

УДК 577.11

«Зеленые» нанотехнологии: синтез металлических наночастиц с использованием растений

В. В. Макаров^{1,2}, А. Лав³, О. В. Сеницына^{2,6}, С. С. Макарова^{2,5}, И. В. Яминский^{2,4},
М. Э. Тальянский^{2,3}, Н. О. Калинина^{1,2*}

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

²Центр перспективных технологий, 119311, Москва, ул. Строителей, 4, корп. 5

³Институт Джеймса Хаттона, Данди, Великобритания, DD2 5DA

⁴Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

⁵Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

⁶Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28

*E-mail: kalinina@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 03.09.2013

РЕФЕРАТ Биобезопасность и экологическая чистота производства металлических наночастиц, применение которых во многих секторах экономики растет значительными темпами, являются актуальной проблемой. Химические и физические методы, применяемые для получения наночастиц, часто дороги и потенциально опасны для окружающей среды. Настоящий обзор посвящен возможностям синтеза металлических наночастиц с использованием экстрактов растений. Этот подход активно разрабатывается в последние годы в качестве альтернативного, эффективного, дешевого и экологически безопасного метода получения наночастиц с заданными свойствами. В обзоре детально рассмотрены различные факторы, влияющие на морфологию, размер и выход металлических наночастиц. Основное внимание уделено роли природных растительных соединений, участвующих в биовосстановлении солей металлов в процессе синтеза наночастиц. Приведены примеры эффективного использования экзогенных биоматриц (пептидов, белков и вирусных частиц) для получения наночастиц в экстрактах растений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биоматрицы, биовосстановление, металлические наночастицы, растительные метаболиты, экстракты растений.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое практическое применение наночастиц (частиц размером менее 100 нм) обусловлено целым рядом их уникальных свойств [1–4]. В настоящее время для синтеза металлических наночастиц используют различные физические и химические процессы, позволяющие получать наночастицы с заданными свойствами [5–8]. Однако, несмотря на широкое распространение, это, как правило, дорогостоящие, трудоемкие способы, сопряженные с риском и потенциальной опасностью для окружающей среды и живых организмов [9, 10]. Таким образом, существует очевидная потребность в альтернативных экономически эффективных и в то же время безопасных и экологически чистых методах произ-

водства наночастиц [11–13]. В течение последнего десятилетия показано, что многие биологические системы, включая растения и водоросли [14], диатомовые водоросли [15, 16], бактерии [17], дрожжи [18], грибы [19] и клетки человека [20], могут превращать ионы неорганических металлов в металлические наночастицы за счет процесса восстановления, осуществляемого белками и метаболитами, которые содержатся в этих организмах. Существенно, что производство наночастиц с использованием растений, описанию которого посвящен настоящий обзор, имеет важные преимущества перед другими биологическими системами. Низкая стоимость выращивания, короткие сроки производства, безопасность и возможность регуляции необходимого объ-

ема продукции делают растения привлекательной платформой для синтеза наночастиц [21].

РАСТЕНИЯ КАК БИОРЕАКТОРЫ ДЛЯ СИНТЕЗА МЕТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ

Давно известно, что растения способны восстанавливать ионы металлов как на своей поверхности, так и в различных органах и тканях, удаленных от места проникновения ионов. В связи с этим растения используются для извлечения ценных металлов из земель приисков или карьеров в тех случаях, когда традиционные способы становятся невыгодными. Подобный процесс в настоящее время называется фитодобычей. Накопленные металлы можно извлекать из убранных растений с использованием агломерационного и плавильного методов. Интересно, что исследование процесса биоаккумуляции металлов в растениях показало, что металлы, как правило, откладываются в виде наночастиц. Например, растения *Brassica juncea* (листовая горчица) и *Medicago sativa* (люцерна посевная) накапливали наночастицы серебра размером 50 нм в количестве до 13,6% от собственного веса при выращивании на нитрате серебра в качестве субстрата [22]. Икосаэдры золота размером 4 нм выявлялись в *M. sativa* [23], полусферические частицы меди размером 2 нм – в *Iris pseudocorus* (ирис псевдоаирный) [24], выращенных на субстратах, содержащих соли соответствующих металлов. Очевидно, что целые растения могут быть использованы для производства наночастиц металлов. Вместе с тем существуют определенные ограничения, которые должны учитываться при промышленном применении данной технологии. Во-первых, размер и форма наночастиц варьируют в зависимости от места их локализации в растении, что, вероятно, зависит от различий в содержании ионов металлов в различных тканях и возможности проникновения наночастиц. В свою очередь, эти обстоятельства могут влиять на скорость постепенного отложения металла вокруг уже существующих наночастиц, а также на новые акты нуклеации (инициации формирования наночастицы) [23]. Неоднородность размера и морфологии наночастиц, образующихся в целых растениях, могут затруднять их использование в тех случаях, когда для определенной цели требуются частицы заданного размера и формы. Во-вторых, существует проблема эффективного извлечения наночастиц из растительного материала. Наконец еще одна проблема – невозможность адаптации формы наночастиц, синтезированных в целом растении, до соответствующей рыночным требованиям.

В связи с этим в последние годы активно развиваются подходы *in vitro*, в которых для биовосстановления ионов металлов с образованием наночастиц

используют растительные экстракты. Такие подходы обеспечивают более гибкий контроль за размером и формой наночастиц (например, путем изменения pH среды и температуры проведения реакции), а также способствуют простой последующей очистке. Существенно, что этот процесс происходит намного быстрее, чем синтез наночастиц в целых растениях, так как реакция происходит практически мгновенно без задержки, требующейся для поглощения и распространения ионов металла по всему растению. Целесообразность такого подхода показана с использованием экстрактов из множества различных видов растений в сочетании с разнообразием кислот и солей металлов, таких, как медь, золото, серебро, платина, железо и многие другие [22, 25–27].

Например, экстракты *Pelargonium graveolens* (герань пахучая) восстанавливали ионы золота до наночастиц десятигранной икосаэдрической формы размером 20–40 нм и стабилизировали их [28], в то время как в экстрактах из *Cymbopogon flexuosus* (лимонное сорго) синтезировались золотые наносферы и нанотреугольники размером 0,05–18 мкм [29]. Экстракт из *Azadirachta indica* (ним, азадирахта индийская) использовали для восстановления тетрахлорзолотой кислоты (HAuCl_4) в золотые плоские треугольники и шестиугольники размером 50–100 нм [30]. В этой работе также показано, что сок *A. indica* может восстанавливать нитрат серебра в полидисперсные сферические наночастицы размером 5–25 нм [30]. Экстракт листьев *Aloe barbadensis* (алоэ вера) использовали для производства кубических частиц In_2O_3 размером 5–50 нм [31]. С использованием метода ИК-Фурье-спектроскопии показано, что такие растительные метаболиты, как сахара, терпеноиды, полифенолы, алкалоиды, фенольные кислоты и белки, играют важную роль в восстановлении ионов металла до наночастиц и в обеспечении их последующей стабильности [29, 30, 32–34]. Было высказано предположение, что контроль размера и морфологии наноструктур может быть связан с взаимодействием этих биомолекул с ионами металлов [30]. Различные растения различаются концентрацией и составом этих биологически активных компонентов. По всей видимости, этим можно частично объяснить морфологическое разнообразие описанных наночастиц: треугольники, шестиугольники, пятиугольники, кубы, сферы, эллипсоиды, нанопровода, наностержни. Разнообразие морфологии и размера наночастиц, синтезируемых из ионов различных металлов в экстрактах растений разных видов, детально описано в обзорах [11, 35]. В качестве примера на рис. 1 приведены изображения наночастиц серебра, золота и железа, образованных в экстрактах *Nicotiana benthamiana*.

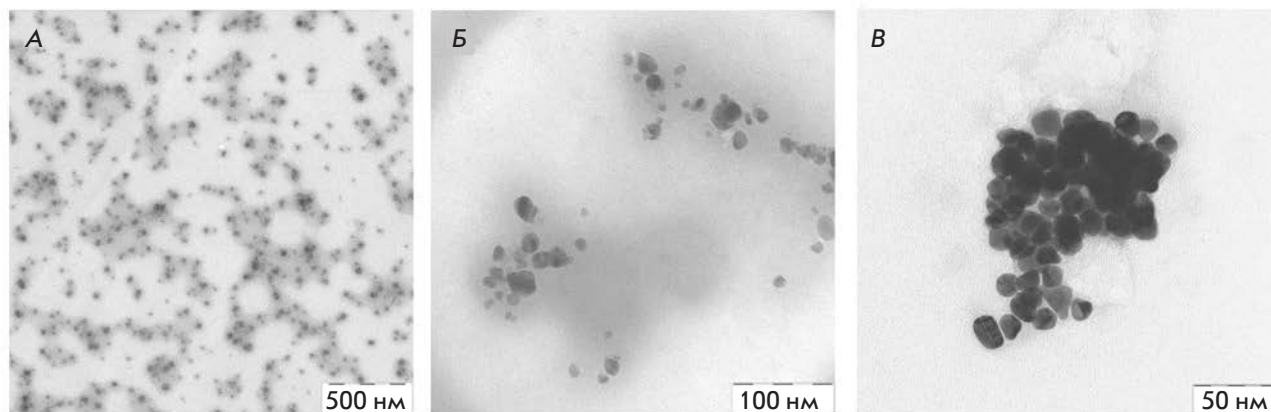


Рис. 1. Электронные микрофотографии наночастиц железа (А), серебра (Б) и золота (В), синтезированных в экстрактах *N. benthamiana* при комнатной температуре

РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ В СВЯЗЫВАНИИ И ВОССТАНОВЛЕНИИ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ

Как упоминалось выше, разнообразные метаболиты растения, включающие терпеноиды, полифенолы, сахара, алкалоиды, фенольные кислоты и белки, играют важную роль в биовосстановлении ионов металла с образованием наночастиц. Примеры основных типов соединений, способных восстанавливать ионы металла, приведены на рис. 2.

С использованием ИК-Фурье-спектроскопии наночастиц, синтезированных в растениях/растительных экстрактах, показано, что терпеноиды часто ассоциированы с наночастицами. Терпеноиды представляют собой класс разнообразных органических полимеров, синтезирующихся в растениях из пятиуглеродных изопреновых звеньев. Терпеноиды обладают мощным антиоксидантным действием. Шанкар и соавт. [29] предполагают, что именно они играют ключевую роль в превращении ионов серебра в наночастицы в реакциях с использованием экстрактов из листьев герани. Обнаружено [36], что эвгенол, основной терпеноид экстрактов *Cinnamotum zeylanicum* (корица), был главным участником биовосстановления HAuCl_4 и AgNO_3 с образованием наночастиц. На основании данных ИК-Фурье-спектроскопии предположили [36], что диссоциация протона OH -группы эвгенола приводит к образованию резонансных структур, способных к дальнейшему окислению. Этот процесс сопровождается активным восстановлением ионов металлов с последующим образованием наночастиц.

Показано, что в растениях флавоноиды могут включать ионы металлов в хелатный комплекс и восстанавливать их. Флавоноиды представляют собой обширную группу полифенольных соедине-

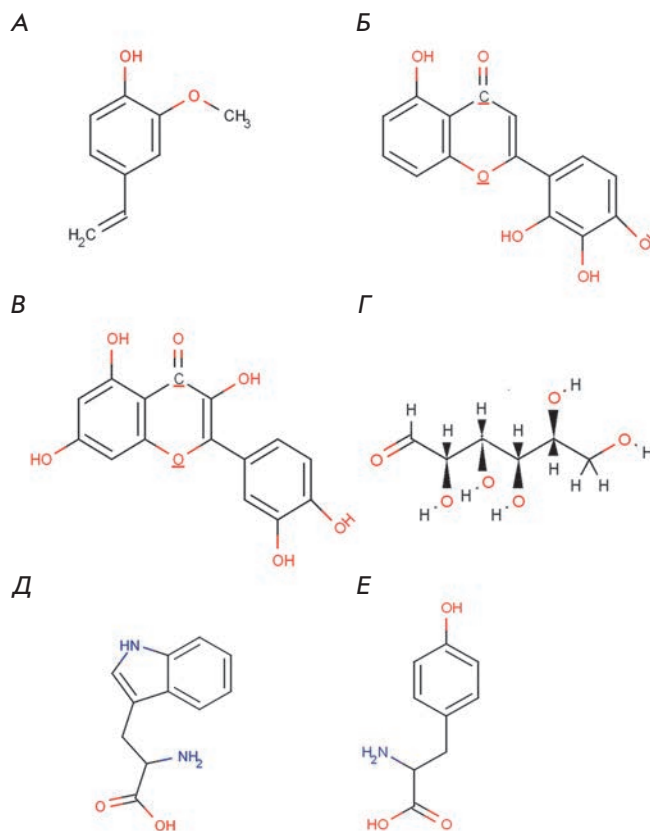


Рис. 2. Основные типы растительных метаболитов, участвующих в синтезе металлических наночастиц. А – терпеноиды (эвгенол); Б, В – флавоноиды (лютеолин (Б), кверцетин (В)); Г – восстанавливающая гексоза с открытой формой цепи; Д, Е – аминокислоты (триптофан (Д), тирозин (Е))

ний, в которых выделяют несколько классов: антоцианы, изофлавоноиды, флавонолы, халконы, флавоны и флаваноны. Флавоноиды содержат различные функциональные группы, которые могут вызывать образование наночастиц. Предположено, что таутомерные превращения флавоноидов из енольной формы в кетоформу могут высвобождать реакционноспособный атом водорода, который может восстанавливать ионы металлов с образованием наночастиц. Например, считается, что в случае экстрактов *Ocimum basilicum* (базилик душистый) именно преобразование флавоноидов лютеолина и розмариновой кислоты из енол- в кетоформу играет ключевую роль в формировании наночастиц серебра из ионов Ag [37]. Вполне вероятно, что внутренний механизм преобразования кетонов в карбоновые кислоты в флавоноидах может участвовать в восстановлении ионов Au³⁺. Интересно, что некоторые флавоноиды обладают способностью хелатировать ионы металлов через их карбонильные группы или π-электроны. Например, кверцетин является флавоноидом с очень сильной хелатирующей активностью, так как он может образовывать три хелатных цикла с участием карбонила и гидроксильных в положении С3 и С5 и катехольной группы в положении С3' и С4'. Эти группы хелатируют разнообразные ионы металлов, такие, как Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Al³⁺, Cr³⁺, Pb²⁺ и Co²⁺. Действительно, наличие таких механизмов может объяснять способность флавоноидов адсорбироваться на поверхности формирующейся наночастицы. Это, вероятно, означает, что они принимают участие в стадиях инициации формирования наночастицы (нуклеации) и дальнейшей агрегации в дополнение к стадии биовосстановления. Кроме того, изолированные флавоноиды и гликозиды флавоноидов обладают способностью индуцировать образование металлических наночастиц. Например, апиин (гликозид апигенина) был выделен из *Lawsonia inermis* (лавсония неколючая, хна) и использован для синтеза анизотропных золотых и квазисферических серебряных наночастиц со средним размером 21–30 нм [38]. ИК-Фурье-анализ показал, что апиин прикреплен к наночастицам через карбонильную группу.

Существуют данные, согласно которым сахара, присутствующие в растительных экстрактах, также могут индуцировать образование металлических наночастиц. Известно, что такие моносахариды, как глюкоза (линейные и содержащие альдегидную группу), могут действовать как восстановители. Те моносахариды, которые содержат кетогруппу, например фруктоза, могут действовать в качестве антиоксидантов только после того, как претерпят серию таутомерных преобразований из кетона в альдегид. Более того, восстанавливающая способность

дисахаридов и полисахаридов зависит от того, может или нет любой из их отдельных моносахаридных компонентов дециклизоваться в составе олигомера и, следовательно, обеспечить доступ (иона металла) к альдегидной группе. Например, дисахариды лактоза и мальтоза обладают восстанавливающей способностью, так как по крайней мере один из их мономеров может принимать открытую цепную форму. Напротив, у сахарозы нет способности восстанавливать ионы металлов, поскольку мономеры глюкозы и фруктозы связаны таким образом, что открытая цепная форма не может образоваться. Обнаружено [39], что глюкоза способна участвовать в синтезе металлических наночастиц разнообразной морфологии, тогда как фруктоза опосредует синтез монодисперсных наночастиц золота и серебра. Отмечено также [39], что глюкоза является более мощным восстановителем, чем фруктоза, так как антиоксидантный потенциал фруктозы ограничен кинетикой таутомерных сдвигов. Показано [39], что сахароза не способна восстанавливать нитрат серебра или хлорид палладия в наночастицы. Однако, когда эти соли металлов были заменены тетрахлорзолотой и тетрахлорплатиновой кислотой, то наночастицы формировались и в присутствии сахарозы. Вероятно, кислоты вызывали гидролиз сахарозы до свободной глюкозы и фруктозы, которые имеют структуру открытой цепной формы. В настоящее время считается, что альдегидная группа сахара окисляется до карбоксильной группы через нуклеофильное присоединение OH-, что, в свою очередь, приводит к восстановлению ионов металла и синтезу наночастиц. Сходный механизм предложен и для биовосстановления ионов золота с использованием экстракта лимонника [29].

ИК-Фурье-анализ наночастиц, синтезированных в растениях или растительных экстрактах, показал, что образующиеся наночастицы очень часто выявляются в ассоциации с белками [40]. Установлено, что аминокислоты обладают разной способностью связывания ионов металлов и их восстановления. Например, как ранее наблюдал Грюен [41], такие аминокислоты, как лизин, цистеин, аргинин и метионин, способны связывать ионы серебра. Другие исследования показали, что аспарат может восстанавливать тетрахлорзолотую кислоту с образованием наночастиц, хотя валин и лизин такой способностью не обладают [42]. Недавно Тан и соавт. [43] проанализировали все 20 природных α-аминокислот для того, чтобы определить их потенциал в восстановлении или связывании ионов металлов. Они обнаружили, что триптофан является самым мощным восстановителем ионов Au, тогда как гистидин – один из самых сильных связывающих ионы Au. Аминокислоты могут связывать ионы металла через amino- и карбониль-

ные группы основной цепи или через боковые цепи, такие, как карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислоты, или атом азота имидазольного кольца гистидина. Другие боковые цепи, связывающие ионы металлов, включают тиол (цистеин), простой тиоэфир (метионин), гидроксил (серин, треонин и тирозин) и карбонильные группы (аспарагин и глутамин) [44]. Изучение способности восстанавливать ионы металлов показало, что гидроксильные группы тирозина и карбонильные группы аспарагина и глутамина вовлечены в процесс восстановления ионов Ag. Боковые тиольные группы (например, цистеина) и аминокислоты также ответственны за восстановление ионов металлов.

После включения аминокислот в пептидную цепь их индивидуальная способность связывать и восстанавливать ионы металла может измениться. Например, формирование пептидного остова меняет функциональность R-углерода карбоновых кислот и аминов отдельных аминокислотных остатков, поскольку они переходят в форму, недоступную для взаимодействия с ионами металлов. Однако свободные боковые цепи аминокислот по-прежнему могут участвовать в связывании и восстановлении ионов металла. Пригодность боковых цепей для такого взаимодействия может меняться в зависимости от аминокислотной последовательности, влияющей на доступность отдельных групп. В работе Тан и соавт. [43] подробно объяснено, каким образом аминокислотная последовательность может влиять на способность белков хелатировать и/или восстанавливать ионы металлов. Обнаружено, что синтезированные пептиды, в состав которых входят аминокислоты, способные эффективно связывать ионы металла, и аминокислоты с высокой восстановительной активностью, имели более низкие показатели восстановления, чем ожидалось. Предположили, что сильное связывание ионов металла сказывается на способности аминокислоты их восстанавливать. Установлено также, что пептиды, содержащие аминокислоты, слабо связывающие ионы металла, такие, как лейцин, фенилаланин и пролин, были неэффективными при восстановлении анионов тетрахлорзолотой кислоты, возможно, из-за неспособности удержать и нужным образом ориентировать ионы металла в процессе восстановления. Предполагается [44], что молекулы белка, способствующие образованию наночастиц из ионов металла, должны обладать высокой восстановительной активностью и высоким потенциалом для привлечения ионов металлов в участки молекулы, отвечающие за восстановление, однако их хелатирующая активность не должна быть чрезмерной. Дополнительно в этой работе показано, что аминокислотная последовательность белка может сильно

влиять на размер, морфологию и количество образующихся наночастиц. Например, синтетический пептид GASLWWSEKL быстро восстанавливает ионы металлов с образованием большого числа мелких наночастиц размером менее 10 нм, тогда как замена N- и C-концевых аминокислотных остатков в пептиде (SEKLWWGASL) приводит к более медленной реакции восстановления, в результате которой образуются более крупные наносферы и нанотреугольники размером около 40 нм. Эти данные указывают на то, что пептиды и белки, присутствующие в растительных экстрактах, играют, вероятно, очень важную роль в определении формы наночастиц и влияют на итоговый выход наночастиц.

В целом механизм синтеза металлических наночастиц в растениях и растительных экстрактах включает три основные фазы: 1) фазу активации, в процессе которой происходит восстановление ионов металла и нуклеация восстановленных атомов металла; 2) фазу роста, в течение которой происходит спонтанное включение мелких соседних наночастиц в частицы большего размера (непосредственное формирование наночастиц за счет гетерогенной нуклеации и роста), что сопровождается увеличением термодинамической стабильности наночастиц; кроме того, происходит дальнейшая аккумуляция ионов металлов и превращение мелких наночастиц в более крупные в процессе оствальдовского созревания, или перекоагуляции, и 3) фазу терминации процесса, определяющую окончательную форму наночастиц [44, 45]. Процесс образования наночастиц схематически изображен на рис. 3. При увеличении длительности фазы роста наночастицы агрегируют между собой, образуя нанотрубки, нанопризмы, наносестиугольники, а также множество других наночастиц нерегулярной формы [44, 46]. В фазе терминации наночастицы приобретают наиболее энергетически выгодную конформацию, причем на этот процесс сильно влияет способность растительного экстракта стабилизировать металлические наночастицы. Например, нанотреугольники имеют очень высокую поверхностную энергию, которая делает их менее стабильными, и, если стабильность наночастиц не поддерживается в данных экстрактах, то нанотреугольники будут приобретать более стабильную морфологию, такую, как усеченные треугольники, чтобы минимизировать свободную энергию Гиббса.

ДРУГИЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛА В РАСТЕНИЯХ

Таким образом, на процесс восстановления ионов металлов с образованием наночастиц влияет большое количество факторов: кроме природы растительного экстракта, содержащего активные биомолекулы

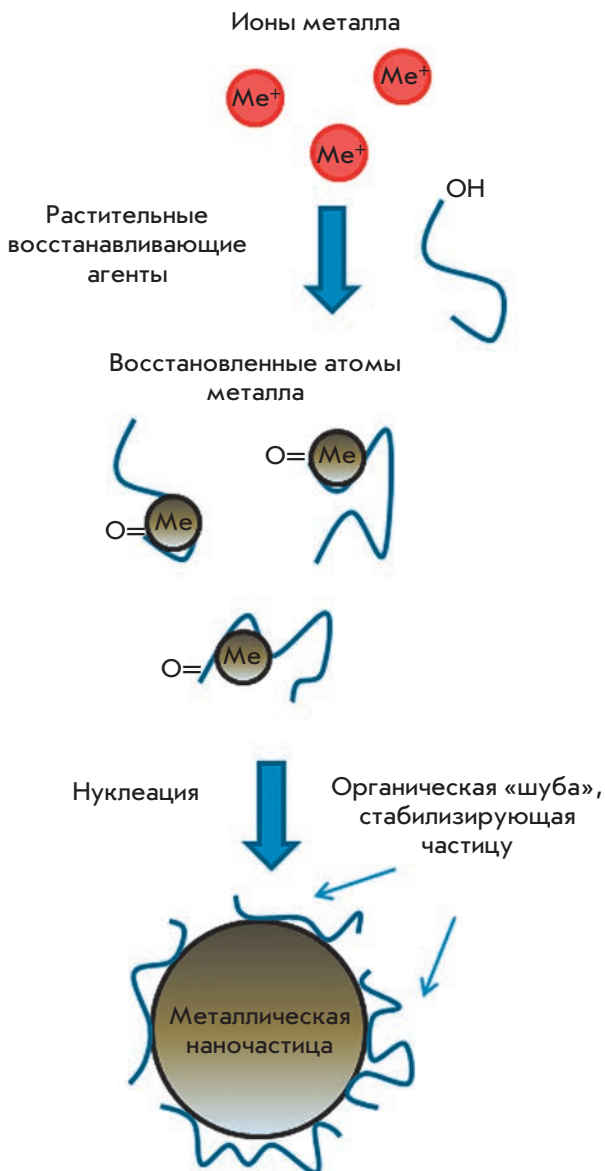


Рис. 3. Схема синтеза металлических наночастиц в растительном экстракте. Ионы металла связываются с восстанавливающими метаболитами и стабилизирующими агентами, восстанавливаясь до атомов металлов. Полученный комплекс атома металла с металлотом взаимодействует с другими комплексами, формируя металлическую наночастицу, затем происходит рост и слияние отдельных мелких наночастиц в более крупные за счет процесса переконденсации до тех пор, пока частицы не примут форму и размер, стабильные в данных условиях

в разном сочетании и концентрации (эффекты которых описаны выше), сюда входят значение pH реакционной смеси, температура инкубации, продолжительность реакции, концентрация и электрохимический потенциал иона металла [11, 35, 47, 48].

Большое влияние на формирование наночастиц оказывает величина pH растительного экстракта [49–52]. Изменение pH приводит к изменению заряда природных фитореагентов в составе экстракта, что влияет на их способность связывать и восстанавливать катионы и анионы металлов в процессе синтеза наночастиц, а это в свою очередь может влиять на форму, размер и выход наночастиц. Например, в экстракте *Avena sativa* (овес посевной) более многочисленные золотые наночастицы небольшого размера формировались при pH 3.0 и 4.0, тогда как при pH 2.0 наблюдались более агрегированные частицы. Поэтому предположили, что при очень кислых значениях pH процесс агрегации наночастиц преобладает над процессом восстановления и первичной нуклеации восстановленных атомов. Возможно, это может быть связано с тем, что при pH 3.0 и 4.0 доступным становится большее число функциональных групп, связывающих и нуклеирующих ионы тетрагидрохлорзолотой кислоты, чем при pH 2.0. При pH 2.0 наиболее доступные ионы металла вовлекаются, по-видимому, в меньшее число событий нуклеации, что приводит к агломерации металла [52]. Напротив, с использованием экстрактов плодов груши показано, что гексагональные и треугольные нанопластины золота образуются при щелочных значениях pH, тогда как при кислых pH наночастицы не формируются [50]. Так, в случае ионов серебра (1+) и порошка клубней *Curcuma longa* (куркума длинная) существенно больше наночастиц серебра синтезируются при щелочных pH, при которых экстракты могут содержать больше отрицательно заряженных функциональных групп, способных эффективно связывать и восстанавливать ионы серебра [52].

Другой важный фактор, влияющий на формирование наночастиц в экстрактах растений, это температура [53–57]. В целом повышение температуры способствует увеличению скорости реакции и эффективности синтеза наночастиц. Так установлено, что в растениях люцерны (*M. sativa*) треугольные серебряные наночастицы образуются только при температуре выше 30°C [54]. Более того, эксперименты по синтезу наночастиц серебра в экстрактах *Lemon verbena* (вербена лимонная) показали, что повышение температуры реакции сопровождается ростом эффективности восстановления ионов серебра [56]. Причем при высоких температурах кристаллические частицы образуются значительно чаще, чем при комнатной температуре. Предполагается, что температура способствует увеличению частоты нуклеации. В опытах на экстрактах растения *Cassia fistula* (кассия трубчатая) обнаружили, что температура может влиять и на структурную форму синтезируемых наночастиц: при комнатной температуре форми-

руются в основном серебряные наноленты, тогда как при температуре выше 60°C основную массу составляют сферические наночастицы [55]. В этом случае считается, что более высокие температуры могут изменять взаимодействие фитореагентов с поверхностью наночастиц, ингибируя тем самым включение соседних наночастиц в структуру нанолента. Кроме того, более высокие температуры в некоторых ситуациях могут способствовать процессу нуклеации в ущерб процессу вторичного восстановления и дальнейшей конденсации металла на поверхности формирующихся наночастиц. Такое явление, как полагают, объясняет формирование сферических наночастиц золота при 80°C в спиртовых экстрактах *Nyctanthes arbor-tristis* (ночной жасмин), в отличие от наночастиц различной морфологии и «наноцветов», образующихся при комнатной температуре [57].

В связи с ограниченной возможностью растений восстанавливать ионы металлов эффективность синтеза металлических наночастиц также зависит от электрохимического потенциала иона [35]. Так, способность растительного экстракта эффективно восстанавливать ионы металла может быть существенно выше в случае ионов с большим положительным электрохимическим потенциалом (к примеру, Ag^+), чем в случае ионов с низким электрохимическим потенциалом, таких, как $[Ag(S_2O_3)_2]^{3-}$ [35].

Выше обсуждалось, что белки, входящие в состав растительного экстракта, могут значительно влиять на образование наночастиц. В последнее время для «зеленого» синтеза наночастиц металлов применяются подходы, сочетающие использование экстрактов растений с добавлением биоматриц – пептидов и белков, аминокислотная последовательность и структура которых оптимизированы для эффективной продукции наночастиц. Для поиска пептидов с соответствующими характеристиками используется метод фаговых дисплеев. Наилучшей способностью восстанавливать ионы металла обладают триптофан и такие аминокислоты, как тирозин, аргинин и лизин. Однако вследствие саморегуляции полипептид из одних остатков триптофана значительно менее эффективен, чем просто смесь молекул триптофана. В свою очередь пептиды, состоящие из различных аминокислот (к примеру, RWRWRWRWR), способных сильно связывать ионы, также плохо подходят в качестве биоматрицы для синтеза наночастиц вследствие возникающего энтропийного эффекта. Пептиды, в состав которых входят аминокислоты, слабо связывающие ионы тетрахлорзолотой кислоты, такие, как глутаминовая или аспарагиновая кислоты, тоже неэффективны при синтезе наночастиц по причине быстрой диссоциации комплекса пептид–ион металла. Таким образом, для формирования метал-

лических наночастиц наиболее подходят пептиды, в которых восстанавливающие и сильно связывающие аминокислотные остатки (к примеру, триптофан) чередуются со слабо связывающими аминокислотами, которые выполняют роль ап-регулятора. Следующий важный этап формирования металлических наночастиц – агрегация атомов восстановленного металла в наночастицы. Этот процесс зависит от многих факторов и определяет целый ряд свойств образующейся наночастицы, например ее размер или форму. В начале процесса на поверхности пептидной биоматрицы образуются небольшие частицы восстановленного металла, которые в дальнейшем при остальдовском созревании (переконденсации) перераспределяются в более крупные наночастицы. Показано, что чем быстрее и эффективнее идет формирование наночастиц, тем более изотропные и мелкие наночастицы получаются, поскольку эффективность переконденсации зависит от времени. Например, изменяя аминокислотную последовательность и тем самым кинетику реакции формирования наночастиц, удавалось варьировать форму и размер получаемых наночастиц.

Выявленные закономерности верны и для высокомолекулярных биоматриц, таких, как вирусы и вирусоподобные частицы. В одном из первых исследований, выполненных с использованием этого подхода, РНК-содержащий вирус растений со спиральной симметрией (вирус табачной мозаики (ВТМ) длиной 300 нм и шириной 18 нм) или икосаэдрические частицы неинфекционного вируса папилломы крупного рогатого скота (частицы диаметром 55 нм, полученные самосборкой белка оболочки вируса, экспрессированного в растениях) добавляли к солям золота или серебра перед внесением экстрактов *N. benthamiana* или ячменя [58]. В присутствии вирусов/вирусоподобных частиц в низких концентрациях наблюдали уменьшение размера наночастиц при 4–5-кратном увеличении их количества по сравнению с образцами, не содержащими вирус (рис. 4Б,В) [58]. Интересно, что при высокой концентрации ВТМ количество образовавшихся наночастиц было значительно меньше, однако вирусные частицы были металлизированными (рис. 5). На внутренней и внешней поверхностях ВТМ и внешней поверхности частиц вируса папилломы крупного рогатого скота экспонированы боковые цепи аминокислот, способные хелатировать и восстанавливать ионы металлов. Например, на внешней поверхности ВТМ в составе экспонированных пептидных участков поверхностной петли и С-концевого района доступны карбоксильные и гидроксильные группы, в то время как во внутреннем канале ВТМ доступны аминокислотные группы [59]. На поверхности частиц вируса папилломы крупного рогатого

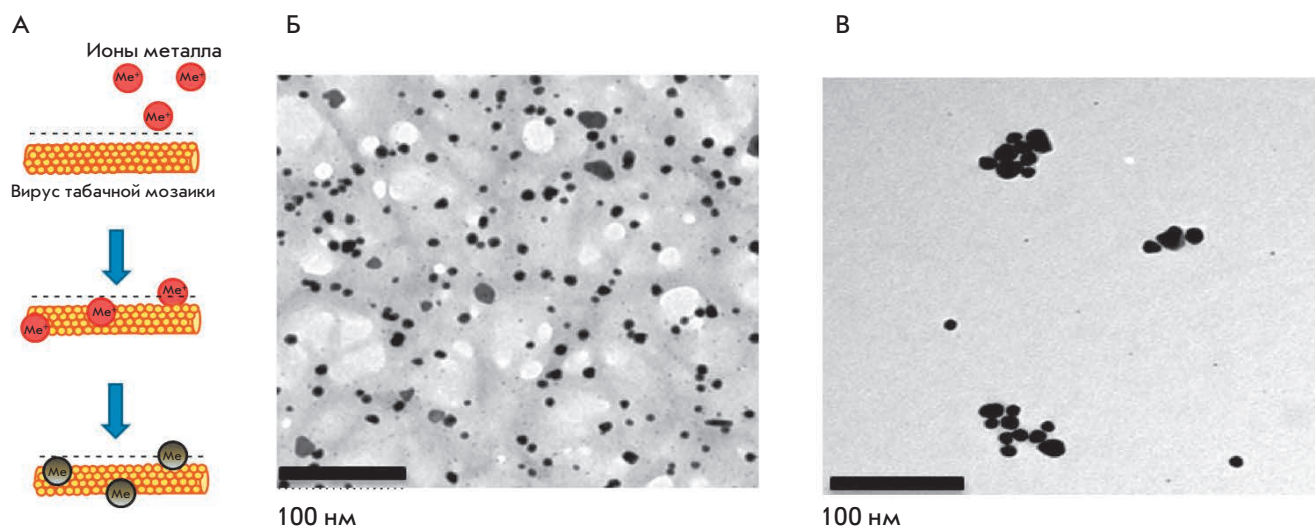


Рис. 4. Образование наночастиц в растительных экстрактах с использованием биоматриц. А – схема формирования наночастиц с участием вируса табачной мозаики как биоматрицы. Ионы металла, связываясь с отрицательно заряженными группами на поверхности вириона, восстанавливаются при добавлении растительного экстракта. При этом регулярное расположение данных активных групп значительно повышает число эффективных актов инициации формирования металлических наночастиц, что приводит к увеличению суммарного выхода в 3–5 раз. Б, Б' – электронные микрофотографии золотых наночастиц, образованных в растительном экстракте в присутствии (Б) и в отсутствие (Б') вируса табачной мозаики

скота доступны карбонильные, гидроксильные и карбоксильные группы [58]. Другой важный фактор, позволяющий рассматривать вирусы и вирусоподобные частицы как эффективные биоматрицы для синтеза наночастиц, – взаимная пространственная ориентированность активных пептидных групп, обусловленная регулярностью структуры этих биоматриц. Это может приводить к существенному ускорению реакции синтеза и, как следствие, к повышению выхода наночастиц. Поверхность вирусной частицы представляет собой плотные кассеты соответствующим образом упакованных белков оболочки (одна частица ВТМ состоит из 2130 молекул белка оболочки, а частица вируса папилломы крупного рогатого скота – из 360 молекул белка оболочки), представляющих собой высокореактивную, квазирегулярную поверхность, которая может взаимодействовать с ионами металлов. Считается, что при низких концентрациях вируса в реакционной смеси ионы металла взаимодействуют с аминокислотными остатками в молекулах белка оболочки вируса, инициируя процесс нуклеации. При добавлении растительного экстракта преформированные центры нуклеации подвергаются значительно более быстрому процессу восстановления. Вполне возможно, что присутствие вируса в реакционной смеси ингибирует агрегацию путем увеличения числа центров нуклеации, что снижает вероятность включения большего числа ионов ме-

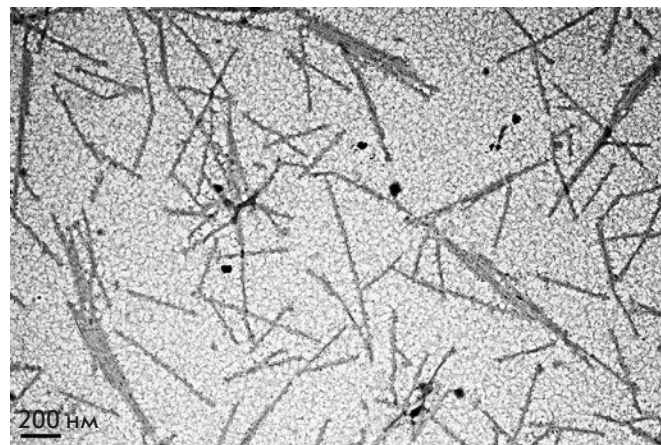


Рис. 5. Микрофотография металлизированного вируса табачной мозаики, полученная методом трансмиссионной электронной микроскопии

талла в меньшее число центров. При более высоких концентрациях вируса увеличение числа кластеризованных активных групп в составе аминокислотных остатков способствует, по-видимому, увеличению процессов связывания и восстановления ионов металла в непосредственной близости от поверхности вируса, что приводит к уменьшению формирования

свободных центров нуклеации и к подавлению образования металлических наночастиц вне вирусных кластеров («свободные» наночастицы). Последующее добавление растительных экстрактов быстро восстанавливает ионы металлов, хелатированные вирусными частицами, приводя к металлизации вирусных частиц (например, к образованию нанопроволок в случае ВТМ), но формирование «свободных» наночастиц уменьшается.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ В РАСТЕНИЯХ

Разнообразие растительных экстрактов, типов солей металлов и способность варьировать состав реакционной смеси и условия проведения реакции путем изменения температуры, pH реакционной смеси и включения добавок биологического происхождения (биоматриц) позволяют создавать наночастицы различных металлов определенного размера и формы. Несмотря на то что «зеленый» синтез наночастиц с использованием растительного материала вызывает значительный интерес, необходимо изучить эквивалентность этих наночастиц и наночастиц, полученных с помощью физических и химических методов, а также аспекты применения и потенциальные масштабы производства наночастиц. Например, хорошо известно, что традиционные, полученные физико-химическими способами, наночастицы металла могут быть использованы и уже используются в терапии онкологических заболеваний, в качестве антисептических средств, в направленной доставке лекарств, молекулярной визуализации, очистке сточных вод, катализе, создании биосенсоров, топливных элементов, покрытий и косметических средств. Наночастицы, полученные в растениях/растительных экстрактах, протестированы до сих пор только в небольшом количестве практических приложений. Например, наночастицы серебра, полученные с использованием экстракта *Tridax procumbens* (тридакс), как и их эквиваленты, полученные химическими или физическими методами, обладают сильной антимикробной активностью в отношении *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* и *Vibrio cholera* [60]. Наночастицы серебра, полученные с использованием экстрактов шишек *Pinus thunbergii* (сосна Тунберга), проявляли антибактериальное действие в отношении различных грамположительных и грамотрицательных сельскохозяйственных патогенов, таких, как *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas oryzae*, *Burkholderia glumae* и *Bacillus thuringiensis* [61]. Наночастицы серебра, синтезированные в растениях, обладают значительной цитотоксической активностью в отношении различных линий опухолевых клеток. Обнаружено, что синтезированные в *Iresine herbstii* (ирезина Херб-

ста) наночастицы серебра ингибируют выживание и рост клеточных линий HeLa, а серебряные наночастицы, полученные с использованием экстрактов латекса *Euphorbia nivulia* (молочай), токсичны для линии клеток A549 рака легкого человека [62]. Наночастицы серебра, синтезированные в *Nerium oleander* (олеандр обыкновенный), обладали сильным ларвицидным действием против личинок переносчика малярии *Anopheles stephensi* [63].

В перспективе предполагается функционализация этих частиц антителами или пептидами для направленного действия в определенных тканях организма с целью достижения большей эффективности и уменьшения побочных эффектов. Недавно экстракты *Cyamopsis tetragonoloba* (гороховое дерево) были использованы для производства композитных наночастиц серебра, которые могут действовать в качестве биосенсора для определения аммиака, с возможностью применения в сельском хозяйстве и биомедицине. В зависимости от концентрации аммиака расстояние между наночастицами внутри нанокompозита изменяется, что влияет на его оптические свойства [64]. Показано, что наночастицы платины, полученные с использованием экстрактов *Ocimum sanctum* (базилик священный), обладают каталитической активностью и могут использоваться при производстве водородных топливных элементов [65]. Каталитическую активность приписывают также наночастицам золота, полученным в *Sesbania drummondii* (сесбания), которые могут участвовать в восстановлении ароматических нитросоединений, например, превращать крайне токсичный 4-нитрофенол в 2-амино-фенол, что предполагает их возможное участие в дезактивации отходов.

Приведенные примеры не исчерпывают всех данных о применении «зеленых» наночастиц, однако являются весомым свидетельством возможности практического использования наночастиц, синтезированных с участием растений/растительных экстрактов. Основной вопрос, на который будет необходимо ответить – отличаются ли биологические и физико-химические характеристики наночастиц растительного «происхождения» от характеристик их существующих прототипов, и насколько эти отличия влияют на эффективность применения наночастиц для конкретных практических задач. Существенно, что наночастицы, синтезированные в экстрактах растений, уже обладают функционализированной поверхностью, которая может содержать (в зависимости от условий реакции) органические лиганды, белки, полисахариды и многоатомные спирты, отсутствующие в наночастицах, синтезированных с помощью физических и химических методов. Присутствие этих биологических компонентов спо-

способствует, как известно, повышению стабильности частиц, а также может облегчить в случае необходимости последующее присоединение к наночастицам функциональных молекул, таких, как антитела или ДНК [66].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Очевидно, что синтез металлических наночастиц в экстрактах растений (растительных биомассах), несмотря на определенные ограничения, обладает значительным потенциалом и рядом существенных преимуществ перед традиционными методами синтеза наночастиц. Однако, чтобы экономически эффективно конкурировать с наночастицами, полученными физическими и химическими методами, следует масштабировать методы производства наночастиц с использованием растительного материала и разработать схемы для снижения издержек при их синтезе. Непрерывные методы синтеза наночастиц до сих пор применялись только при небольших масштабах про-

изводства. При использовании химического синтеза себестоимость наночастиц определяется в основном стоимостью солей металлов и восстановителей. В случае «зеленого» синтеза основные затраты будут определяться только стоимостью солей металлов, поскольку восстановителями могут служить растительные отходы пищевой промышленности. Более того, можно рассчитывать, что компании, занятые в пищевом секторе промышленности и заинтересованные в утилизации этих отходов, могут частично оплатить производство наночастиц. Это обстоятельство дополнительно подчеркивает экологические преимущества использования «зеленого» синтеза перед традиционными методами производства наночастиц. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», мероприятие 1.5, соглашение № 14.U02.21.1235.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Roco M.C. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. V. 14. P. 337–346.
- Zhang L., Gu F.X., Chan J.M., Wang A.Z., Langer R.S., Farokhzad O.C. // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008. V. 83. P. 761–780.
- Daniel M.C., Astruc D. // *Chem. Rev.* 2004. V. 104. P. 293–346.
- Wong T.S., Schwaneberg U. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. V. 14. P. 590–596.
- Nanoparticles and nanostructured films: Preparation, characterization and applications / Ed. Fendler J.H. New York: John Wiley & Sons, 1998. 463 p.
- Tsuji M., Hashimoto M., Nishizawa Y., Tsuji T. // *Chem. Lett.* 2003. V. 32. P. 1114–1115.
- Kundu S., Maheshwari V., Saraf R. // *Nanotechnology.* 2008. V. 19. № 6. 065604.
- Okitsu K., Mizukoshi Y., Yamamoto T.A., Maeda Y., Nagata Y. // *Lett. Materials.* 2007. V. 61. P. 3429–3431.
- Narayanan K.B., Sakthivel N. // *Adv. Colloid. Interface. Sci.* 2010. V. 22. № 156. P. 1–13.
- Gan P.P., Ng S.H., Huang Y., Li S.F. // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 113. P. 132–135.
- Raveendran P., Fu J., Wallen S.L. // *Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 46. P. 13940–13941.
- Sharma H.S., Ali S.F., Hussain S.M., Schlager J.J., Sharma A. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2009. V. 9. № 8. P. 5055–5072.
- Narayanan S., Sathy B.N., Mony U., Koyakutty M., Nair S.V., Menon D. // *ACS. Appl. Mater. Interfaces.* 2012. V. 4. № 1. P. 251–260.
- Govindaraju K., Khaleel Basha S., Ganesh Kumar V., Singaravelu G. // *J. Materials Sci.* 2008. V. 43. P. 5115–5122.
- Scarano G., Morelli E. // *Biomaterials.* 2002. V. 15. № 2. P. 145–151.
- Scarano G., Morelli E. // *Plant Sci.* 2003. V. 165. P. 803–810.
- Lengke M.F., Fleet M.E., Southam G. // *Langmuir.* 2007. V. 23. № 5. P. 2694–2699.
- Kowshik M., Deshmukh N., Vogel W., Urban J., Kulkarni S.K., Paknikar K.M. // *Biotechnol. Bioeng.* 2002. V. 78. № 5. P. 583–588.
- Rautaray D., Ahmad A., Sastry M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 48. P. 14656–14657.
- Anshup A., Venkataraman J.S., Subramaniam C., Kumar R.R., Priya S., Kumar T.R., Omkumar R.V., John A., Pradeep T. // *Langmuir.* 2005. V. 21. № 25. P. 11562–11567.
- Njagi E.C., Huang H., Stafford L., Genuino H., Galindo H.M., Collins J.B., Hoag G.E., Suib S.L. // *Langmuir.* 2011. V. 27. № 1. P. 264–271.
- Harris A.T., Bali R. // *J. Nanoparticle Res.* 2008. V. 10. P. 691–695.
- Gardea-Torresdey J.L., Parsons J., Gomez E., Peralta-Videa J., Troiani H., Santiago P., Yacaman M. // *Nano Lett.* 2002. V. 2. P. 397–401.
- Manceau A., Nagy K.L., Marcus M.A., Lanson M., Geoffroy N., Jacquet T., Kirpichtchikova T. // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. № 5. P. 1766–1772.
- Ghosh S., Patil S., Ahire M., Kitture R., Gurav D.D., Jabgunde A.M., Kale S., Pardesi K., Shinde V., Bellare J. // *J. Nanobiotechnology.* 2012. V. 10. P. 17.
- Khan M., Adil S.F., Tahir M.N., Tremel W., Alkhatlan H.Z., Al-Warthan A., Siddiqui M.R. // *Int. J. Nanomedicine.* 2013. V. 8. P. 1507–1516.
- Rai M., Yadav A. // *IET Nanobiotechnol.* 2013. V. 7. № 3. P. 117–124.
- Shiv Shankar S., Ahmad A., Sastry M. // *Biotechnol. Prog.* 2003. V. 19. P. 1627–1631.
- Shiv Shankar S., Ahmad A., Pasricha R., Sastry M.J. // *Mater. Chem.* 2003. V. 13. P. 1822–1846.
- Shiv Shankar S., Rai A., Ahmad A., Sastry M. // *J. Colloid. Interface. Sci.* 2004. V. 275. P. 496–502.
- Maensiri S., Laokul P., Klinkaewnarong J., Prokha S., Promark V., Seraphin S. // *Optoelectronics Advanced Materials.* 2008. V. 2. P. 161–165.
- Vilchis-Nestor A.R., Sánchez-Mendieta V., Camacho-López M.A., Gómez-Espinosa R.M., Camacho-López M.A., Arenas-Alatorre J.A. // *Mater. Lett.* 2008. V. 62. P. 3103–3105.
- Song J.Y., Kwon E.Y., Kim B.S. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2010. V. 33. P. 159–164.

34. Song J.Y., Kim B.S. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2009. V. 32. № 1. P. 79–84.
35. Haverkamp R., Marshall A. // *J. Nanoparticle. Res.* 2009. V. 11. № 6. P. 1453–1464.
36. Singh A., Talat M., Singh D., Srivastava O.N. // *J. Nanoparticle Res.* 2010. V. 12. № 5. P. 1667–1675.
37. Ahmad N., Sharma S., Alam M.K., Singh V.N., Shamsi S.F., Mehta B.R., Fatma A. // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2010. V. 81. P. 81–86.
38. Kasthuri J., Veerapandian S., Rajendiran N. // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2009. V. 68. P. 55–60.
39. Panigrahi S., Kundu S., Ghosh S., Nath S., Pal T. // *J. Nanoparticle Res.* 2004. V. 6. № 4. P. 411–414.
40. Zayed M.F., Eisa W.H., Shabaka A.A. // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2012. V. 98. P. 423–428.
41. Gruen L.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1975. V. 386. P. 270–274.
42. Saikat Mandal P., Selvakannan R., Phadtare S., Renu P., Sastry M. // *J. Chem. Sci.* 2002. V. 114. P. 513–520.
43. Tan Y.N., Lee J.Y., Wang D.I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 16. P. 5677–5686.
44. Glusker J., Katz A., Bock C. // *Rigaku J.* 1999. V. 16. № 2. P. 8–16.
45. Si S., Mandal T.K. // *Chemistry.* 2007. V. 13. № 11. P. 3160–3168.
46. Kim J., Rheem Y., Yoo B., Chong Y., Bozhilov K.N., Kim D., Sadowsky M.J., Hur H.G., Myung N.V. // *Acta. Biomater.* 2010. V. 6. № 7. P. 2681–2689.
47. Selvakannan P., Mandal S., Phadtare S., Gole A., Pasricha R., Adyanthaya S.D., Sastry M. // *J. Colloid. Interface. Sci.* 2004. V. 269. № 1. P. 97–102.
48. Willett R.L., Baldwin K.W., West K.W., Pfeiffer L.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 22. P. 7817–7822.
49. Gan P.P., Li S.F. // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2012. V. 11. P. 169–206.
50. Ghodake G.S., Deshpande N.G., Lee Y.P., Jin E.S. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2010. V. 75. P. 584–589.
51. Armendariz V., Herrera I., Peralta-Videa J.R., Jose-Yacamán M., Troiani H., Santiago P., Gardea-Torresdey J.L. // *J. Nanopart. Res.* 2004. V. 6. № 4. P. 377–382.
52. Sathishkumar M., Sneha K., Yun Y.S. // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. № 20. P. 7958–7965.
53. Bankar A., Joshi B., Ravi Kumar A., Zinjarde S. // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2010. V. 80. P. 45–50.
54. Lukman A.I., Gong B., Marjo C.E., Roessner U., Harris A.T. // *J. Colloid. Interface. Sci.* 2010. V. 353. P. 433–444.
55. Lin L., Wang W., Huang J., Li Q., Sun D., Yang X., Wang H., He N., Wang Y. // *Chem. Eng. J.* 2010. V. 162. P. 852–858.
56. Cruz D., Falé P.L., Mourato A., Vaz P.D., Luisa Serralheiro M., Lino A.R.L. // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2010. V. 81. P. 67–73.
57. Das R.K., Gogoi N., Bora U. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2011. V. 34. № 5. P. 615–619.
58. Love A.J., Makarov V.V., Yaminsky I.V., Kalinina N.O., Taliansky M.E. // *Virology.* 2014. V. 449. P. 133–139.
59. Namba K., Pattanayek R., Stubbs G. // *J. Mol. Biol.* 1989. V. 208. P. 307–325.
60. Dhanalakshmi T., Rajendran S. // *Arch. Appl. Sci. Res.* 2012. V. 4. P. 1289–1293.
61. Velmurugan P., Lee S.M., Iydroose M., Lee K.J., Oh B.T. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 7. P. 361–368.
62. Valodkar M., Rathore P.S., Jadeja R.N., Thounaojam M., Devkar R.V., Thakore S. // *J. Hazard. Mater.* 2012. V. 201. P. 244–249.
63. Suganya A., Murugan K., Kovendan K., Mahesh Kumar P., Hwang J.S. // *Parasitol. Res.* 2013. V. 112. P. 1385–1397.
64. Pandey G., Madhuri S., Mandloi A.K. // *Pl. Arch.* 2012b. V. 12. P. 1–4.
65. Soundarrajan C., Sankari A., Dhandapani P., Maruthamuthu S., Ravichandran S., Sozhan G., Palaniswamy N. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2012. V. 35. P. 827–833.
66. Sintubin L., Verstraete W., Boon N. // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. V. 109. P. 2422–2436.