持续加热20min,放置过夜后,颜色由淡黄色变为深褐色,以转速10000rpm离心10min,取沉淀进行洗涤、真空冷冻干燥后得到粉末状AgNPs。

一种利用余甘果提取液制备纳米银颗粒的方法及产品和应用

技术领域

[0001] 本发明属于绿色生物合成纳米材料技术领域,具体涉及一种利用余甘果提取液制备纳米银颗粒的方法及其在农业上的应用。

背景技术

[0002] 纳米银由于其独特的物理、化学特性及较强抗菌能力且不产生耐药性,被广泛地应用于化工、传感、食品包装、医药、环境技术等领域,具有很大的市场发展潜力。其中,较强的抗菌性能是由于其粒径小、比表面积大,很早就有研究报道Ag具有潜在的抑菌活性,可以抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等。

[0003] 目前合成纳米银的传统方法主要有物理法、化学法、微生物法,利用物理法和化学法具备简单可行性,但是其合成过程中能源需求大、易造成环境污染、易产生有毒副产物;利用微生物虽绿色环保,但是其生产周期长、对设备要求苛刻。因此,上述合成方法在大规模应用中均受到了极大的限制。

[0004] 为了解决上述问题,利用植物提取物绿色合成纳米金属材料的生物合成方法已成为目前的研究热点,其合成纳米金属材料的主要原理是植物提取液中包含的生物碱、酚类化合物、萜类化合物和辅酶等物质可作为还原剂和稳定剂制备纳米颗粒,由于合成过程环保、有效,利用植物生物合成纳米银已成为代替传统化学合成的一种具有广阔前景的环保型生产方法。

[0005] 如专利申请文献CN107671305A公开了一种利用小叶女贞果实提取液快速制备纳米银抑菌剂的方法,具体步骤为将果实提取液与适量 AgNO_3 进行混合,通过超声处理及光照射从而获得纳米银抑菌剂。专利申请文献CN106513707A公开了一种利用蓝莓叶提取液生物合成的纳米银抑菌剂及其的制备工艺,包括将 AgNO_3 溶液与蓝莓叶片提取液搅拌均匀后进行加热回流处理,得到生物合成的纳米银抑菌剂。

[0006] 但上述方法得到的纳米银抑菌剂的抑菌效果较差,且现有技术中公开的可用于合成纳米银颗粒的植物种类较少,针对这一问题,急需研制出一种制备纳米银颗粒的新型方法,并可以使得到的产物抑菌效果有所提高。

[0007] 另外,研究表明,水稻种子携带细菌性褐条病菌的现象非常普遍,易造成我国农业经济的巨大损失,而传统化学农药容易引起污染环境、细菌耐药性且造成人体潜在危害,因此,同样很有必要研发出一种新型绿色的防治水稻细菌性褐条病害方法。

发明内容

[0008] 本发明目的在于提供了一种利用余甘果提取液制备纳米银颗粒的方法,该制备工艺绿色环保、生产成本低、设备简单,得到的纳米银颗粒分散性好,具有很好的抑菌效果,

[0009] 本发明的另一目的在于提供了上述纳米银颗粒作为水稻细菌性褐条病害抑菌剂使用的应用,能很好的防治水稻细菌性褐条病病害,可用于替代传统化学抑菌剂。

[0010] 本发明的目的通过如下技术方案实现:

[0011] 一种利用余甘果提取液制备纳米银颗粒的方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 将余甘果洗净、烘干、切碎后与去离子水混合榨成汁,充分过滤后得到余甘果提取液;

[0013] (2) 将步骤(1)得到的余甘果提取液与 AgNO_3 溶液混合反应,再将得到的混合液经过离心、洗涤、真空冷冻干燥得到所述纳米银颗粒(AgNPs)。

[0014] 余甘果属于大戟科叶下珠属余甘果种,又称为牛甘果、油甘果,余甘子喜光、耐干旱,原产地是中国、印度、菲律宾等亚热带、热带地区,在中国主要分布在闽、台、粤、桂、滇等热带亚热带地区。余甘果具有丰富的维生素、矿物质、氨基酸及超氧化物歧化酶(SOD)和丰富的有机硒,具有具有止痛消炎、解毒及较强的抗氧化活性作用。

[0015] 本发明方法中选取来源于云南昆明的余甘果,利用其果实提取液制备AgNPs,实验表明得到的AgNPs结构稳定且对水稻细菌性褐条病病原物RS-2具有较强的抑菌作用,大大提高了纳米银对水稻褐条病原菌的抑制效果,具有极广泛的应用前景。

[0016] 步骤(1)中,所述余甘果与去离子水的质量比为1:5~15。

[0017] 使用榨汁机榨成汁,榨汁机的功率为150W~400W,功率过低会导致植物材料提取效率较低;功率过高则会造成不必要能源消耗。

[0018] 步骤(2)中,所述余甘果提取液与 AgNO_3 溶液混合后升温至60~70℃搅拌10~60min,再将得到的混合液置于20~30℃、避光环境中,待混合液的颜色由浅黄色变为深褐色即终止反应。

[0019] 上述混合加热的温度过低、搅拌时间过短会导致反应不充分、合成效果不佳,最终导致纳米银粒径过大且分布不匀,从而影响产物的抑菌效果;加热温度过高、时间过长则易变质且会造成不必要能源消耗。

[0020] 所述 AgNO_3 溶液的浓度为0.5~2mM,余甘果提取液与 AgNO_3 溶液的体积比为2~15:100。余甘果有效成分含量过高会影响AgNPs的生成,而其用量过低则会导致最终AgNPs的合成效率低。

[0021] 所述离心速率为8000~10000rpm,离心时间为5~20min,离心速率过低、时间过短,会导致上清不够澄清,最终获得的AgNPs粉末含杂质较多,进而影响抑菌效果。

[0022] 本发明还公开了根据上述方法制得的AgNPs作为农用杀菌剂在防治水稻褐条病害中的应用,所述AgNPs的粒径为15~100nm,其平均粒径小、结构稳定。

[0023] 具体应用方法为:将所述AgNPs溶于水制得AgNPs溶液,再将AgNPs溶液均匀喷洒于水稻苗上。优选地,AgNPs溶液浓度为20~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$,在此优选范围内的农用杀菌剂对水稻细菌性褐条病菌已有很好的抑制效果,进一步提高抗菌剂浓度,其杀菌效果提高不多,因此综合考虑成本和杀菌效果,AgNPs溶液浓度优选为20~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0024] 本发明方法制得AgNPs对当前引起我国严重发生的水稻细菌性褐条病菌具有较强的抑菌效果,实验表明该抗菌剂对水稻细菌性褐条病菌具有很好的抑制效果,且该农用杀菌剂环保、安全,即不会污染环境也不会对人体带来潜在危害。

[0025] 本发明与现有技术相比,具有以下有益效果:

[0026] (1) 本发明的制备工艺简单、成本低、无需额外添加还原剂与催化剂、能源消耗相对较少且不产生有毒副产物,十分环保和安全,属于绿色合成工艺,适合大规模生产;

[0027] (2) 本发明得到的AgNPs平均粒径小、结构稳定,能有效抑制水稻细菌性褐条病菌

的活性,具有极强的杀菌效果;

[0028] (3) 将本发明得到的AgNPs作为农用抗菌剂应用于防治水稻细菌性褐条病中,具有很好的防治效果;该植物来源的农用杀菌剂不仅不会污染环境,也不会对人体带来潜在危害,应用方式也简单易行,在农业生产领域中有广阔的应用和推广前景。

附图说明

[0029] 图1(A)为实施例1中利用余甘果提取液合成AgNPs液体的颜色变化照片,图1(B)为利用余甘果提取液在不同反应时间下合成AgNPs的紫外可见光谱图;

[0030] 图2(A)为实施例1中制得的AgNPs的红外光谱图,图2(B)为AgNPs的透射电镜图,图2(C)为AgNPs的X射线衍射图;

[0031] 图3(A)为实施例1中制得的AgNPs的扫描电镜图,图3(B)为AgNPs的EDS图;

[0032] 图4(A)为将实施例1中不同浓度AgNPs溶液对水稻褐条病菌的抑菌圈直径变化图,图4(B)为不同浓度AgNPs溶液对水稻褐条病菌的吸光值变化图;

[0033] 图5(A)为将实施例1中浓度为20 μ g/ml的AgNPs溶液在不同反应时间对水稻褐条病菌群体活力的影响图;图5(B)为AgNPs在不同反应时间对细菌群集运动直径的影响图。

[0034] 图6为在实施例1中在浓度为20 μ g/ml的AgNPs溶液作用8h后,荧光显微镜下水稻褐条病菌细胞染色图,其中,(A)阴性对照为未经AgNPs处理的细胞、(B)阳性对照为热处理后的细胞、(C)为经过AgNPs处理的细胞;

[0035] 图7为实施例1中浓度为20 μ g/ml的AgNPs溶液处理下水稻褐条病菌细胞壁TEM照片,其中(A)、(C)为未经处理的细胞形态,(B)(D)为处理后的细胞形态;

[0036] 图8为实施例1中浓度为20 μ g/ml的AgNPs溶液对病菌RS-2Hcp蛋白分泌的影响,其中,(A)为不同浓度Hcp蛋白的ELISA显色照片,(B)为标准曲线图,(C)为在20 μ g/mL AgNPs存在的情况下,菌株RS-2培养基中所分泌的Hcp蛋白ELISA反应呈强阳性,而在没有AgNPs存在的情况下,ELISA反应呈阴性。

具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施例,进一步阐明本发明。

[0038] 实施例1

[0039] (1) 将新鲜余甘果洗净、烘干、切碎后,称取10g余甘果与100ml去离子水混合,用功率为150W的榨汁机榨成汁,通过棉布和滤纸进行双重过滤,确保其中的固体杂质去除干净,从而得到余甘果提取液;

[0040] (2) 取15ml步骤(1)得到的余甘果提取液与100ml浓度为1mM AgNO₃溶液混合,60 $^{\circ}$ C持续加热20min,放置过夜后,颜色由淡黄色变为深褐色,以转速10000rpm离心10min,取沉淀进行洗涤、真空冷冻干燥后得到粉末状AgNPs。

[0041] 图1(A)为实施例1中利用余甘果提取液合成AgNPs溶液颜色的变化图,发现加入AgNO₃溶液后颜色由最初淡黄色变成深褐色。

[0042] 图1(B)为利用余甘果提取液在不同反应时间下合成AgNPs的紫外可见光谱,发现随着反应时间的延长,在430nm处的吸收值最强烈,说明合成的AgNPs较为稳定。

[0043] 利用紫外可见吸收光谱(UV-VIS)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)、透射电子显微镜

(TEM)、X射线衍射(XRD)、扫描电子显微镜(SEM)、能谱图(EDS)评价AgNPs的理化性质和结构特征。

[0044] 图2(A)为实施例1中利用余甘果提取液与AgNO₃反应得到AgNPs的傅里叶变换红外光谱图(FTIR),可知AgNPs已被成功合成;图2(B)为AgNPs的透射电镜图(TEM),可以看出合成AgNPs为球形颗粒物;图2(C)为AgNPs的X射线衍射图(XRD),在 $2\theta=38.178^\circ, 44.428^\circ, 64.583^\circ$ 及 77.639° 位置上分别出现(111), (200), (220), (311)的特征峰,与Ag₀粉末衍射图特征峰相一致,证明合成了稳定的AgNPs。

[0045] 图3为实施例1中制得的AgNPs的SEM及EDS图,由图3(A)可知。合成的纳米粒子大多为球形,粒径范围为19.8~92.8nm。

[0046] 实施例2

[0047] (1)将新鲜余甘果洗净、烘干、切碎后,称取10g余甘果与100ml去离子水混合,用功率为200W的榨汁机将其制成液体,通过棉布和滤纸进行双重过滤,确保其中的固体杂质去除干净,从而得到植物提取液;

[0048] (2)取2.5ml步骤(1)得到的余甘果提取液与100ml浓度为1mM AgNO₃溶液混合,65℃持续加热40min,放置过夜后,颜色由淡黄色变为深褐色,以转速8000rpm离心10min,取沉淀进行洗涤、真空冷冻干燥后得到粉末状AgNPs。

[0049] 实施例3

[0050] (1)将新鲜余甘果洗净、烘干、切碎后,称取10g余甘果与100ml去离子水混合,用功率为400W的榨汁机将其制成液体,通过棉布和滤纸进行双重过滤,确保其中的固体杂质去除干净,从而得到植物提取液;

[0051] (2)取10ml步骤(1)得到的余甘果提取液与100ml浓度为1mM AgNO₃溶液混合,70℃持续加热30min,放置过夜后,颜色由淡黄色变为深褐色,以转速9000rpm离心15min,取沉淀进行洗涤、真空冷冻干燥后得到粉末状AgNPs。

[0052] 抑菌效果评价:

[0053] (一)AgNPs浓度对抑菌效果的影响

[0054] 为了评估AgNPs抑制水稻褐条病菌的活性,将实施例1中制备的AgNPs粉末分别配制成浓度为5、10、20、30μg/mL溶液,通过测定平板抑菌圈直径、菌液吸光值评估不同AgNPs浓度的抑菌性能。

[0055] 由图4(A)可知,与对照组相比,添加AgNPs溶液的平板上抑菌圈最大可达到1.96cm,抑制率高达86.67%;由图4(B)可知,当添加浓度为5、10、20、30μg/mL的AgNPs溶液,其生长抑制率分别为14.70%,27.65%,62.41%,67.43%,可见浓度越高抑菌效果越好,但是当浓度在20μg/mL的基础上进一步提高时,其抑菌率增加不多,抑菌效果增加不明显。

[0056] 由图4可知,AgNPs溶液的浓度越高,其抑菌效果越好,利用余甘果合成的AgNPs能够显著抑制水稻褐条病菌生长。

[0057] (二)AgNPs与水稻褐条病菌的接触时间对抑菌效果的影响

[0058] 为了充分了解所述实施例1合成的AgNPs抑制水稻褐条病菌效果是否与两者接触反应时间有关,综合考虑成本及抑菌效果,选取浓度为20μg/mL AgNPs溶液加入菌液中,通过控制两者反应时间,隔点取样测量其OD值。此外通过平板抑菌圈实验进一步验证。

[0059] 表1为AgNPs与水稻褐条病菌接触时间对其抗菌活性的影响,由表1可知,两者接触

1.5h、3h、6h后,细胞存活率相比于对照组下降1.4、3.65、4.09 \log_{10} CFU mL^{-1} ,在与AgNPs接触12h后,细胞存活率下降4.97 \log_{10} CFU mL^{-1} ,抑制率达61.43%。

[0060] 图5(A)表明AgNPs对细菌群体运动有抑制作用,在反应24、48、72h后抑菌率分别为23.68%、33.66%和33.67%。由图5(B)可以直观看出所合成的AgNPs对细菌群集运动有影响。

[0061] 综上所述,利用余甘果合成的AgNPs对水稻褐条病菌抑制效果与两者接触反应时间有关,接触时间越长,抑菌效果越好。

[0062] 表1AgNPs与水稻褐条病菌接触时间对纳米银抗菌活性的影响

接触时间(h)	细菌存活数(\log_{10} CFU mL^{-1})	
	空白	AgNPs
0	8.19±0.010 a ^b	8.19±0.010 e
1.5	8.18±0.013 a	6.78±0.089 d
3	8.16±0.012 a	4.51±0.056 c
6	8.12±0.022 a	4.03±0.024 b
12	8.09±0.027 a	3.12±0.041 a

[0063] (三) AgNPs抑菌效果

[0064] 为了进一步证明AgNPs确实能够破坏细胞结构,导致其死亡,从而起到良好的抑菌作用,将实施例1中合成的AgNPs粉末与水配制成20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液。将得到的AgNPs溶液与水稻细菌性褐条病原菌反应8h后,通过染色在荧光显微镜下进行观察,得到的染色图如图6所示。

[0065] 图6中,以不经过AgNPs处理的菌液样品为阴性对照,以热处理后的样品为阳性对照,绿色荧光表示细胞完整、具有活性,红色荧光表示细胞由于损坏或者其他原因失去活性、死亡。

[0066] 图6(A)表示未经处理的细胞处于正常状态,图6(B)显示热处理后细胞全死亡,图6(C)可以看出经过处理的细胞显著减少,说明AgNPs能够抑制细胞的生长。

[0067] 此外,通过透射电镜可以更加直观地看出细胞破坏程度,图7为实施例1中浓度为20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的AgNPs溶液处理下水稻褐条病菌细胞壁TEM照片,(A)、(C)图为电镜放大倍数不同下观察到的正常、完整的细胞形态,而与之对应(B)、(D)图中经过处理后细胞膜皱褶、细胞呈现不正常的状态。

[0068] (四) AgNPs对水稻褐条病原菌分泌Hcp蛋白的影响

[0069] 据报道Hcp蛋白与细菌毒力有关,当受细胞膜损伤的强烈诱导Hcp效应蛋白分泌将增加,通过测定水稻褐条病原菌分泌Hcp蛋白能力大小,从而评估合成的AgNPs杀菌能力。

[0070] 通过对浓度为20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的AgNPs溶液处理下病菌RS-2Hcp蛋白分泌的影响进行ELISA实验,得到不同浓度Hcp蛋白显色情况及标准曲线。

[0071] 由图8(A)可知,Hcp浓度越高,颜色越深,证明该实验的可靠性,此外,由图8(C)可

知,在20 μ g/mL AgNPs存在的情况下,菌株RS-2培养基中所分泌的Hcp蛋白ELISA反应呈强阳性,而在没有AgNPs存在的情况下,ELISA反应呈阴性。

[0073] 图8(B)为ELISA标准曲线图,由高相关系数($R^2=0.999$)验证了该曲线的合理性,根据标准曲线定量分析,阳性对照和AgNPs处理样品Hcp浓度分别为0.012mg/mL和0.015mg/mL。

[0074] 由此可知,AgNPs对RS-2菌株Hcp蛋白的分泌有影响,从而表明其对RS-2细菌的细胞膜具有损伤作用。

[0075] 应用例

[0076] 在温室中或田间称取实施例1得到的AgNPs粉末1g溶于50L水中配制成20 μ g/ml AgNPs溶液,均匀喷施在可能产生细菌性褐条病的水稻苗上,观察发现喷施过AgNPs溶液的水稻苗较未喷施的水稻苗生长较好,由此可以说明AgNPs溶液能够有效地对水稻苗进行病害防治。

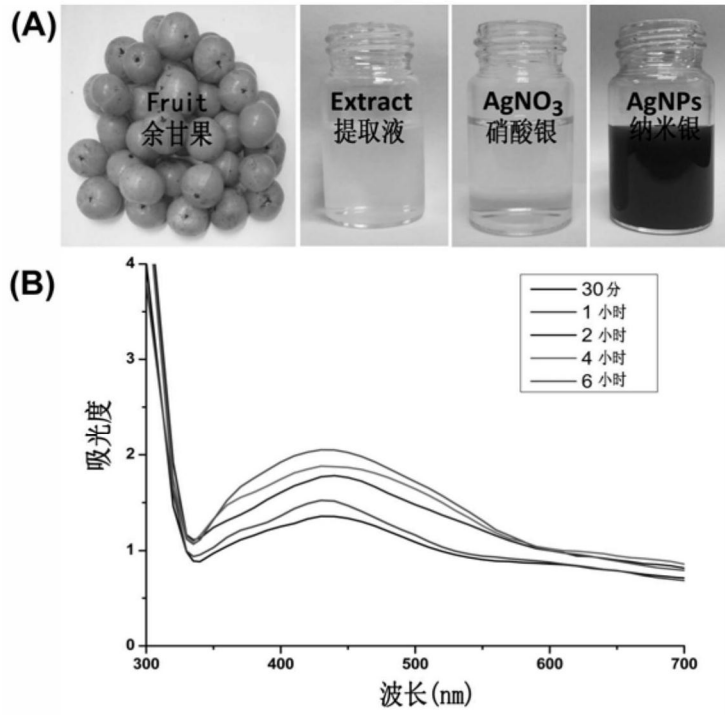


图1

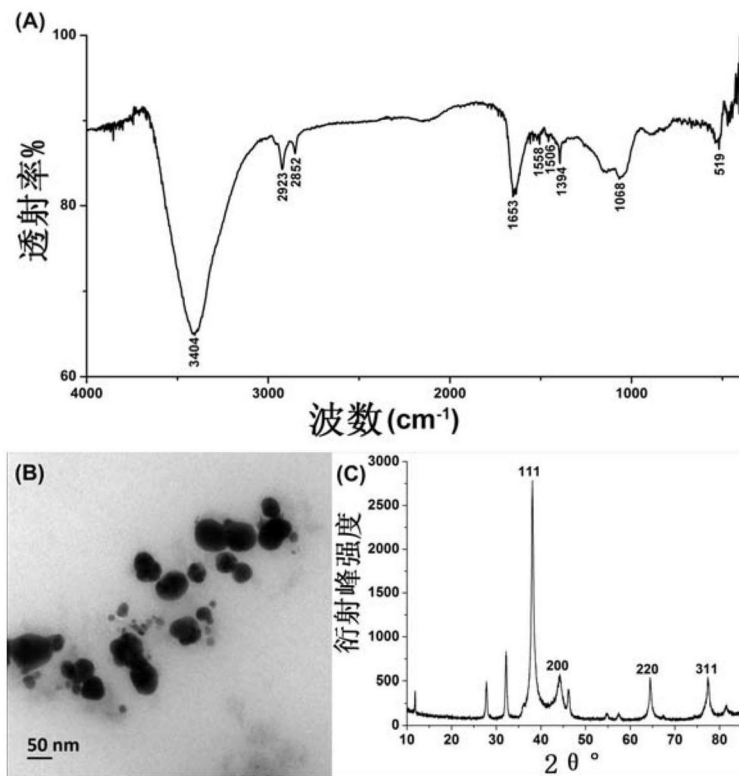


图2

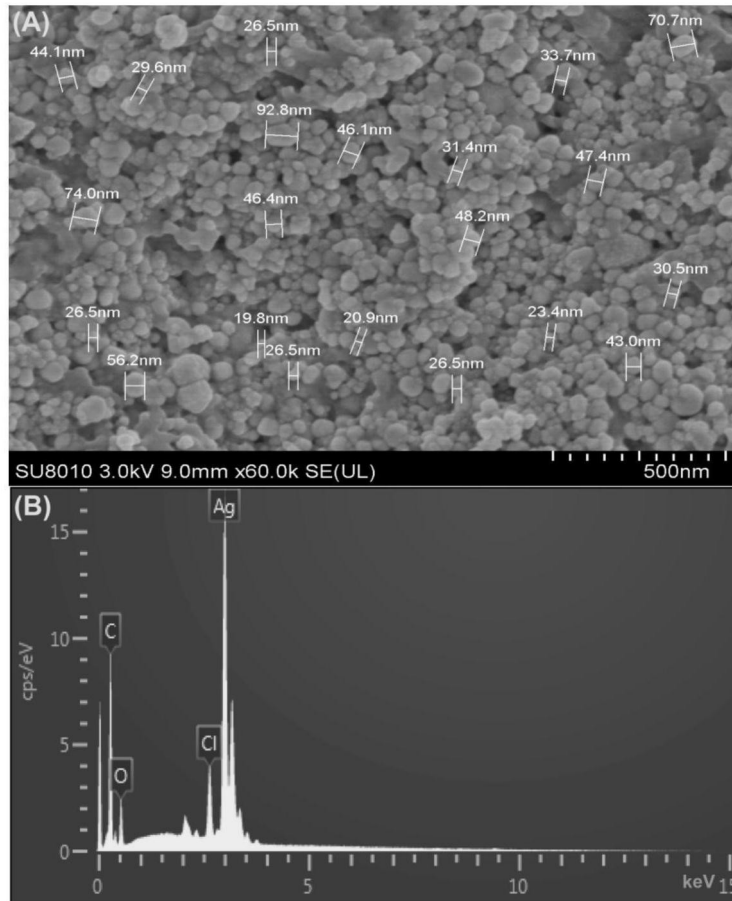


图3

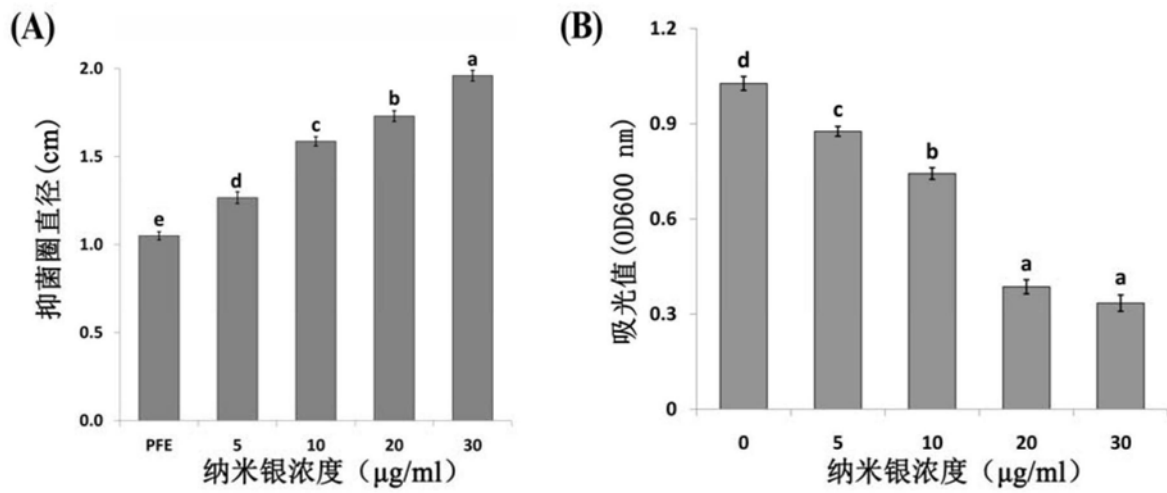


图4

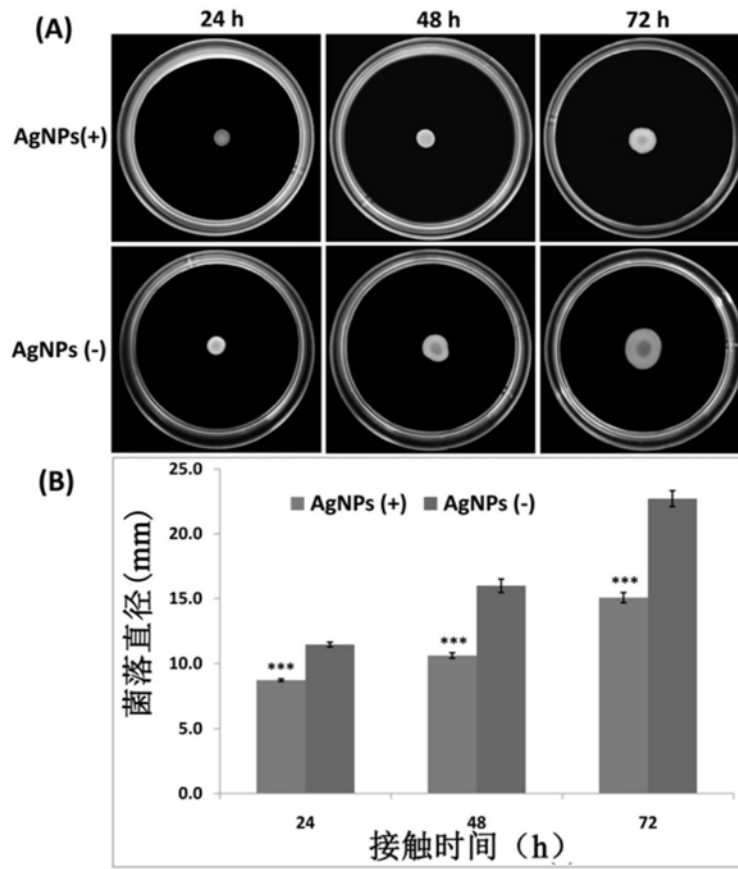


图5

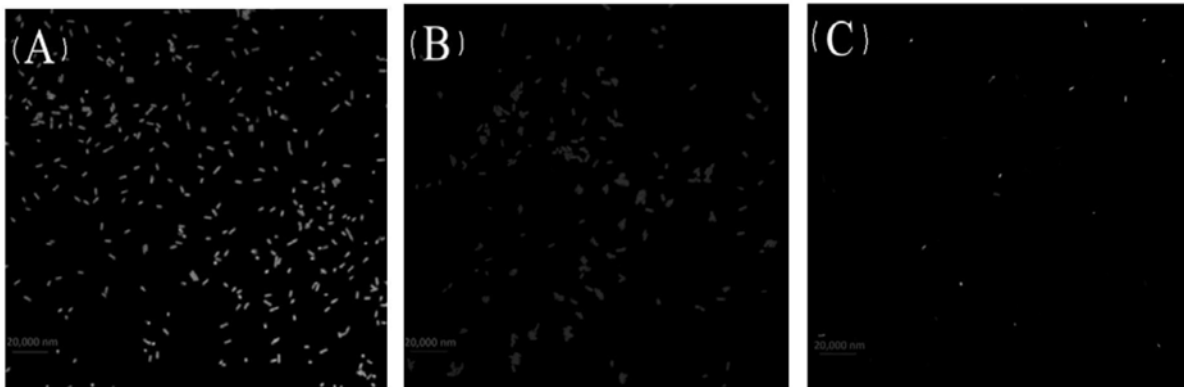


图6

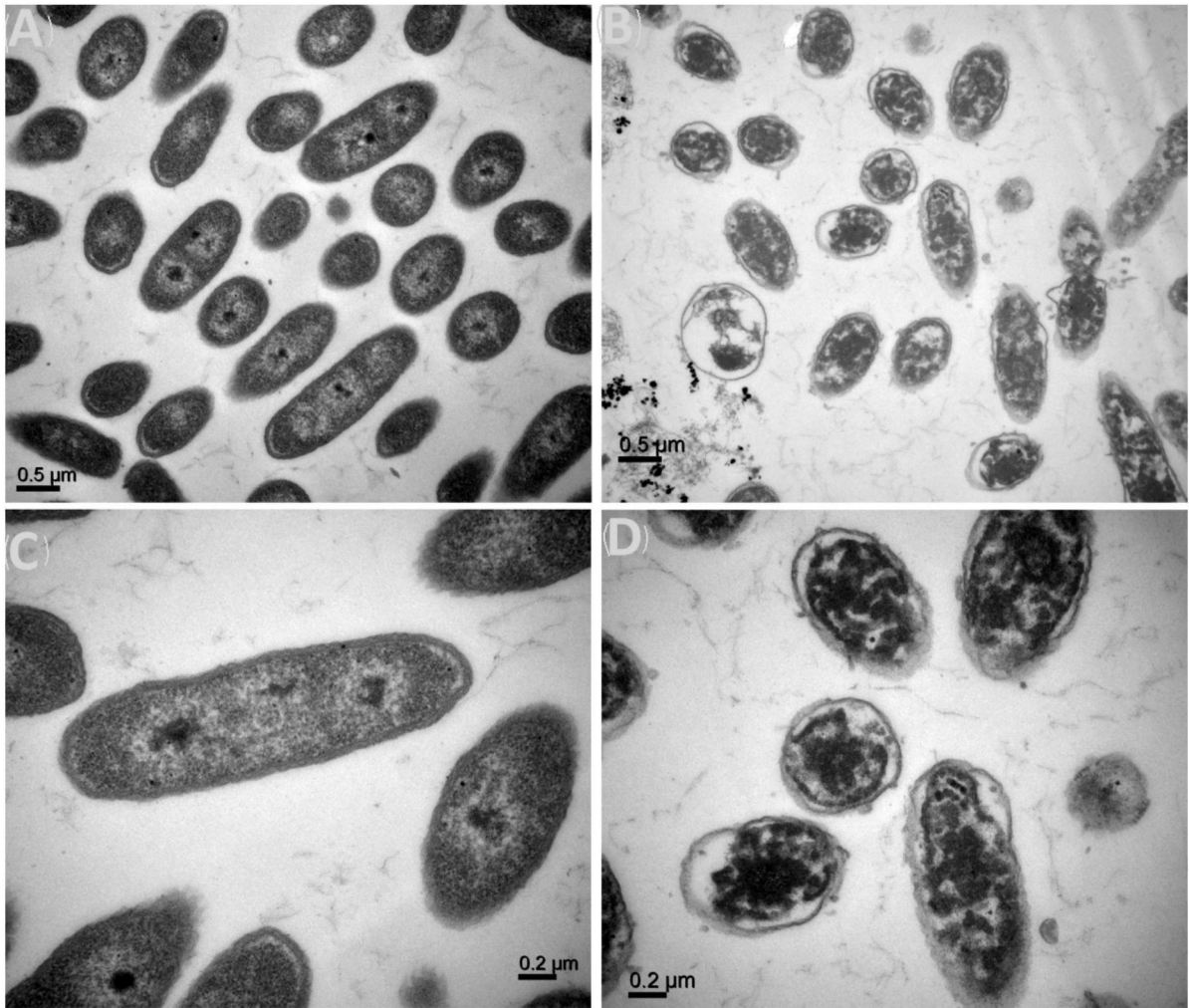


图7

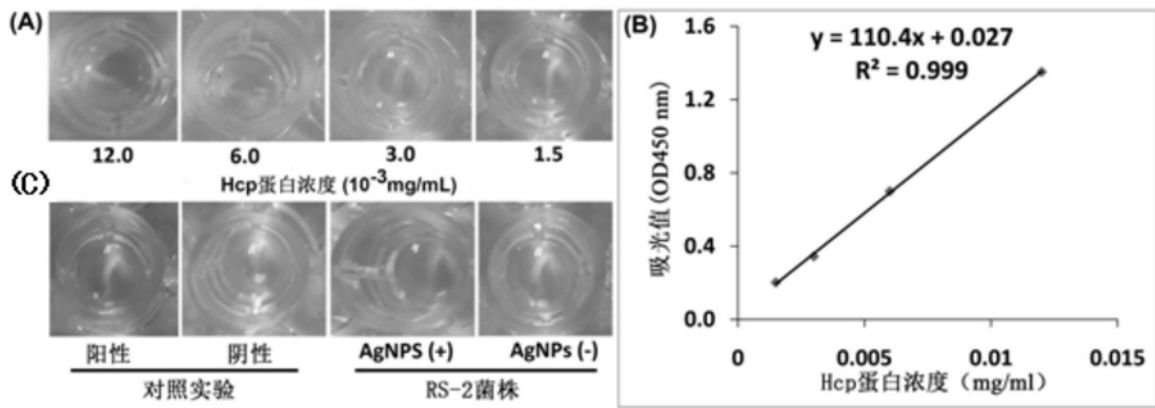


图8