



СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАСТЕНИЙ

П.Горелкин, Н.Калинина, д.б.н., А.Лав, В.Макаров, к.б.н., М.Тальянский, д.б.н.,
И.Яминский, д.ф.-м.н. / sinitsyna@gmail.com

Использование наночастиц в биомедицине, науке о материалах и в электронике – одна из наиболее интенсивно развивающихся областей нанотехнологии [1]. Например, в биомедицине наноразмерные материалы активно используются для диагностики, переноса генов и доставки лекарств [2]. Особая роль принадлежит металлическим наночастицам, имеющим характерные свойства, сильно отличающие их от сыпучих материалов [3]. Наночастицы, как правило, синтезируются с использованием двух основных методов: нисходящего и восходящего [4]. Для синтеза металлических наночастиц используются различные физические и химические процессы, включая облучение материала ультрафиолетом, аэрозольные технологии, литографию, лазерную абляцию, ультразвуковые поля, фотохимическое восстановление. Однако эти методы дорогостоящие, в них часто используются ядовитые реагенты. В связи с этим особое внимание уделяется альтернативным, экологически безопасным и дешевым методам. К их числу относятся, в частности, “зеленая” химия и применение для получения наночастиц биологических процессов.

В ООО “НПП “Центр перспективных технологий” (ЦПТ) начат проект с использованием растений или экстрактов из них и биологически безопасных биоматриц на основе вирусоподобных (ВП) – частиц. Цель проекта – разработка экологически чистого синтеза металлических наночастиц с заданными свойствами для создания коммерческой технологии их получения. Предлагается подход на основе “зеленого” синтеза, альтернативный физико-химическим методам получения наночастиц, связывающий науку о материалах и биотехнологию. Эксперты отмечают, что главные преимущества биологических систем на основе растений для производства наночастиц – невысокая стоимость культивирования, малое время синтеза конечного продукта, биологическая безопасность процесса, возможность получения необходимого объема продукции без дополнительных затрат.

Настоящая работа ЦПТ базируется на исследованиях структуры, сборки, архитектуры, функций вирусных частиц, что является отправным моментом для развития новых подходов при синтезе

наночастиц с использованием растений как биореакторов. Этот подход в сравнении с промышленными химическими технологиями позволяет разработать относительно дешевый метод получения таких частиц и открывает новые горизонты в индустрии наноматериалов.

Основные решаемые задачи при проведении проекта:

- отбор растений на основе их естественного биоразнообразия для разработки эффективных методов синтеза наночастиц, сочетающих высокий выход и качество (размер, форма, состав и дисперсность) получаемых частиц;
- выявление новых “зеленых” методов “нуклеации наночастиц” для контроля их размера, формы и дисперсности, повышения эффективности их синтеза с использованием в качестве биоматриц вирусоподобных структур;
- разработка новых вариантов синтеза наночастиц в целых растениях, содержащих вирусоподобные частицы как биоматрицы;



- методы выделения наночастиц из экстрактов растений и их очистки.

СИНТЕЗ ЗОЛОТЫХ, СЕРЕБРЯНЫХ И ЖЕЛЕЗНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЭКСТРАКТАХ NICOTIANA BENTHAMIANA

Предложен и реализован метод получения таких частиц различной морфологии из солей соответствующих металлов с использованием как восстанавливающего агента экстракта растения *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*). Метод позволяет получать наночастицы размером от 10 до 400 нм сферической, трехгранной, пентагональной и гексагональной формы. При его реализации можно использовать:

- KAuH_4 – создание золотых частиц;
- AgNO_3 – получение серебряных частиц;
- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ или $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – создание железных/ферромагнитных частиц;
- различные разведения экстракта растения *N. benthamiana*.

Восстановление солей сопровождается изменением цвета раствора от желтого до фиолетового, темно – розового и зеленого в зависимости от используемых компонентов. Образование наночастиц фиксируется спектрофотометрически, а детальная картина визуализируется микроскопическими методами – атомно-силовой микроскопией (АСМ) (рис.1), просвечивающей электронной микроскопией



Рис.1. АСМ "ФемтоСкан" для визуализации образующихся наночастиц

(ПЭМ), сканирующей электронной микроскопией (СЭМ). Этот анализ применен для характеристики структуры и архитектуры наночастиц, включая их размер, форму и другие параметры.

ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕЗА ЗОЛОТЫХ, СЕРЕБРЯНЫХ И ЖЕЛЕЗНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЭКСТРАКТАХ N. BENTHAMIANA

Для получения высокого качества таких наночастиц следует использовать различные концентрации экстрактов растения (1/10 – 1/100 разведения)

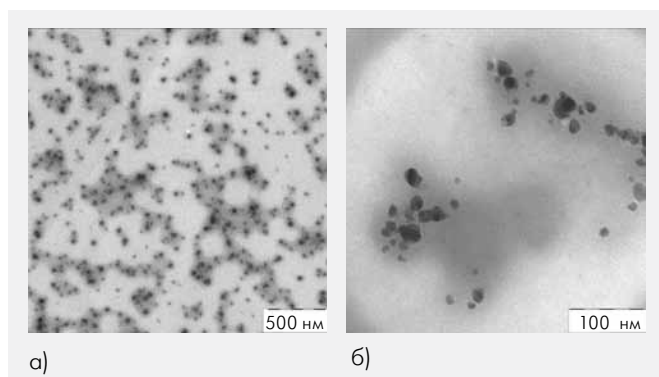


Рис.2. Железные частицы (а); серебряные частицы (ПЭМ-изображения наночастиц, синтезированных в экстрактах *N. benthamiana*) (б)

и солей (10^{-3} – 10^{-4} М). рН экстрактов, смешанных с солями, можно варьироваться с помощью HCl или NaOH . Реакции проводятся при 15–300°C и освещении 8000–15000 лк.

Наночастицы очищаются с использованием методов выделения вирусов растений, в частности, дифференциального центрифугирования. Очищенные наночастицы снова суспендируются в воде и исследуются спектрофотометрически, а также с использованием СЭМ (рис.2), АСМ (рис.3), динамического лазерного светорассеяния (ДЛС), позволяющего определить размеры частиц с помощью измерения электрокинетического потенциала и кругового дихроизма (обычного и магнитного – КД и МКД). Полученные результаты использованы для оценки выхода наночастиц, характеристики их размеров, формы и дисперсности. Они позволяют выбирать оптимальные условия для синтеза таких частиц с заданными свойствами. Тестируются экстракты различных растений для определения возможности их использования в качестве биореактора при синтезе металлических наночастиц.

Важно отметить, что для выбора оптимальных условий синтеза наночастиц может быть использовано биоразнообразие растений. В частности,

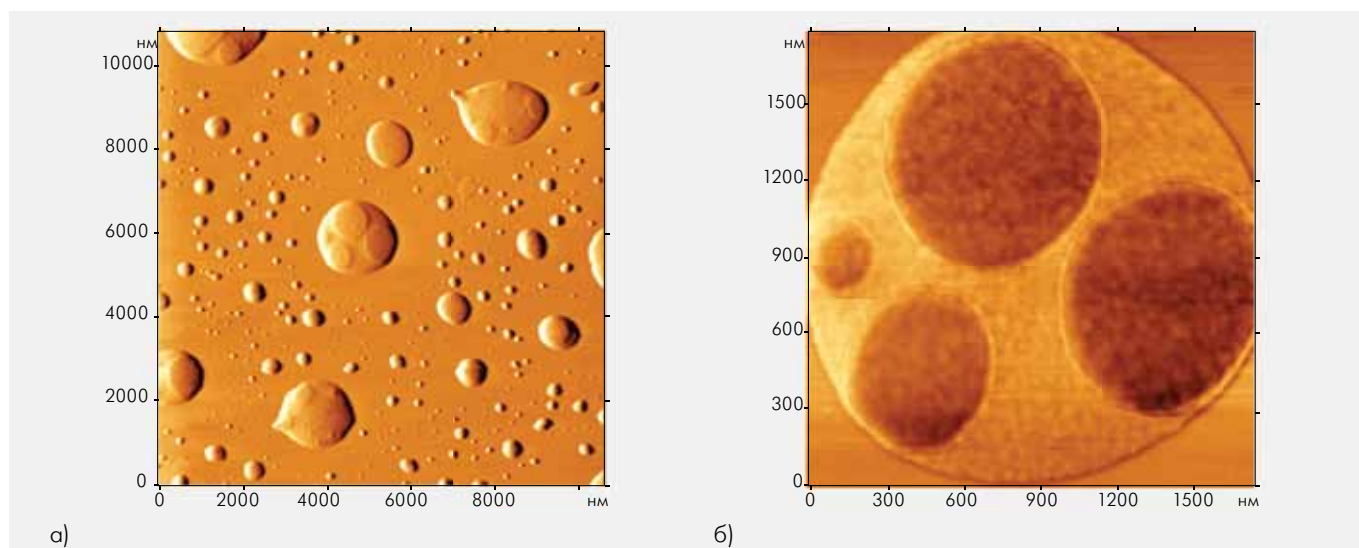


Рис.3. АСМ-изображение серебряных наночастиц, синтезированных в экстрактах *N.Benthamiana*, в органической матрице (а); фазовое изображение, на котором видны отдельные наночастицы в органической матрице (б)

для этих целей могут применяться экстракты растений, принадлежащих к различным таксономическим группам, включая Solanaceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae и однодольные семейства, такие как *N.benthamiana*, томаты, маслиничный рапс, *Chenopodium amaranticolor* и ячмень, соответственно.

“ЗЕЛЕННЫЕ” МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ С ОБЕСПЕЧЕНИЕМ КОНТРОЛЯ ИХ РАЗМЕРА, ФОРМЫ И ДИСПЕРСНОСТИ, ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИНТЕЗА

Планируется разработать матрицы палочковидной формы на основе вирионов (частиц) вируса табачной мозаики (ВТМ) с использованием для их деградации ультразвука.

Поскольку частицы ВТМ имеют несколько активных групп, экспонированных на поверхностях, подходящих для металлизации или функционализации при участии органических молекул, они могут быть использованы как биоматрицы для создания наночастиц. Предварительные эксперименты показали, что ВТМ могут значительно улучшать формирование золотых наночастиц. В связи с этим в экстрактах выбранных растений синтез наночастиц будет проведен в присутствии ВТМ. Принимая во внимание инфекционные свойства нативного ВТМ, целесообразнее использовать его частицы, подвергнутые деградации ультразвуком. Такие частицы палочковидной формы 18×300 нм выделяются из инфицированных ВТМ растений и подвергаются

для образования неинфекционных монодисперсных частиц обработке ультразвуком.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЭМ И АСМ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВТМ-И ВП-ЧАСТИЦ КАК МАТРИЦ БИОРЕАКТОРОВ

Образцы синтезированных в растениях разрушенных ультразвуком ВТМ- и ВП-частиц будут изучены и охарактеризованы СЭМ и АСМ (рис.4), динамическим лазерным светорассеянием (ДЛС), КД и МКД.

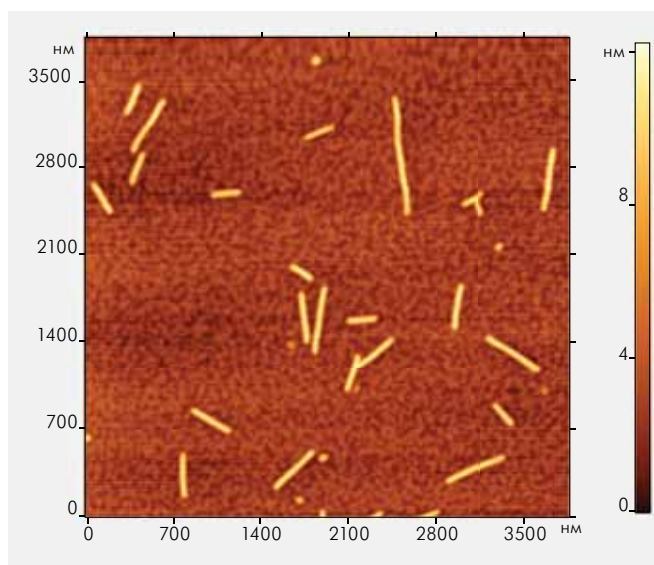


Рис.4. АСМ-изображение разрушенных ультразвуком частиц ВТМ



Чтобы изучить влияние фрагментов ВТМ- и ВП-частиц на образование наночастиц в растительных экстрактах, эти фрагменты будут добавляться в экстракты растений перед внесением солей: KAuH_4 – для золотых частиц, AgNO_3 – для серебряных частиц, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ или $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – для железных/ферромагнитных частиц. Это позволит разработать новые подходы для "зеленого" биосинтеза.

СИНТЕЗ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

Ниже приводятся некоторые примеры, демонстрирующие использование экстрактов растений для биосинтеза наночастиц. Быстрое восстановление ионов металла наблюдалось, когда раствор нитрата серебра контактировал с экстрактом листьев герани [5]. Биовосстановление ионов Ag^+ контролировалось при измерении УФ-спектров раствора. В случае экстракта из листьев *Neep* наблюдалось конкурентное восстановление ионов золота при одновременном нахождении их в растворе с серебром. Этот процесс сопровождался возникновением биметаллических частиц, у которых центральная часть состоит из Au, а оболочка – из Ag [6].

Серебряные трехгранные частицы размером от 55 до 80 нм или сферические золотые наночастицы были созданы с использованием высушенной на солнце биомассы листьев *Cinnamthum camphora* [7]. Для получения золотых нанотрехгранников и сферических наночастиц была применена простая процедура использования экстракта листьев *Aloe vera* [8]. Наблюдение велось с помощью адсорбционной УФ-спектроскопии и ТЭМ. Влияние концентрации экстракта на синтез золотых нанотрехгранников изучалось при анализе образующегося продукта. Добавление экстракта *Aloe vera* к 10^{-3} М водного раствора HAuCl_4 приводило после 5 ч реакции к покраснению раствора. Анализ количества образовавшихся в реакционной среде трехгранников, как функции различной концентрации использованного экстракта, показал, что при увеличении количества добавленного экстракта начинает образовываться больше частиц сферической формы.

Биосинтез серебряных наночастиц наблюдался в экстрактах листьев *Cuscas* [9], богатого флавоноидами растения семейства *Cusadaceos*. Раствор экстракта обрабатывался 0,25 М раствором AgNO_3 и нагревался в проточной бане в течение 20 мин до изменения его цвета на



Использование различных сортов чая и кофе для синтеза наночастиц золота [13]

Сорт	Форма	Размер, нм
Кофе "Санка"	Многогранная	100
Чай "Бигелу"	Сферическая	20
Чай "Луизиана"	Сферическая	100
Кофе "Старбакс"	Сферическая	10
Кофе "Фолджер"	Сферическая	10
Чай "Липтон"	Сферическая	20–30

коричневый. Размер получаемых наночастиц составлял от 2 до 6 нм.

Эти примеры свидетельствуют, что растительные экстракты в состоянии превратить ионы металлов в наночастицы. Более того, разнообразие растений, обуславливающее значительные различия в составе экстрактов, может представить дополнительные возможности для получения различных наночастиц, различающихся размерами, формой, составом поверхности и прочими характеристиками [10]. Более того, биотехнология, позволяя проводить молекулярное клонирование и генетическую инженерию генов, кодирующих специфические ферменты или компоненты, участвующие в биовосстановлении ионов металлов, могут быть использованы для оптимизации синтеза наноматериалов [11].

Простота и эффективность такого метода создания наночастиц различных металлов вызвало рост патентов в этой области. Так, например, в [12] описано создание наночастиц различных металлов (железа, платины, палладия, серебра, золота, индия и др.), а также их композитов с помощью экстрактов фруктов. В примерах демонстрируется использование в качестве биореакторов красных и белых вин, выжимки винограда. Тот же самый коллектив ученых представил расширенное изобретение [13]. В качестве восстанавливающего агента используются полифенол, кофеин, экстракты разных сортов чая и лимонного дерева, каротиноиды, другие вещества. В частности, для производства наночастиц золота применялись популярные сорта чая и кофе. Как показано в таблице, эти сорта влияют на размер и форму наночастиц.

Вместе с тем растительные системы не обеспечивают специфические методы контроля размеров, формы и дисперсности синтезируемых наночастиц. В связи с этим для контроля синтеза наночастиц с заданными параметрами должны быть разработаны дополнительные подходы. Для получения коммерчески доступной продукции необходимо также увеличить выход синтезируемых наночастиц. Наконец, важно разработать специфические методы выделения наночастиц из растительных экстрактов и их очистки.

ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ НУКЛЕАЦИИ НАНОЧАСТИЦ

Вирусы растений недавно привлекли внимание исследователей как потенциальные биоматрицы для производства металлизированных структур из металлических наночастиц [14, 15]. В соответствии с размерами, вирусы могут рассматриваться как органические наночастицы и представляются идеальными компонентами для нуклеации наноматериалов. Были использованы вирус мозаики коровьего горошка (ВМКГ), вирус мозаики костра (ВМК), Х-вирус картофеля (ХВК), вирус табачной мозаики (ВТМ). Их вирионы декорировались по внешней и внутренней поверхностям различными металлическими наночастицами. Полученные результаты продемонстрировали, что такие комбинированные наночастицы – привлекательные строительные блоки по нескольким причинам: частицы монодисперсные и могут быть легко получены в теплице, обладают высокой стабильностью и биосовместимостью. В связи с тем, что вирионы ВТМ имеют несколько экспонированных поверхностей, подходящих для металлизации [16] или функционализации органическими молекулами [17], они использовались как перспективные биоматрицы для создания наноматериалов [18]. Благодаря физической и химической стабильности эти вирионы – привлекательные инструменты для создания плоских однослойных неорганических наноструктур [19, 20]. Вирионы, выделенные из растений, использовались для изготовления нанопроводов посредством избирательной металлизации их внешней поверхности или внутреннего канала [21]. На основе биоматриц ВТМ также были созданы функциональные электронные устройства [22, 23] и ферромагнитные жидкости [24]. Важно отметить, что для подобного применения с использованием генно-инженерных методов желательна модифицировать частицы ВТМ по длине и по наличию на поверхности активных групп.

В России вирусоподобные частицы также используются для сборки наноструктур *in vitro*. В частности



развивается подход, основанный на использовании сферических частиц, получаемых при термическом ремоделировании нативных вирионов ВТМ. Показано, что такие частицы можно декорировать различными химическими субстанциями, включая металлические наночастицы [25, 26].

Эти данные свидетельствуют о большом потенциале вирусоподобных структур как матриц для формирования металлизированных наночастиц. Однако ни один из ранее разработанных подходов не предполагает использования таких структур как матриц для образования наночастиц в процессе их синтеза. В связи с этим предлагаемый подход имеет значительные преимущества, основанные на использовании биоматриц при синтезе наночастиц, и предполагает строгий контроль их формы, размера и дисперсности. Более того, кроме полученных в растениях вирусоподобных наночастиц возможно использование любых других типов подобных частиц, что открывает новые возможности для формирования наночастиц и значительно расширяет их набор. Важным фактором, который следует иметь в виду при выборе вирусоподобных частиц в качестве матриц – их биобезопасность (отсутствие в составе инфекционного материала – ДНК или РНК). В качестве модельной системы предполагается использование неинфекционных вирусоподобных частиц не содержащей ДНК бычьей папилломы [27].

ОЧИСТКА И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

Важный фактор для развития коммерчески доступного метода – разработка и апробация надежных вариантов выделения и фракционирования с хорошим выходом высоко очищенных наночастиц. Хотя методы очистки таких частиц в химических и физико-химических процессах, базирующихся главным образом на центрифугировании и хроматографии, уже разработаны, о специальных приемах для выделения наночастиц из растительных экстрактов не сообщалось, что требует дополнительного исследования. В связи с этим необходимо дальнейшее развитие методов центрифугирования и хроматографии.

Авторы искренне благодарны А.Ерофееву, С.Макаровой, О.Синицыной за конструктивное обсуждение проекта и полученных результатов, а также Министерству образования и науки Российской Федерации (Соглашения № 14.У02.21.1235) за предоставление гранта для выполнения исследований по этому перспективному направлению.

Литература

1. **Roco MC.** Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. – *Curr Opin Biotechnol*, 2003 Jun, v.14(3), p.337–46.
2. **Zheng et al.** *Clin Pharmacol Ther*, 2008, v.83, p.761–780.
3. **Daniel M.C., Astruc D.** Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. – *Chem. Rev.*, 2004, v. 104, p. 293–346.
4. Nanoparticles and nanostructured films: Preparation, characterization and applications. Ed. Fendler JH. John Wiley & Son, 1998.
5. **Shiv Shankar S., Ahmad A., Sastry M.** Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. – *Biotechno. Prog.*, 2003, v. 19, p.1627–1631.
6. **Shiv Shankar S., Rai A., Ahmad A., Sastry M.** Rapid synthesis of Au, Ag and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. – *J. Colloid Inter. Sci.*, 2004, v. 275, p.496–502.
7. **Huang J., Li Q., Sun D., Lu Y., Su Y., Yang X., Wanh H., Wang Y., Shao W., He N., Hong J., Chen C.** Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum canphora* leaf. – *Nanotechnology*, 2007, v. 18, p.1–11.
8. **Chandra P.S., Chaudhary M., Pasricha R., Ahmad A., Sastry M.** Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. – *Biotechnology Prog.*, 2006, v.22, p.577–583.
9. **Anal K., Jha K.A., Prasad K., Kumar V., Prasad K.** Biosynthesis of silver nanoparticles using *Eclipta* leaf. – *Biotechnology Progress*, 2009, v.25, p.1476–1479.
10. **Sadowski S.** Biosynthesis and application of silver and gold nanoparticles. In *Silver nanoparticles*. Ed. D.P. Perez. InTech., 2010, p.258–276.
11. **Narayanan KB., Sakthivel N.** Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. – *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011, v.169, p.59–79.
12. Patent US 20110110723 A1, 2011, класс B09C 1/08, Green Synthesis of Nanometals Using Fruit Extracts and Use Thereof.
13. Patent US 2012/0055873 A1, 2012, класс G22C 38/00, Green Synthesis of Nanometals Using Plants Extracts and Use Thereof.
14. **Kadri A., Maiss E., Amsharov N., Bittner A.M., Balci S., Kern K., Jeske H., Wege C.** Engineered Tobacco mosaic virus mutants with distinct physical characteristics in planta and enhanced metallization properties. – *Virus Research*, 2011, v.157, p.35–46.



15. **Aljabali A.A., Barclay J.E., Lomonosoff G.P., Evans D.J.** Virus templated metallic nanoparticles. – *Nanoscale*, 2010, v.2, p.2596–2600.
16. **Balci S., Hahn K., Kopold P., Kadri A., Wege C., Kern K., Bittner A.M.** Electroless synthesis of 3 nm wide alloy nanowires inside Tobacco mosaic virus. – *Nanotechnology*, 2012, v.23, p.045603.
17. **Endo M., Wang H.X., Fujitsuka M., Majima T.** Pyrene stacked nanostructures constructed in the recombinant tobacco mosaic virus rod scaffold. – *Chemistry*, 2006, v.12, p.3735–3740.
18. **Lee S.Y., Lim J.S., Harris M.T.** Synthesis and application of virus-based hybrid nanomaterials. – *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, v.109, p.16–30.
19. **Bittner A.M.** Biomolecular rods and tubes in nanotechnology. – *Naturwissenschaften*, 2005, v.92, p.51–64.
20. **Dujardin E., Peet C., Stubbs G., Culver J.N., Mann S.** Organization of metallic nanoparticles using tobacco mosaic virus templates. – *Nano Lett.*, 2003, v.3, p.413–417.
21. **Knez M., Sumser M., Bittner A.M., Wege C., Jeske H., Martin T.P., Kern K.** Spatially selective nucleation of metal clusters on the tobacco mosaic virus. – *Adv. Funct. Mater.*, 2004, v.14, p.116–124.
22. **Atanasova P., Rothenstein D., Schneider J.J., Hoffmann R.C., Dilfer S., Eiben S., Wege C., Jeske H., Bill J.** Virus-templated synthesis of ZnO nanostructures and formation of field-effect transistors. – *Adv. Mater.*, 2011, v.23, p.4918–4922.
23. **Chen X.L., Gerasopoulos K., Guo J.C., Brown A., Ghodssi R., Culver J.N., Wang C.S.** High rate performance of virus enabled 3D n-type Si anodes for lithium-ion batteries. – *Electrochim. Acta*, 2011, v.56, p.5210–5213.
24. **Wu Z., Mueller A., Degenhard S., Ruff S.E., Geiger F., Bittner A.M., Wege C., Krill C.E.** Enhancing the magnetoviscosity of ferrofluids by the addition of biological nanotubes. – *ACS Nano*, 2010, v.4, p.4531–4538.
25. **Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O.** Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles. – *J Gen Virol.*, 2011, v.92, p.453–456.
26. **Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J.** Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens. – *J Gen Virol.*, 2012, v.93, p.400–407.
27. **Love A.J., Chapman S.N., Matic S., Noris E., Lomonosoff G.P., Taliansky M.** In planta production of a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1. *Planta.*, 2012, In press.