



УДК 577:152.1+544.77

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ОКСИДОРЕДУКТАЗ НА НАНОЧАСТИНКАХ ЗОЛОТА І СРІБЛА

**М. М. Синенька¹, Н. Є. Стасюк¹, Т. В. Семашко²,
Г. З. Гайда¹, Р. В. Михайлова², М. В. Гончар^{1,3}**

¹Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна
e-mail: galina.gayda@gmail.com

²Інститут мікробіології НАН Білорусі, вул. Купрєвича, 2, Мінськ 220141, Білорусь

³Інститут прикладної біотехнології та фундаментальних наук,
вул. Соколовська, 26, Кольбушова 36–100, Польща

За допомогою хімічних методів синтезовано наночастинки срібла та золота. Наночастинки срібла одержано відновленням нітрату аргентуму глюкозою, а наночастинки золота – відновленням гідрогентетрахлороаурумату тринатрій цитратом або натрій боргідридом. Запропоновано нові методи функціоналізації поверхні одержаних наночастинок. Активовані наночастинки золота і срібла, синтезовані цитратним методом, обробляли 16-меркаптогексадекановою кислотою, а наночастинки золота, одержані боргідридним методом, функціоналізували цистеаміном. Іммобілізацією пероксидази хрону та глюкозооксидази *Penicillium adametzii* на активованих наночастинках золота і срібла одержано нові біонаноматеріали. Методами сканувальної електронної мікроскопії та спектрофотометричного аналізу доведено нанорозмірність синтезованих наночастинок золота і срібла, а також нанотрубок золота, кон'югованих із ферментами. Дослідження каталітичних властивостей ферментів, іммобілізованих на наноносіях, засвідчило, що наночастинки золота є найефективнішими для зв'язування пероксидази хрону, тоді як наночастинки срібла є оптимальними носіями для зв'язування глюкозооксидази.

Ключові слова: наночастинки золота і срібла, пероксидаза, глюкозооксидаза, іммобілізація на наночастинках.

ВСТУП

Нанотехнологіями називають сукупність прийомів і методів, що застосовуються при створенні, вивченні, виробництві наноматеріалів (НМ) – структур, функціональні властивості яких визначаються впорядкованими компонентами розміром до 100 нм.

Наночастинки (НЧ) металів отримують різними фізико-хімічними методами, зокрема електрохімічним відновленням, УФ та флюоресцентним опроміненням і криохімічним синтезом [9, 10, 12, 21, 25]. Хімічний синтез наночастинки золота (Au-НЧ) здійснюють відновленням гідрогентетрахлороаурумату L-триптофану [10],

тринатрій цитрату [13], натрій боргідриду [2] та ін. Наночастинки срібла (Ag-НЧ) зазвичай одержують методом відновлення аргентум нітрату етиленгліколем [17] або глюкозою [14]. Проста процедура синтезу НМ і їхня спорідненість до багатьох біологічних молекул, у тому числі ферментів, робить їх привабливими для використання в сенсорних технологіях [9]. Синтезовані металеві НЧ стабілізують додатково поверхнево-активними речовинами для запобігання агрегації. Отримані НЧ придатні для подальшого використання в наномедицині та нанобіотехнології [26], у тому числі і для іммобілізації ферментів, рецепторів, антитіл [18, 24].

Альтернативою фізико-хімічним методам отримання НЧ є біологічні способи синтезу. Дослідниками проводиться активний пошук ефективних біооб'єктів для отримання НЧ різної хімічної природи. Є багато повідомлень про «зелений» синтез НЧ золота, срібла, селену, платини, кварцу та інших сполук бактеріями [16], актиноміцетами [15], грибами [7], дріжджами [20], вірусами [1] та в екстрактах рослин [12, 19]. Головна перевага біологічних систем для одержання НЧ – невисока вартість культивування, короткий час синтезу кінцевого продукту, біологічна безпека процесу, можливість отримання необхідного об'єму продукції без додаткових енергетичних і фінансових витрат.

Іммобілізовані на НЧ ферменти широко використовують як ефективні каталізатори, сенсорні системи, препарати з високою біологічною активністю у біотехнологічних процесах і сільському господарстві, медицині. Одним із методів модифікації та стабілізації ферментів є кон'югація з поверхнею НЧ за допомогою фізичної адсорбції або хімічного зв'язування [3, 5, 6, 8]. Суттєвим недоліком хімічного методу іммобілізації є ймовірність інактивації ферменту. Її можна запобігти, якщо проводити іммобілізацію за наявності субстрату, котрий захищає активний центр ферменту. Для ковалентного приєднання носій (НЧ) потрібно попередньо активувати. Активовані НЧ можуть реагувати з відповідними групами молекули ферменту: аміногрупами залишків лізину, а також функціональними групами залишків тирозину, гістидину, аргініну та цистеїну [4].

Нами успішно проведені експерименти з іммобілізації ферментів на поверхні Au-НЧ і Ag-НЧ з аргіназою І печінки людини, виділеної із рекомбінантного штаму *Hansenula polymorpha* [22,23].

Мета цієї роботи – дослідити способи кон'югації наноносіїв із ферментами – пероксидазою хрону (ПО) та глюкозооксидозою (ГО) *Penicillium adametzii* і дослідити одержані біонаноматеріали на предмет їх перспективності в сенсорних технологіях. Використання електропровідних НЧ благородних металів для реалізації прямого електронного переносу в ході каталітичного окислення молекули глюкози призведе до підвищення чутливості, селективності та швидкодії біосенсорів на глюкозу.

Для досягнення мети необхідно було виконати завдання: 1) синтезувати, активувати й охарактеризувати наноносії на основі благородних металів; 2) вивчити придатність різних методів біофункціоналізації наночастинок срібла і золота ферментами ГО і ПО; 2) дослідити структурні характеристики отриманих біонаноматеріалів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Ферменти: глюкозооксидаза (ГО) отримана з міцеліального гриба *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 у лабораторії ферментів Інституту мікробіології НАН Білорусі, питома

активність ферменту – $20 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка; пероксидаза хрону (ПО, RZ 3,5) – виробництва ТзОВ “Астер”, Львів, Україна.

Синтез і характеристика наноосіїв. Синтез наночастинок золота (Au-НЧ) здійснювали двома модифікованими методами: цитратним [13] і боргідридним [2, 13].

У першому випадку до 1,25 мл 1 мМ HAuCl_4 додавали 0,125 мл 38,8 мМ тринатрій цитрату із подальшим інтенсивним перемішуванням і струшуванням упродовж 15 хв, при температурі 100 °С на водяній бані, до отримання суміші темно-червоного кольору.

Під час використання боргідридного методу до 7,5 мл 10 мМ цетилтриметиламоній бромід (ЦТМБ) додавали 0,25 мл свіжоприготовленого водного 10 мМ розчину HAuCl_4 , інтенсивно перемішували, вносили 0,6 мл 10 мМ NaBH_4 та знову інтенсивно перемішували (2–3 хв). Отриманий колоїдний розчин залишали на 12 год при кімнатній температурі та спостерігали поступову зміну забарвлення від світло-коричневого до червоного. Концентрація одержаних НЧ у перерахунку на концентрацію золота становила 0,17 мМ [23]. Синтез наночастинок срібла (Ag-НЧ) здійснювали за модифікованим методом [17]. Змішували 50 мл 0,03 М D-глюкози і 0,2 мл 0,15 М AgNO_3 , поступово додавали краплями (0,5–1 мл) 0,05 М NaOH та перемішували упродовж 2–3 хв при кімнатній температурі.

Методи активації та біофункціоналізації наночастинок. Для активації поверхні Ag-НЧ та Au-НЧ, одержаних цитратним методом, НЧ промивали кілька разів дистильованою водою. Осаджені центрифугуванням НЧ (9700 г, упродовж 15 хв) суспендували в 0,1 мл 5 мМ розчину ω -меркаптогексадеканової кислоти й інкубували упродовж 24 год при +4 °С. Осад НЧ промивали диметилформамідом (ДМФА) та суспендували в 0,1 мл розчину, що містив 20 мМ 1-циклогексил-3-(2-морфоліноетил)-карбодіїмід гідрохлорид, 20 мМ пентафторфенол і 20 мМ *N, N*-діізопропілетиламін у ДМФА, та інкубували упродовж 30 хв при +25 °С. Активовані НЧ промивали ДМФА, осад суспендували в 0,1 мл 50 мМ Хепес буферу, рН 7,5 (ХБ) і зберігали при температурі +4 °С до використання.

Au-НЧ, отримані за допомогою боргідридного методу, осаджували центрифугуванням при 9 700 г упродовж 40 хв, промивали 4 рази 5 мМ ФБ, рН 7,5, знову осаджували та вносили 0,85 мМ водний розчин цистеаміну. Активовані Au-НЧ відмивали тричі у 5 мМ ФБ, рН 7,5, суспендували у 100 мкл 5 мМ ФБ, рН 7,5 та зберігали при температурі +4 °С до використання. Отримані такими способами НЧ застосовували для ковалентної та електростатичної іммобілізації ПО і ГО.

Для іммобілізації – як електростатичної, так і ковалентної, розчин активованих НЧ змішували із ферментами ГО і ПО до кінцевої концентрації білка 0,05 мг/мл та інкубували упродовж 12 год при температурі +4 °С.

Спектрофотометричні та мікроскопічні дослідження наночастинок. Розміри та структуру синтезованих НЧ досліджували різними методами: оптичним і скануючої електронної мікроскопії (СЕМ). Спектральні характеристики стабільності Au-НЧ (25 мМ) та Ag-НЧ (138 мМ) реєстрували на спектрофотометрі Shimadzu (UV-1650 PC), у діапазоні 250–700 нм. Загальну концентрацію утворених НЧ розраховували за градувальним графіком залежності оптичної густини від концентрації срібла та золота в колоїдному розчині, використовуючи експериментально визначені молярні коефіцієнти екстинкції для Ag-НЧ і Au-НЧ – $2,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ та $1,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, відповідно [22].

Експерименти із СЕМ виконували у Центрі низькотемпературних досліджень Львівського національного університету імені Івана Франка на растровому електронному мікроскопі-мікроаналізаторі РЕММА-102-02. Проби об'ємом 0,01 мл наносили на графітовий стержень (товщина – 0,5 см, діаметр – 0,5 см). Під час досліджень відстань від останньої лінзи мікроскопа до проби (WD) становила від 17,1 мм до 21,7 мм; прискорювальна напруга (kV) в діапазоні від 20 до 40 еВ; разове збільшення становило від 2 500 до 10 000.

Визначення активності ферментів. Активність визначали за використання хромогену – *o*-діанізидину. Реакційну суміш – хромоген із ферментом (ПО) або субстратом (глюкоза) – преінкубували протягом 5 хв при 30 °С на водяній бані. Реакцію запускали внесенням розчину субстрату (пероксид водню) або ферменту (ГО) та інкубували 5–10 хв, залежно від швидкості розвитку кольорової реакції. Реакцію зупиняли у точно фіксований час додаванням 0,8 мл концентрованої НСІ. Проби фотометрували при 525 нм ($\epsilon = 13,38 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) проти сліпої проби, яка містила 0,2 мл води замість ферменту. Реакційна суміш для визначення активності ПО складалась із 2,5 мл 0,3 мМ хромогену в 50 мМ ФБ, рН 7,5 та 0,2 мл досліджуваного розчину із ПО. Після преінкубації вносили 0,15 мл 20,6 мМ пероксиду водню. Реакційна суміш для визначення активності ГО складалась із 1 мл 0,17 мМ хромогену в воді, 0,2 мл розчину ПО (1 мг/мл) та 2,1 мл 0,05% розчину глюкози у 50 мМ ФБ рН, 6.5. Після преінкубації вносили 0,2 мл досліджуваного зразка із ГО.

Статистичний аналіз експериментальних даних. Досліди проводили трьома повторами. Для кожної вибірки показників визначали середнє арифметичне значення (M), стандартну похибку середнього (m) та середнє арифметичне відхилення (σ). Розрахунок статистичних показників і побудову графіків проводили за допомогою програми OriginPro 8,5. Вказані параметри та статистичні показники наведені у рисунках і таблицях.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Характеристика НЧ. У попередніх дослідженнях нами показано, що збереження профілю оптичних спектрів Ag-НЧ і Au-НЧ упродовж місяця при +8 °С свідчить про стабільність отриманих дисперсних систем.

У процесі формування НЧ спостерігається зміна кольорів: для наночастинок срібла – від світло-жовтого до оранжевого, а для наночастинок золота – від світло-рожевого до темно-вишневого. Ці зміни для Ag-НЧ та Au-НЧ узгоджуються з даними літератури [2, 13, 17].

Нанорозмірність наночастинок і нановолокон золота, одержаних боргідридним методом, підтверджено даними СЕМ (рис. 1).

Під час синтезу Au-НЧ боргідридним методом встановлено, що залежно від умов проведення реакції відбувається формування або сферичних НЧ (у разі інтенсивного струшування реакційної суміші), або нановолокон (НВ), які одержували в стаціонарному режимі інкубації реагентів. Дані СЕМ-зображення підтверджують нанорозмірність одержаних НЧ та НВ (за діаметром), середня довжина одного волокна становить близько 5–8 мкм. Під час синтезу Au-НЧ натрій боргідридним методом одержано нановолокна/нанотрубки діаметром 150–200 нм (рис. 1).

Кон'югація наночастинок із ПО. У табл. 1 представлено результати експериментів з іммобілізації ПО на поверхні Au-НВ електростатичним методом. Із наведе-

них даних видно, що вихід ферменту після процедури іммобілізації становить близько 9 %. Схему ковалентного зв'язування НЧ з ферментами і золотими НЧ (на прикладі ПО) наведено на рис. 3.

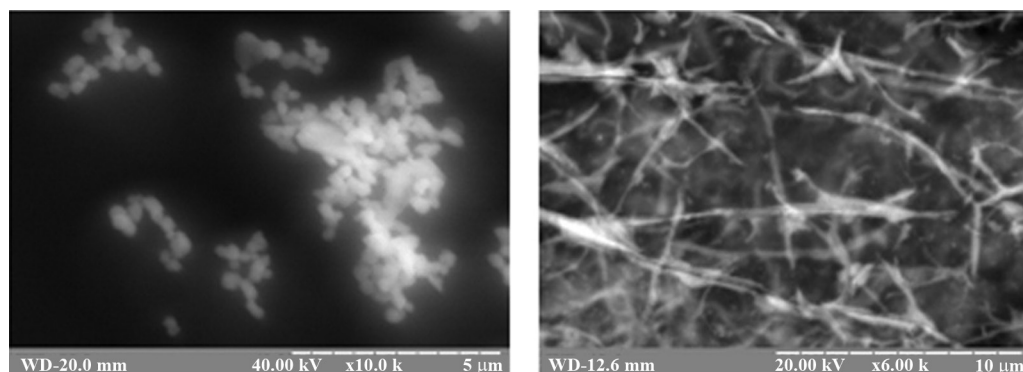


Рис. 1. SEM-зображення синтезованих наночастинок і нановолокон золота

Fig. 1. SEM images of the synthesized nanoparticles and nanoweb of gold

Таблиця 1. Іммобілізація пероксидази на поверхні нановолокон золота

Table 1. Immobilization of peroxidase on the surface of nanoweb of gold

Показники	Розчин пероксидази хрому до іммобілізації	Супернатант після іммобілізації	Пероксидаза хрому на наночастинках	Розчин пероксидази хрому до іммобілізації	Супернатант після іммобілізації	Іммобілізована пероксидаза хрому на нановолокнах
V, мл	0,050	0,080	0,20	0,050	0,080	0,20
A, од./мл	2785±13,1	589,4±3,34	133,3±2,40	2785±13,1	589,4±3,34	61,4±1,20
ΣA, од.	139,2±1,1	47,15±1,21	26,7±0,60	139,2±1,1	47,15±1,21	12,3±0,60
Вихід, %	=100	33,9±1,40	19,2±0,50	=100	33,9±1,40	8,8±0,20
	Ковалентний метод			Електростатичний метод		

Розмір НВ до та після процедури електростатичної іммобілізації ПО визначено за допомогою СЕМ (рис. 2). Отже, отримані дані СЕМ-зображень після іммобілізації підтверджують, що розмір НВ не змінюється (рис. 2).

На наступному етапі досліджено ковалентне зв'язування молекул ПО із поверхнею Au-НВ. Із наведених даних (див. табл. 1) видно, що вихід ферменту після іммобілізації на наночастинок становить близько 19,2 %, тобто є у 2,2 рази більшим порівняно з електростатичним методом.

Для ковалентної іммобілізації ферменту було використано підхід формування на поверхні НЧ моношару (СОШ) ω-меркаптогексадеканої кислоти, карбоксильну групу якої конденсували з аміногрупою білка карбодіімід-пентафторфенольним методом. На рис. 3 схематично зображено ковалентне зв'язування ПО на поверхні моношару ω-меркаптогексадеканої кислоти.

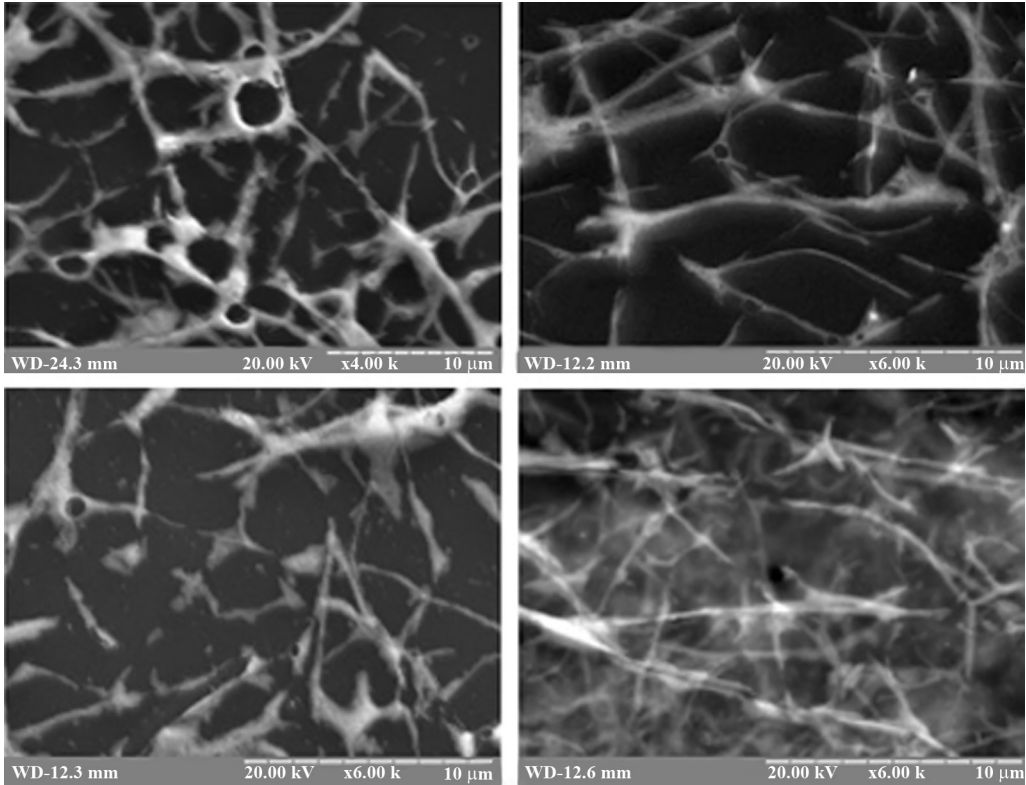


Рис. 2. SEM-зображення нановолокна золота: до та після іммобілізації ПО електростатичним (зверху) та ковалентним (знизу) методами

Fig. 2. SEM images of nanoweb of gold: before and after peroxidase immobilization by electrostatic (top) and covalent (bottom) methods

На поверхні НЧ відбувається зв'язування молекули ферменту. Зв'язування ферментів на НЧ реалізується, можливо, завдяки взаємодії аміногруп ферменту з карбонільним залишком МГДК. Ймовірно, також існують додаткові нековалентні контакти ферменту з НЧ золота і срібла. Розмір синтезованих нановолокна до та після процедури ковалентної іммобілізації на них ПО, визначений за допомогою методу SEM, (рис. 2) становить 10–20 мкм.

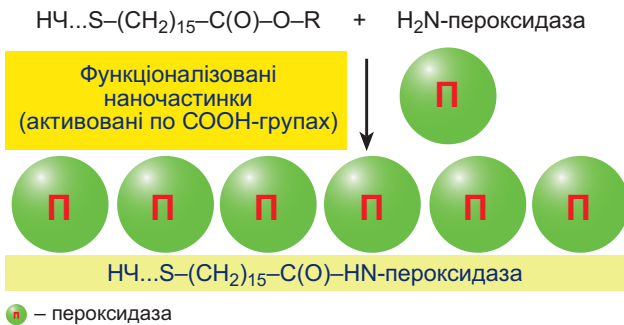


Рис. 3. Схема ковалентного зв'язування пероксидази хрому

Fig. 3. Scheme of covalent binding of peroxidase

Імобілізація ГО на поверхні наносіїв. Для імобілізації ГО було використано як ковалентний, так і електростатичний методи [22, 23]. У табл. 2 представлено результати з ковалентної імобілізації ГО на поверхні Ag-НЧ.

На рис. 4 наведені СЕМ-зображення Ag-НЧ, що підтверджують нанорозмірність до і після ковалентної імобілізації ГО.

Результати дослідження з імобілізації ГО та ПО різними способами на синтезованих наночастинках благородних металів узагальнено на рис. 5.

Таблиця 2. Імобілізація глюкозооксидази на поверхні наночастинок срібла (ковалентний метод)

Table 2. Immobilization of glucose oxidase on the surface of silver nanoparticles (covalent method)

Показник	Розчин глюкозооксидази до імобілізації	Супернатант	Глюкозооксидаза на наночастинках
V, мл	0,05	0,050	0,20
A, од./мл	172,3±4,50	128,5±5,30	12,4±0,3
ΣA, од.	8,62±0,05	6,43±0,35	2,50±0,25
Вихід, (%)	=100	74,5±4,30	29,0±0,65

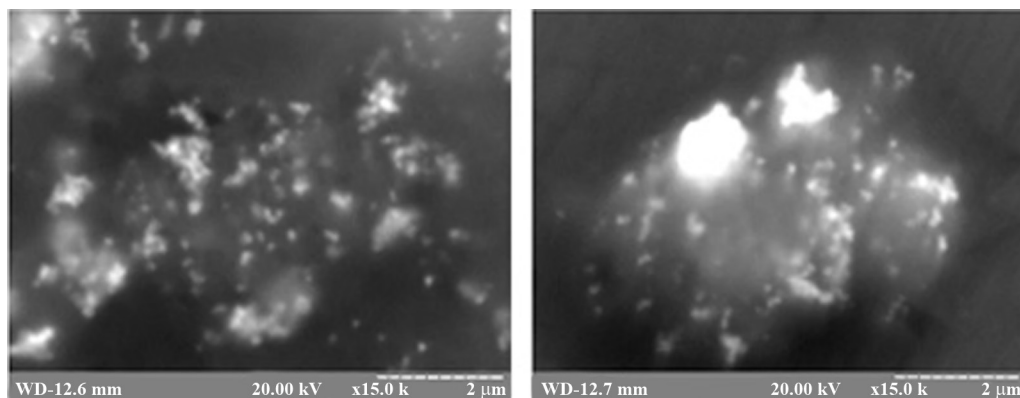


Рис. 4. СЕМ-зображення наночастинок срібла: до (А) та після (Б) ковалентної імобілізації глюкозооксидази

Fig. 4. SEM images of nanoparticles of silver: before (A) and after (B) covalent immobilization of glucose oxidase

У результаті проведеного дослідження встановлено, що використання ковалентного методу імобілізації ферментів (ГО та ПО) є ефективнішим, ніж електростатичний, для всіх варіантів експерименту, а срібні НЧ є ефективнішими для кон'югації із ГО: 29 % активності ферменту, взятого для імобілізації, зв'язалося з поверхнею НЧ (рис. 5 і табл. 2). Як видно з рис. 5, немає універсального наносіє, який був би одночасно більш ефективний для всіх ферментів: для ПО – це Au-NB, для ГО – це Ag-НЧ.

Дослідження стабільності ферментних препаратів, імобілізованих на наносіях. На рис. 6 представлено результати дослідження стабільності препаратів ПО і ГО в розчині та на наночастинках під час зберігання за температури +8 °С, у 50 мМ ФБ, рН 6,5.

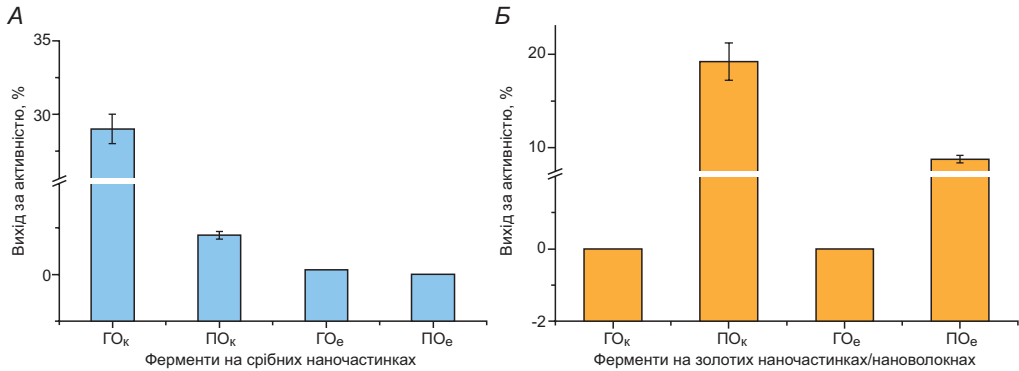


Рис. 5. Ефективність іммобілізації глюкозооксидази і пероксидази на наночастинках: к – ковалентний метод; е – електростатичний. А – для наночастинок срібла; Б – для наночастинок золота

Fig. 5. The effectivity of glucose oxidase and peroxidase immobilization on nanoparticles: к – covalent method; е – electrostatic. А – for nanoparticles of silver; Б – for nanoparticles of gold

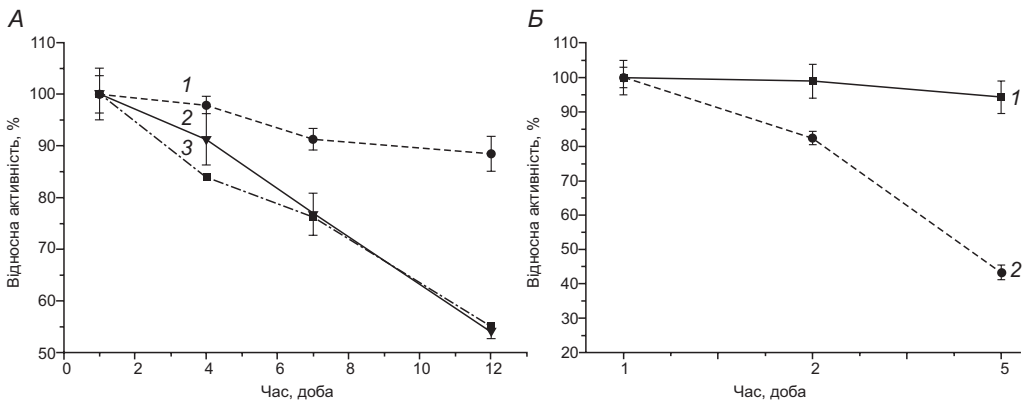


Рис. 6. Залежність зміни активності препаратів ферментів, ковалентно іммобілізованих на НЧ та у розчині, від тривалості зберігання: А – пероксидаза на наночастинках золота (1), нановолокнах золота (3) та в розчині (2); Б – глюкозооксидаза в розчині (1) та на поверхні наночастинок срібла (2). Максимальна активність ферменту прийнята за 100 %

Fig. 6. Activity of enzyme's preparations under storage duration: А – peroxidase covalently immobilized on nanoparticles of gold (1), nanowires of gold (3) and in solution (2); Б – glucose oxidase in solution (1) and covalently immobilized on the surface of nanoparticles of silver (2). Maximal enzyme's activity is taken as 100 %

Отже, на 12-ту добу залишалося тільки 55 % активності для ПО у розчині та ферменту на поверхні Au-НВ (рис. 6, А). Проте залишкова активність ПО на Au-НЧ після 12 днів зберігання становила 90 % від вихідної активності, що вказує на значне збільшення стабільності ферменту після його іммобілізації на Au-НЧ ковалентним методом. У той же час, після 12 днів зберігання препарату ПО, іммобілізованого на Au-НВ електростатичним методом, залишкова активність ПО становила 80 % порівняно з ферментом у розчині (дані не показано).

На рис. 6, Б представлено результати дослідження стабільності ГО в розчині та на поверхні Ag-НЧ під час зберігання за температури +8 °С, у 50 мМ ФБ, рН 6,5. Видно, що на 5-ту добу зберігання ГО на поверхні НЧ активність ферменту знижується на 60 %, тоді як активність ГО в розчині практично не змінюється. Цей ефект може бути пов'язаний із інгібувальним впливом іонів Ag⁺ на активність ГО.

ВИСНОВКИ

1. Здійснено синтез наночастинок срібла і золота (Ag-НЧ та Au-НЧ). Ag-НЧ одержано відновленням нітрату аргентуму глюкозою, а Au-НЧ – відновленням гідрогентетрахлороаурату тринатрію цитратом або натрію боргідридидом.
2. Досліджено функціоналізацію поверхні наночастинок. Одержано активовані НЧ за допомогою двох підходів: Ag-НЧ та Au-НЧ, синтезовані цитратним методом, обробляли 16-меркаптогексадекановою кислотою, а Au-НЧ, одержані боргідридидним методом, функціоналізували цистеаміном.
3. Уперше здійснено ковалентну й електростатичну іммобілізацію на поверхню наночастинок золота і срібла пероксидази хрону та глюкозооксидази із *P. adametzii*. За допомогою методу СЕМ досліджено структурну характеристику одержаних біонаноматеріалів і доведено нанорозмірність Au-НЧ і Ag-НЧ, а також синтезованих нанотрубок золота.
4. Дослідження вмісту іммобілізованих ферментів на поверхні наночастинок, тобто ефективності іммобілізації, засвідчило, що Au-НЧ є найефективнішими носіями для зв'язування пероксидази, а Ag-НЧ – для зв'язування глюкозооксидази.

ПОДЯКИ

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках спільного Українсько-Білоруського проекту Ф 54.4/031 та міжнародного індивідуального гранту компанії "ОПТЕК" (2014). Автори висловлюють подяку Роману Ярославовичу Серкізу за виконання досліджень із СЕМ.

1. Alaa A.A. Aljabali, David J. Evans. Polyelectrolyte-Modified Cowpea Mosaic Virus for the Synthesis of Gold Nanoparticles. **Virus Hybrids as Nanomaterials**, 2014; 1108: 97–103.
2. Ansar S.M., Ameer F.S., Hu W. et al. Removal of molecular adsorbates on gold nanoparticles using sodium borohydride in water. **Nano Lett**, 2013; 13(3) 1226–1229.
3. Arya S.K., Saha S., Ramirez-Vick J.E. [et al.]. Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensors applications. **Review. Anal. Chim. Acta**, 2012; 737: 1–21.
4. Berezin I.V., Antonov V.K., Martinek K. **Immobilized enzymes**. Moscow: MSU, 1976: 1–2. (In Russian).
5. Cade N.I., Ritman-Meer T., Kwakwa K.A. et al. The plasmonic engineering of metal nanoparticles for enhanced fluorescence and Raman scattering. **Nanotechnol**, 2009; 20: 285201–285206.
6. Chen Y., Aveyard J., Wilson R. Gold and silver nanoparticles functionalized with known numbers of oligonucleotides per particle for DNA detection. **Chem. Commun**, 2004; 24: 2804–2805.
7. Dhillon G.S., Brar S.K., Kaur S., Verma M. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. **Crit. Rev. Biotechnol**, 2012; 32(1): 49–73.

8. Dongxiang L., Qiang H., Yue C. Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. **BBRC**, 2007; 355: 488–493.
9. Doria G., Conde J., Veigas B. et al. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. **Sensors**, 2012; 12(2): 1657–1687.
10. Iosin M., Baldeck P., Astilean S. Study of tryptophan assisted synthesis of gold nanoparticles by combining UV–Vis, fluorescence, and SERS spectroscopy. **Journal of Nanoparticle Research**, 2010; 12(8): 2843–2849.
11. Kamiar A., Ghotalou R., Vali Z.H. Preparation, physicochemical characterization and performance evaluation of gold nanoparticles in radiotherapy. **Adv. Pharm. Bull.**, 2013;3(2): 425–428.
12. Kharissova O.V., Dias H.V., Kharisov B.I. et al. The greener synthesis of nanoparticles. **Trends Biotechnol**, 2013; 31(4): 240–248.
13. Kumar S., Gandhi K.S., Kumar R. Modeling of formation of gold nanoparticles by Citrate Method. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 2007; 46: 3136–3138.
14. Maribel G., Guzman M.G., Dille J. et al. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **World Acad. Sci. Eng. Tech.**, 2008; 43: 357–364.
15. Narasimha G., Alzohairy M., Khadri H., Mallikarjuna K. Extracellular synthesis, characterization and antibacterial activity of Silver nanoparticles by *Actinomyces isolative*. **Int. J. Nano Dimens**, 2013; 4(1): 77–83.
16. Narayanan K.B., Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2010; 156(1–2): 1–13.
17. Park H.H., Zhang X., Choi Y.J. [et al.]. Synthesis of Ag nanostructures by Photochemical reduction using citrate-capped Pt seeds. **J. Nanomaterials**, 2011; 1: 1–7.
18. Patra H.K., Banerjee S., Chaudhuri U. et al. Cell selective response to gold nanoparticles. **NanoMed**, 2007; 3(2): 111–119.
19. Park Y., Hong Y.N., Weyers A. et al. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. **IET Nanobiotechnol**, 2011; 5(3): 69–78.
20. Salvadori M.R., Ando R.A., Oller do Nascimento C.A., Correa B. Intracellular Biosynthesis and Removal of Copper Nanoparticles by Dead Biomass of Yeast Isolated from the Wastewater of a Mine in the Brazilian Amazonia. **BioMedLib**, 2014; 9(1): 1–9.
21. Shang Y., Min C., Hu J. et al. Synthesis of gold nanoparticles by reduction of HAuCl₄ under UV irradiation. **Solid State Sciences**, 2013, 15: 17–23.
22. Stasyuk N., Serkiz R., Mudry S. et al. Recombinant human arginase I immobilized on gold and silver nanoparticles: preparation and properties. **Nanotech. Develop**, 2011; 1(3): 11–15.
23. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G. et al. A new bi-enzyme potentiometric sensor for arginine analysis based on recombinant human arginase I and commercial urease. **J. Mater. Sci. Eng. A**, 2011; 1: 819–827.
24. Xu J., Han X., Liu H. et al. Synthesis of monodisperse gold nanoparticles stabilized by gemini surfactant in reverse micelles. **J. Disper. Sci. Technol**, 2005; 26: 473–476.
25. Yeh I.C., Creran B., Rotello V.M. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. **Nanoscale**, 2012; 4: 1871–1880.
26. Zhang X., Xing J.Z., Chen J. et al. Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by gold nanoparticles. **Clin. Invest. Med.**, 2008; 31(3): 160–167.

IMMOBILIZATION OF OXIDOREDUCTASES ON GOLD AND SILVER NANOPARTICLES

**M. M. Synenka¹, N. Ye. Stasyuk¹, T. V. Semashko²,
G. Z. Gayda¹, R. V. Mikhailova², M. V. Gonchar^{1,3}**

¹*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: galina.gayda@gmail.com*

²*Institute of Microbiology, NAS of Belarus, 2, Kuprevich St., 220141 Minsk, Belarus*

³*Institute of Applied Biotechnology and Basic Sciences
26, Sokolowska St., Kolbuszowa 36–100, Poland*

Nanoparticles of silver and gold were synthesized by chemical methods. Nanoparticles of silver were obtained by reducing of silver nitrate with glucose and nanoparticles of gold – by reducing of tetrachloroauric acid trihydrate with sodium citrate or borohydride. New methods of functionalization of nanoparticles surface were proposed. To activate nanoparticles, two approaches were applied: nanoparticles of silver and gold synthesized by citrate method were treated with 16-mercaptohexadecanoic acid, and nanoparticles of gold obtained with the help of sodium borohydride method, were functionalized with cysteamine. Bionanomaterials were obtained by immobilizing of horse radish peroxidase and glucose oxidase of *Penicillium adametzii* on the activated nanoparticles. Scanning electron microscopy and spectrophotometric methods proved nanosizes of resulting nanoparticles conjugated with enzymes. The study of catalytic properties of enzymes immobilized on the nanoparticles showed that nanoparticles of gold are the most effective for peroxidase, whereas the nanoparticles of silver are optimal carriers for conjugation with glucose oxidase.

Keywords: nanoparticles of silver or gold, peroxidase, glucose oxidase, immobilization on nanoparticles.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ОКСИДОРЕДУКТАЗ НА НАНОЧАСТИЦАХ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА

**М. М. Синенька¹, Н. Е. Стасюк¹, Т. В. Семашко²,
Г. З. Гайда¹, Р. В. Михайлова², М. В. Гончар^{1,3}**

¹*Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина
e-mail: galina.gayda@gmail.com*

²*Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Купревича, 2, Минск 22014, Беларусь*

³*Институт прикладной биотехнологии и фундаментальных наук,
ул. Соколовска, 26, Кольбушова 36–100, Польша*

С помощью химических методов синтезированы наночастицы серебра и золота. Наночастицы серебра получены восстановлением нитрата серебра глюкозой, а наночастицы золота – восстановлением гидрогентахлороаурата двумя способами: тринатрий цитратом и натрий боргидридом. Предложены новые методы функционализации поверхности полученных наночастиц. Активированные наночастицы серебра и золота, синтезированные цитратным методом, обрабаты-

ли 16-меркаптогексадекановой кислотой, а наночастицы золота, синтезированные боргидридным методом, функционализировали цистеамином. Иммунизацией пероксидазы хрена и глюкозооксидазы *Penicillium adametzii* на активированных наноносителях золота и серебра получены новые бионаноматериалы. Методами сканирующей электронной микроскопии и спектрофотометрического анализа доказана наноразмерность синтезированных наночастиц золота и серебра, а также нанотрубок золота, связанных с ферментами. Исследование каталитических свойств иммобилизованных на наноносителях ферментов показало, что наночастицы золота – наиболее эффективные носители для связывания пероксидазы хрена, а наночастицы серебра – для связывания глюкозооксидазы.

Ключевые слова: наночастицы серебра и золота, пероксидаза, глюкозооксидаза, иммобилизация на наночастицах.

Одержано: 11.06.2014