

STRESZCZENIE

W XXI wieku nanomateriały odgrywają coraz ważniejszą rolę, znajdując zastosowanie w wielu sektorach, w tym: w rolnictwie, medycynie, przemyśle chemicznym, tekstylnym, elektronicznym i energetycznym. Tradycyjne metody syntezy nanocząstek (NPs) oparte na konieczności zastosowania substancji chemicznych wiążą się ze znaczną toksycznością i wysokim zużyciem energii. Z tego powodu biologiczna, zielona synteza NPs zyskuje coraz większe zainteresowanie, ponieważ oferuje łagodną alternatywę dla metod chemicznych i fizycznych. Synteza NPs z wykorzystaniem grzybów stanowi interesującą, wciąż rozwijającą się dziedzinę badań, co zawdzięcza swojej prostocie, relatywnie niewielkim nakładom ekonomicznym i energooszczędności. Mykosenyza eliminuje potrzebę stosowania szkodliwych substancji chemicznych. Ponadto, grzyby produkują związki pełniące podwójną rolę, tj. reduktorów oraz stabilizatorów NPs, co pozwala uzyskać stabilne struktury nieulegające agregacji, o zwiększonej aktywności biologicznej. Różnorodność metabolitów, takich jak enzymy, polisacharydy, polipeptydy, białka i inne makrocząsteczki, uczyniła z grzybów doskonałe narzędzie do syntezy nanocząstek. W pracy dokonano przeglądu metod syntezy NPs ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania w procesie grzybów.

WPROWADZENIE

HISTORIA NANOTECHNOLOGII – KAMIEŃ MIŁOWY

Historia nanotechnologii rozpoczęła się od wizjonerskiego i przełomowego wykładu wygłoszonego przez amerykańskiego fizyka Richarda Phillipsa Feynmana podczas zjazdu Amerykańskiego Towarzystwa Fizycznego w 1959 r. Wykład zatytułowany „There’s Plenty of Room at the Bottom” stał się fundamentem nowej dziedziny wiedzy, znanej dziś jako nanonauka. Feynman, który został laureatem Nagrody Nobla w dziedzinie fizyki w 1965 r. za stworzenie relatywistycznej elektrodynamiki kwantowej, uważany jest za prekursora inżynierii na poziomie atomowym [1].

Termin „nanotechnologia” został wprowadzony w 1974 r. przez profesora Norio Taniguchiego z Uniwersytetu Tokijskiego. Taniguchi zdefiniował nanotechnologię jako technologię produkcji wykorzystującą precyzyjną obróbkę materiałów na poziomie nanometrów ($1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$) [2].

Kamieniem milowym w rozwoju nanotechnologii było wynalezienie w Zurychu w 1981 r. skaningowego mikroskopu tunelowego (ang. *Scanning Tunneling Microscope*, STM) przez Gerda Binniga i Heinricha Rohrera z IBM. Za to osiągnięcie badacze otrzymali w 1986 r. Nagrodę Nobla. STM umożliwił uzyskanie obrazu powierzchni badanych materiałów z rozdzielczością atomową przestrzeni rzeczywistej, bez pośrednictwa dyfrakcji, co pozwoliło naukowcom na manipulowanie pojedynczymi atomami.

W miarę rozwoju nanotechnologii pojawiło się wiele definicji tego terminu. W 1987 r. Albert Franks opisał nanotechnologię jako dziedzinę związaną z wytwarzaniem elementów o wymiarach mieszczących się w przedziale 0,1–100 nm [3]. Kim Eric Drexler, nazywany „Mr Nanotechnology”, zdefiniował nanotechnologię jako technologię przyszłości, polegającą na kontroli struktur na poziomie molekularnym, gdzie produkty są wytwarzane poprzez precyzyjne manipulowanie cząsteczkami, zgodnie z wymaganiami projektowanego urządzenia [4].

W pierwszych dekadach XXI wieku nanotechnologia przeszła od badań laboratoryjnych do praktycznych zastosowań i komercjalizacji. Ważnym wydarzeniem w historii nanotechnologii było wyizolowanie grafenu, tj. dwuwymiarowego materiału o niezwykłych właściwościach fizycznych. Odkrycia dokonali Andre Geim i Konstantin Novoselov w 2004 r., za co zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w 2010 r.

Małgorzata Jakubiak,

Monika Asztemborska✉

Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii,
Warszawa, Polska

https://doi.org/10.18388/pb.2017_598

✉ autor korespondujący:: m.asztemborska@uw.edu.pl

Słowa kluczowe: biosynteza, grzyby, mykosenyza, nanocząstki, nanotechnologia, synteza

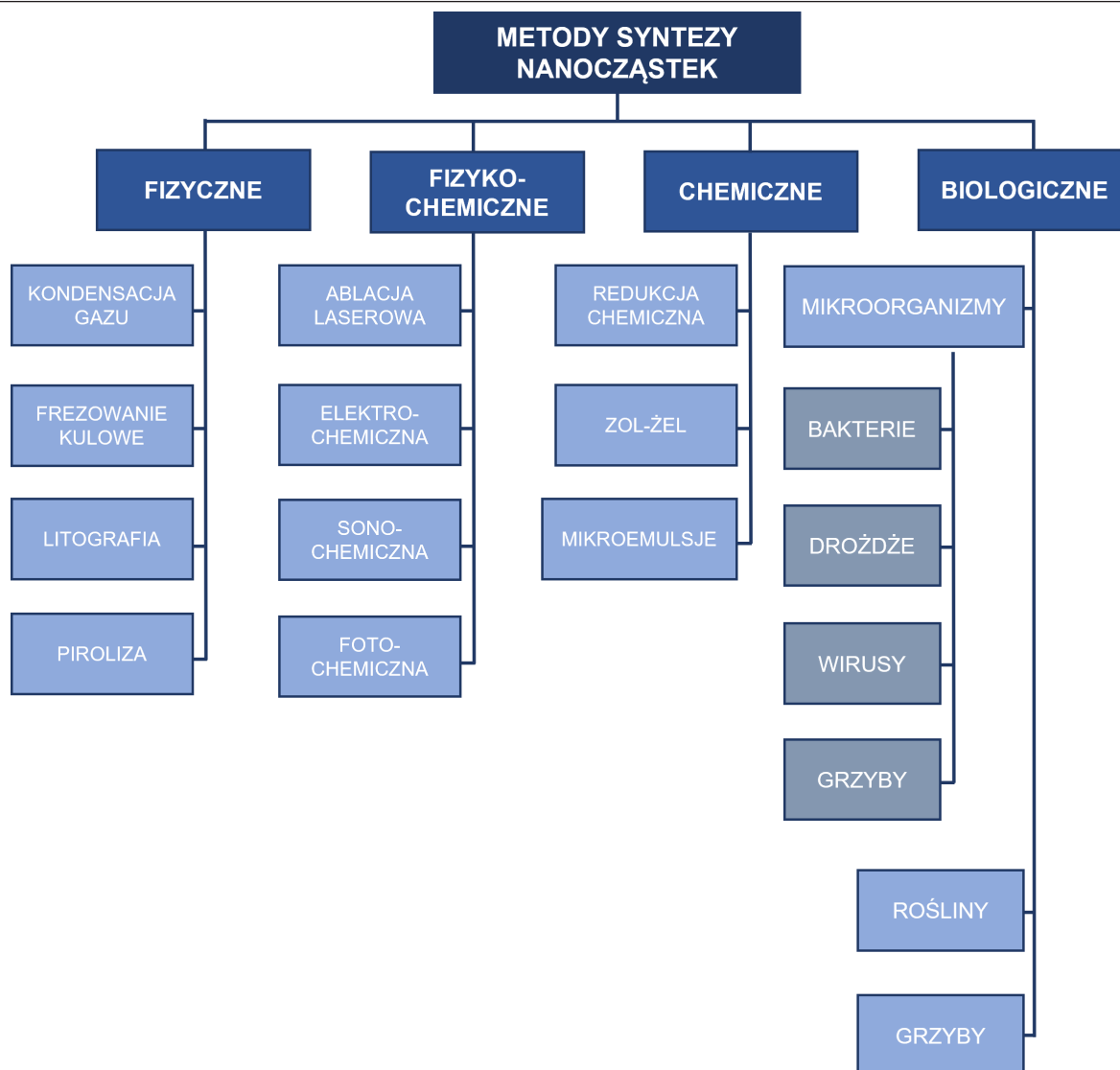
Nanotechnologia stanowi opowieść o ciągłym postępie, zarówno w zakresie prac naukowo-badawczych, jak i technologii. Umożliwiła manipulowanie materią na poziomie molekularnym i atomowym, otwierając drogę do szeregu innowacyjnych rozwiązań, które potencjalnie mogą znacząco wpłynąć na rozwój innych dziedzin nauki.

CHARAKTERYSTYKA NANOCZĄSTEK

Nanocząstki (ang. *nanoparticles*, NPs) definiuje się jako cząstki o rozmiarze nieprzekraczającym 100 nm w co najmniej jednym z wymiarów. Ze względu na swoje nanometryczne rozmiary, NPs wykazują unikalne właściwości fizykochemiczne, które odróżniają je od ich odpowiedników w skali makro. Zmniejszenie wymiarów cząstek do nanoskali prowadzi do zwiększenia stosunku ich powierzchni do objętości, co z kolei wpływa na wzrost aktywności powierzchniowej i zmianę właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych materiałów [5].

NPs mogą przyjmować różnorodne kształty, tj. kuliste, cylindryczne, płaskie, a także bardziej złożone formy. W

zależności od składu materiałowego NPs mogą być klasyfikowane jako: wykonane na bazie węgla (np. fulereny), organiczne (np. micelle), nieorganiczne (np. metale, tlenki i sole metali), hybrydowe [6], zaś ich powierzchnia może posiadać właściwości zarówno hydrofilne jak i hydrofobowe. Ciągły postęp w dziedzinie nanonauki i nanotechnologii doprowadził do coraz częstszego włączania NPs do produktów dostępnych na rynku. Stało się to impulsem do inwentaryzacji produktów konsumenckich zawierających nanostruktury. NPs znajdują szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach zarówno nauki, jak i przemysłu. W medycynie NPs są wykorzystywane m.in. jako nośniki leków, umożliwiające precyzyjne dostarczanie substancji terapeutycznych do komórek docelowych [7] oraz w diagnostyce medycznej [8]. W ochronie środowiska nanocząstki stosuje się do oczyszczania wód i gleb z zanieczyszczeń lub do efektywnej degradacji szkodliwych substancji w wyniku działania synergistycznego NPs i mikroorganizmów [9]. Zgodnie z bazą produktów nanotechnologicznych, opublikowaną przez portal *StatNano* (<https://product.statnano.com/product/all>), obecnie zarejestrowanych jest ponad 11 tys. takich produktów. Najczęściej wykorzystywane są



Rycina 1. Metody syntezy nanocząstek.

nanocząstki srebra (AgNPs), tlenku krzemu (SiO_2NPs) i tlenku tytanu (TiO_2NPs).

SYNTEZA NANOCZĄSTEK

Mnogość zastosowań nanocząstek zwróciła uwagę badaczy na obszar naukowy obejmujący ich syntezę, ze szczególnym uwzględnieniem przyjaznych środowisku metod biologicznych, tzw. zielonej syntezy. Konwencjonalnie nanostruktury są syntetyzowane przy użyciu metod fizycznych, fizyko-chemicznych i chemicznych (Ryc. 1).

Fizyczne metody syntezy nanocząstek

Synteza nanocząstek metodami fizycznymi polega na ich bezpośrednim wytwarzaniu z materiałów stałych bez konieczności stosowania reakcji chemicznych. Metody te opierają się na mechanicznych, termicznych lub elektrycznych procesach, które rozdrabniają materiały lub prowadzą do kondensacji NPs z fazy gazowej. Często wykorzystywane są w produkcji dużych ilości NPs i preferowane są tam, gdzie istotne jest unikanie wykorzystania substancji chemicznych. Nie wymagają stosowania szkodliwych reagentów, prowadząc tym samym do uzyskania produktów o wysokiej czystości. Zaletą tego rodzaju metod jest powstanie NPs jednolitych pod względem wielkości. Do najpopularniejszych metod fizycznych należy technika odparowania i kondensacji, gdzie materiał źródłowy jest odparowywany w wysokiej temperaturze w komorze próżniowej. Powstały w ten sposób gaz ulega kondensacji tworząc NPs. Wadą metody jest konieczność uzyskania wysokich temperatur, co związane jest z wykorzystaniem aparatury generującej wysokie zużycie energii. Stężenie wytwarzanych w ten sposób nanocząstek, np. AgNPs, wzrasta wraz ze wzrostem temperatury w procesie, a same NPs charakteryzują się sferycznym kształtem i brakiem agregacji [10]. Inny przykład fizycznej metody syntezy nanostruktur to frezowanie kulowe. Jest to metoda fizycznego rozdrabniania materiałów stałych do skali nanometrycznej za pomocą obracających się młynów kulowych [11]. Proces ten może być przeprowadzany na sucho lub w cieczy, przy czym w żadnym razie nie ma możliwości kontroli nad kształtem i wielkością powstających NPs.

Fizyko-chemiczne metody syntezy

Nanocząstki mogą być syntetyzowane metodami fizyko-chemicznymi m.in. przy zastosowaniu ablacji laserowej, która polega na skierowaniu impulsu lasera w materiał, np. metal, co doprowadza do jego parowania i wytworzenia się NPs. Wydajność procesu oraz charakterystyka wytwarzanych NPs zależy od parametrów takich jak: długość fali lasera, czas ablacji, wykorzystane medium. Ablację laserową przeprowadza się zazwyczaj w roztworach cytrynianu sodu lub laurylosiarczanu sodu (SDS, SLS). Wykazano, że średnica wytwarzanych NPs zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia SDS [12]. Inną fizykochemiczną metodą syntezy NPs jest metoda elektrochemiczna, wykorzystująca procesy elektrochemiczne do redukcji jonów metali i formowania NPs na elektrodach. Możliwość precyzyjnej kontroli potencjału elektrody, prądu i warunków otoczenia, pozwala dokładnie kontrolować wielkość i kształt stabilnych NPs. Niekiedy

proces wymaga użycia stabilizatora, którym najczęściej jest glikol polietylenowy (PEG), poliwinylpirolidon (PVP) lub sole tetraoctyloamonowe [13]. Z kolei synteza NPs metodą sonochemiczną wykorzystuje ultradźwięki do inicjowania reakcji chemicznych, które prowadzą do formowania się NPs. Energia ultradźwięków wywołuje zjawisko kawitacji, podczas której powstają pęcherzyki gazu w cieczy, a ich implozja generuje ekstremalne warunki, tj. wysokie ciśnienie i temperaturę, co sprzyja inicjowaniu reakcji chemicznych oraz rozdrobnieniu materiałów, a tym samym umożliwia syntezę nanocząstek. Parametry procesu, takie jak: temperatura, czas i moc sonikacji, odgrywają istotną rolę w wielkości i morfologii produktów końcowych [14]. Nanocząstki mogą powstawać również w reakcji fotochemicznej. Metoda polega na wykorzystaniu światła, przy czym najczęściej do inicjowania reakcji chemicznych, np. redukcji jonów metali, prowadzących do powstania NPs, wykorzystywane jest promieniowanie UV. Stężenie odczynników, rodzaj światła, czas napromieniowania, stosowanie lub brak środków redukujących/stabilizujących, pH mieszaniny reakcyjnych itp. są kluczowymi parametrami, które wpływają na właściwości syntetyzowanych NPs, takich jak: wielkość, kształt i stabilność koloidalna [15]. Metoda ogranicza się do wykorzystania materiałów fotoreaktywnych, które mogą zostać niezamierzenie wzbudzone przez światło, co jest jej niewątpliwą wadą.

Chemiczne metody syntezy

Najpopularniejsze i najbardziej liczne są chemiczne metody syntezy nanocząstek. Polegają one na redukcji w roztworze jonów, których źródłem są najczęściej sole metali (w przypadku srebra źródłem jonów jest głównie azotan (V) srebra) do formy metalicznej w obecności odpowiedniego reduktora. Dostarcza on elektronów niezbędnych do przekształcenia jonów w nanocząstki. Reduktorem może być np. cytrynian sodu (pełniący również często funkcję stabilizatora zapobiegającego agregacji NPs), borowodorki, wodór pierwiastkowy [16]. W procesie niezbędne jest zastosowanie stabilizatorów, będących np. polimerami jak poliwinylpirolidon (PVP), które zapobiegają agregacji nowo powstałych struktur [17]. Precyzyjna kontrola parametrów takich jak: stężenie substancji, temperatura, pH, pozwala na uzyskanie nanocząstek o określonych właściwościach, wielkości i kształcie. Zaletami syntezy chemicznej jest prostota i relatywnie niski koszt przeprowadzenia reakcji oraz kontrola parametrów procesu. Do wad metody należy konieczność zastosowania stabilizatorów, co z kolei może wpływać na właściwości produktu, oraz niekiedy wymóg dodatkowego oczyszczenia z pozostałości związków chemicznych użytych w procesie syntezy.

Skuteczną metodą wytwarzania wysokiej jakości nanocząstek tlenków metali, w porównaniu z innymi metodami fizycznymi i chemicznymi, jest synteza chemiczna drogą zol-żel, polegająca na przekształceniu płynnego roztworu, tj. zolu, w sieciowy układ półstały, tj. żel. Proces obejmuje hydrolizę i kondensację związków prekursorowych, najczęściej tlenków metali, takich jak: TiO_2 , SnO_2 , WO_3 i ZnO , co zostało dokładnie opisane w literaturze [18]. Synteza ta jest prosta, szybka i korzystniejsza ekonomicznie niż pozostałe metody chemiczne.

Fizyczne, fizykochemiczne i chemiczne metody syntezy nanocząstek, pomimo wielu niewątpliwych zalet, są potencjalnie niebezpieczne i wymagają toksycznych chemikaliów oraz wysokich temperatur, pH i ciśnienia do syntezy. Ponadto metody te wiążą się z dużym zużyciem energii i są kosztowne. Dlatego duże zainteresowanie środowiska naukowego, ze względu na ekologiczność, efektywność oraz możliwość wytwarzania nanostruktur o precyzyjnie kontrolowanych właściwościach zyskały biologiczne metody syntezy NPs. Metody te wykorzystują mikroorganizmy, rośliny, grzyby oraz ich enzymy i białka, które mogą redukować jony metali oraz jednocześnie je stabilizować w procesach biosyntezy [19]. Nanocząstki złota, srebra, kadmu, cynku czy żelaza z powodzeniem mogą być wytwarzane przy wykorzystaniu bakterii, natomiast NPs srebra, selenu, palladu i dwutlenku tytanu można syntetyzować z użyciem drożdży [20].

Metody biosyntezy są dużo bardziej korzystne z punktu widzenia ochrony środowiska, ponieważ często prowadzone są w łagodnych warunkach, tj. temperaturze pokojowej, ciśnieniu atmosferycznym i pH zbliżonym do neutralnego. Co więcej, nie wymagają stosowania dodatkowych, szkodliwych substancji chemicznych, co czyni je przyjaznymi dla środowiska, w przeciwieństwie do metod tradycyjnych.

Biosynteza nanocząstek, jako element tzw. zielonej nanotechnologii, stanowi obiecującą alternatywę dla konwencjonalnych metod syntezy, tj. fizycznej, fizyko-chemicznej i chemicznej [21,22]. Ekologiczne podejście do syntezy NPs zmniejsza negatywny wpływ procesu na środowisko, na co ukierunkowane są obecne trendy badawcze.

Biosynteza nanocząstek możliwa jest przy wykorzystaniu wielu różnych organizmów i ich metabolitów, ale szczególnie rolę przypisuje się mykosisyntezie, czyli wykorzystaniu w wytwarzaniu nanocząstek grzybów. Mykosisynteza może stanowić energooszczędną i przyjazną dla środowiska alternatywę dla konwencjonalnych procedur. Różnorodność grzybowych metabolitów, takich jak: enzymy, polisacharydy, polipeptydy, białka i inne makrocząsteczki, ich tolerancja i potencjał biologicznej akumulacji metali oraz łatwość ich hodowli laboratoryjnej, zwłaszcza w dużych ilościach, czyni z grzybów wyjątkowe narzędzie do biosyntezy nanocząstek.

GRZYBY JAKO NANOFABRYKI

MECHANIZMY TOLERANCJI GRZYBÓW NA METALE

Grzyby charakteryzują się relatywnie wysoką odpornością na toksyczność metali. W wyniku długiego procesu ewolucyjnego organizmy te wykształciły mechanizmy obronne obniżające stężenia metali dostających się do ich komórek (np. tworzenie minerałów biogennych), osłabiające toksyczność metali w środowisku wewnątrzkomórkowym (np. kompartmentalizacja). Mechanizmy te pomagają również w usuwaniu nadmiernych ilości metali z wewnętrznego środowiska komórkowego. Grzyby produkują różnorodne cząsteczki organiczne pełniące istotną rolę w wytrą-

caniu lub detoksykacji metali w środowisku zewnętrznym i wewnętrznym grzybów [23].

Do związków chelatujących wspierających odporność grzybów na metale należą m.in. peptydy zawierające grupy tiolowe, takie jak zredukowany glutation, który odgrywa też kluczową rolę w stresie oksydacyjnym wywołanym metalami oraz metalotioneiny – białka o niskiej masie cząsteczkowej, bogate w cysteinę, które są w stanie wiązać toksyczne metale. Inna grupa związków chelatujących to grzybowe substancje polimeryczne, składające się z polisacharydów, białek, kwasów nukleinowych, lipidów, kwasu uronowego i innych pomniejszych związków organicznych i nieorganicznych. Duża liczba grup karboksylowych i hydroksylowych odpowiada za ich właściwości sorpcyjne, a ich amfifilowa natura umożliwia wychwyt jonów metali przez przyciąganie elektrostatyczne i wymianę jonową. Ważną grupę związków chelatujących wytwarzanych przez grzyby stanowią melaniny, które u tych organizmów odgrywają różne role w ochronie przed stresem, w tym stresem: spowodowanym promieniowaniem jonizującym, termicznym (wysoka i niska temperatura), osmotycznym (susza), enzymów hydrolitycznych, a ponadto stresem spowodowanym akumulacją potencjalnie toksycznych pierwiastków, w tym metali [24]. Skład melanin jest różny i często zawierają one węglowodory alifatyczne, jednostki fenolowe, peptydy i kilka grup funkcyjnych, co zapewnia wiele miejsc aktywnych do wiązania metali. Innym mechanizmem radzenia sobie ze stresem związanym z obecnością metali jest synteza kwasów organicznych, które mają zdolność zarówno rozpuszczania metali, jak i tworzenia trudno rozpuszczalnych związków – najczęściej szczawianów. Procesy chelatowania metali kwasami organicznymi zachodzą zarówno w środowisku wewnątrzkomórkowym, jak i zewnątrzkomórkowym. Uwolnione szczawiany mogą tworzyć kryształy poza komórką, aby zmniejszyć biodostępność metali w środowisku wewnątrzkomórkowym [25].

Kolejnym mechanizmem ograniczającym grzybom liczbę jonów metali, które dostają się do komórek jest biosorpcja na powierzchni ściany komórkowej [25]. Ściana komórkowa grzybów ma wiele miejsc sorpcji, z których większość ma ładunek ujemny. Jest on wynikiem obecności różnorodnych grup funkcyjnych, w tym: $-\text{COOH}$, $-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{OH})_2$ i grup $-\text{SH}$ na powierzchni ściany komórkowej. Składa się ona głównie z polisacharydów, takich jak chityna i β 1,3-glukan, a także białek, polifosforanów, polipeptydów i innych cząsteczek. Poza pasywną sorpcją, do mechanizmów ochrony grzybów przed szkodliwym wpływem metali należą zależne od metabolizmu procesy bioakumulacji i kompartmentacji. Po dostaniu się toksycznej ilości jonów metali do komórki grzybowej, odpowiednie systemy transportu przenoszą je do określonych części komórki, najczęściej wakuoli. Proces sekwestracji i wytrącania metali w organellach komórki (kompartmentacja) zależy od warunków środowiskowych takich jak: pH, stężenia innych pierwiastków i związków oraz od rodzaju białek, które wytwarza organizm [23]. Czynniki te determinują rodzaj jonów metali, jakie dany gatunek może kompartmentalizować. Mechanizmem obronnym na podwyższone stężenie metali w komórce jest też uruchomienie systemów ich aktywnego usuwania poprzez systemy transportowe specyficzne dla

danego jonu lub przez transportery metali o podobnych właściwościach.

MECHANIZMY MYKOSYNTETY NANOCZĄSTEK

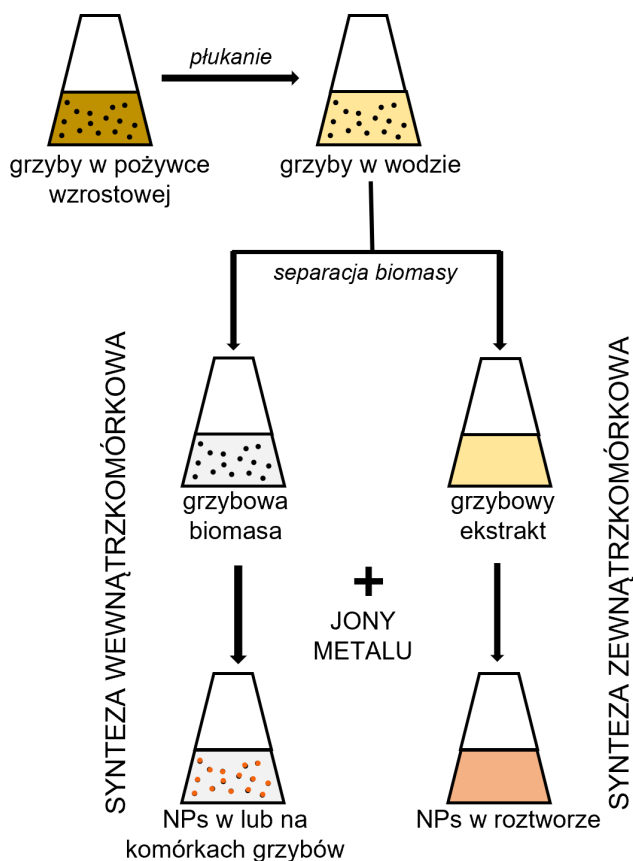
Związki i mechanizmy występujące w komórkach grzybów odpowiedzialne za ich ochronę przed toksycznym wpływem jonów metali są często zaangażowane także w syntezę nanocząstek pochodzenia biologicznego. Nanocząstki wytwarzane przez mykossyntezę za pośrednictwem biocząsteczek mogą różnić się od swoich odpowiedników wytwarzanych metodami chemicznymi lub fizycznymi [26].

Metodyka syntezy nanocząstek przy wykorzystaniu grzybów obejmuje kilka stałych etapów, które prowadzą do efektywnego wytwarzania nanostruktur o unikalnych właściwościach (Ryc. 2). Mykossynteza może przebiegać zewnątrzkomórkowo lub wewnątrzkomórkowo. W obu przypadkach proces rozpoczyna się od izolacji odpowiednich gatunków, czy też szczepów grzybów. Następnie są one hodowane w warunkach laboratoryjnych na pożywkach wzrostowych, dostarczających im niezbędnych składników odżywczych. Rozwój grzybni przyczynia się do produkcji metabolitów wymaganych w kolejnych etapach syntezy. W przypadku syntezy zewnątrzkomórkowej przygotowujemy filtrat grzybowy zawierający białka, enzymy i inne elementy pełniące kluczową rolę w redukcji i stabilizacji jonów metali podczas formowania NPs. Można również wykorzystać samo medium wzrostowe grzybni, bez jej fi-

zycznego udziału. Do tak uzyskanej matrycy należy następnie dodać związek metalu, prekursor syntezy nanocząstek, który będzie podlegał procesowi redukcji. Grzybowe białka i enzymy przekształcają jony metali w ich formy pierwiastkowe. W przypadku syntezy wewnątrzkomórkowej odpowiednie prekursory dodaje się bezpośrednio do otrzymanej biomasy grzybowej (Ryc. 2). Ostatnim etapem procesu jest analiza nowopowstałych struktur. Badania pozwalające określić strukturę, rozmiar i właściwości zsyntetyzowanych NPs obejmują np. wykorzystanie transmisyjnej lub skaningowej mikroskopii elektronowej, spektroskopii UV-Vis, dyfrakcji rentgenowskiej [23].

Przebieg procesu biosyntezy nanocząstek i właściwości otrzymanych cząstek (kształt, rozmiar) zależą od wielu czynników takich jak: temperatura, pH, czas reakcji, stężenie jonów, skład pożywki i gatunek/szczep grzyba. W zależności od podłoża hodowlanego i warunków wzrostu grzyby wytwarzają różne metabolity i białka. Dodatek do podłoża specyficznych substratów, stymulujących syntezę enzymów i innych metabolitów kluczowych w procesie syntezy NPs przy użyciu grzybów, może istotnie zwiększać wydajność tego procesu [27]. W przeciwieństwie do fizykochemicznych metod syntezy nanocząstek, które wymagają dodatkowych etapów funkcjonalizacji powierzchni, w metodach biologicznych synteza i funkcjonalizacja zachodzą jednocześnie. Wytwarzane przez grzyby enzymy, peptydy i białka odgrywają istotną rolę zarówno jako środki redukujące, jak i stabilizujące oraz funkcjonalizujące powierzchnię nanocząstek.

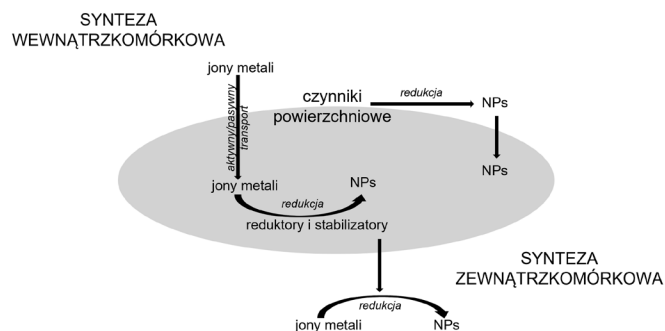
Za pierwszy etap syntezy nanocząstek, proces bioredukcji, odpowiedzialne są najczęściej enzymy – pozakomórkowe oraz wewnątrzkomórkowe. Można wśród nich wymienić takie enzymy jak: celobiohydrolaza D, glukozydaza i beta-glukozydaza czy reduktaza azotanowa. Podczas formowania NPs elektrony mogą być transportowane przez mediatory redoks o niskiej masie cząsteczkowej, takie jak ubiquinol, NADH, tlen/nadtlenek lub przez bezpośrednią interakcję między białkami redoks cytochromów typu c i jonom metalu [23,26]. Jako czynniki redukujące mogą również służyć inne cząsteczki: glukoza, różne kofaktory, czy aminokwasy (np. L-histydyna, kwas glutaminowy czy aminokwasy histydynowe). Te biocząsteczki działają nie tylko jako czynniki redukujące, ale mogą wpływać ograniczająco na rozmiar powstających nanocząstek. Wykazano, że zawartość aminokwasów ma zazwyczaj odwrotny wpływ na wielkość NPs – ich większe stężenie skutkuje syntezą cząstek o mniejszych rozmiarach. Z kolei za redukcję jonów i tworzenie stabilizującej powłoki na powierzchni nanocząstek mogą być odpowiedzialne grupy aminowe i karboksylowe w aminokwasach [28]. Różnorodność chemiczna wytwarzanych przez grzyby związków umożliwia projektowanie syntezy NPs o określonej morfologii, formie chemicznej i rozmiarze. Biocząsteczki poprzez tworzenie warstwy na powierzchni nanocząstek ograniczają proces agregacji. Komercyjne środki powierzchniowo czynne mogą pełnić podobną funkcję, ale nie ulegają one biodegradacji i są niebezpieczne dla środowiska. Do najważniejszych czynników jednocześnie redukujących i stabilizujących zalicza się enzymy, aminokwasy, peptydy i białka. Inne związki, biorące udział w syntezie nanocząstek to: chityna i pochodzący z



Rycina 2. Wewnątrzkomórkowa i zewnątrzkomórkowa synteza nanocząstek przez grzyby (na podst. [23]).

deacetylacji chityny chitozan, który może tworzyć powłokę na powierzchni mykossyntetyzowanych nanocząstek, ograniczając tym samym ich rozmiar w trakcie syntezy. Podobną funkcję może pełnić dekstran, który jest biokompatybilny i nietoksyczny [23, 26].

Jak wspomniano wyżej, nanocząstki zawierające metale mogą być wytwarzane przez grzyby poprzez dwie różne ścieżki: syntezę wewnątrzkomórkową, zachodzącą wewnątrz komórek grzyba, która wymaga dodatkowego etapu ekstrakcji (I) oraz syntezę zewnątrzkomórkową, która obejmuje zarówno syntezę w podłożu wzrostowym grzybnii w obecności grzybów, jak i syntezę z ekstraktami grzybowymi bezkomórkowymi, które wykorzystują liczne biocząsteczki grzybowe do mineralizacji i stabilizacji wytworzonych NPs (II) (Ryc. 3). Mechanizmy syntezy są często związane z mechanizmami tolerancji grzybów na jony metali. Enzymami wewnątrzkomórkowymi odpowiedzial-



Rycina 3. Mechanizmy syntezy nanocząstek (na podst. [23,26]).

nymi za syntezę nanocząstek u grzybów są m.in. dehydrogenazy i komórkowe ATPazy. Antyoksydanty grzybowe są również odpowiedzialne za wytrącanie NPs, które stanowi

Tabela 1. Przykłady gatunków grzybów wykorzystywanych w biosyntezie nanocząstek.

Gatunek grzyba	Rodzaj NPs	Cechy powstałych NPs Wielkość	Kształt	Właściwości	Ref.
<i>Agaricus bisporus</i>	CuNPs	10 nm	Sześcienny	Działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii gram-ujemnych	[35]
	ZnNPs	50-100 nm	Kulisty	Łagodzenie stresu oksydacyjnego wywołanego przez Fe-NTA – skuteczny środek terapeutyczny przeciwko rakowi nerek wywołanemu przez Fe-NTA u szczurów	[36]
<i>Coriolus versicolor</i>	AgNPs	10 nm	Kulisty	Czas formowania NPs zależny od pH środowiska reakcji – w środowisku zasadowym czas ten ulega skróceniu z 72 do 1 godz.	[37]
<i>Flammulina velutipes</i>	AgNPs	22 nm	Kulisty	Działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze wobec <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i <i>Aspergillus Niger</i> oraz <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	[38] [39]
<i>Ganoderma lucidum</i>	ZnONPs	44,62 nm	Kulisty	Silne działanie przeciwgrzybicze	[40]
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	FeONPs	20,11 nm	Sześcienny	Działanie cytostaticzne w kierunku komórek raka płuc A549	[41]
<i>Pleurotus djamor</i>	TiO ₂ NPs	31 nm	Kulisty	Aktywność przeciwnowotworowa na poziomie 9,08–64,71% przy stężeniu 6,25–100 µg/ml wobec komórek rakowych A549	[42]
<i>Pleurotus eryngii</i>	AgNPs	10-45 nm	Kulisty	Działanie ochronne przed uszkodzeniem DNA	[43]
<i>Pleurotus florida</i>	AgNPs	11 nm	Kulisty	Działanie przeciwbakteryjne wobec <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	[44]
<i>Pleurotus giganteus</i>	AgNPs	5-25 nm	Kulisty	Działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii gram-ujemnych, hamowanie α-amylazy (przeciwcukrzycowe)	[45]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	ZnONPs	7,5 nm	Kulisty	Wysoka cytotoksyczność na komórkach Hek293 i HepG2	[46]
<i>Trametes multicolour</i>	AgNPs	306,80 nm	Kulisty	Działanie przeciwbakteryjne wobec <i>Candida albicans</i>	[47]
<i>Volvariella volvacea</i>	AuNPs	20-150 nm	Kulisty, trójkątny, sześciokątny	Kształt zależny od temperatury ekstraktu. AuNPs są związane z białkami poprzez wolne grupy aminowe	[48]
	AgNPs	15 nm	Kulisty	AgNPs są związane z białkami poprzez grupy karboksylowe reszt aminokwasowych	

mechanizm obronny przed toksycznymi jonami metali w środowisku. Ekstrakt wewnątrzkomórkowy jest zwykle przygotowywany przez fizyczne lub chemiczne rozerwanie komórki grzyba w celu uwolnienia aktywnych cząsteczek. Większość grzybów produkuje białka pozakomórkowe, polisacharydy, chinony, peptydy, oksydoreduktazy i inne cząsteczki w wyniku swojego metabolizmu i/lub mechanizmu obronnego przed niezrównoważonymi warunkami środowiskowymi, np. wysokim stężeniem jonów metali. W reakcjach tych, jony metali są redukowane przez organiczne cząsteczki wytwarzane przez grzyby, a następnie stabilizowane poprzez wytrącanie, agregację, biosprzęganie lub biosorpcję [29]. Reduktazy pozakomórkowe, takie jak: tyrozynazy, peroksydazy lakazy i fenoloxydazy, odgrywają główną rolę w dostarczaniu wysoce stabilnych, rozpuszczalnych w wodzie NPs zawierających metale, poprzez redukcję jonów metali [30]. Zaletą wydzielanych pozakomórkowo cząsteczek jest ich łatwiejsze oddzielenie od biomasy w porównaniu z wewnątrzkomórkową, gdzie konieczne jest zapewnienie rozbicia komórek.

Zachodzące w trakcie biosyntezy NPs reakcje są przyjazne dla środowiska, ze względu na brak konieczności stosowania toksycznych substancji chemicznych. Powstają NPs, których kształty i rozmiary zależą od warunków syntezy. Substancje obecne w grzybach pełnią również funkcję stabilizatorów, co zapobiega agregowaniu NPs, tworząc ich stabilne struktury.

Grzyby wytwarzają duże ilości białek, co prowadzi do wysokiej wydajności procesu syntezy NPs. Dodatkowo, w porównaniu do roślin i innych mikroorganizmów, grzybnia charakteryzuje się dużą wytrzymałością. Umożliwia to uzyskanie dużych ilości biomasy w bioreaktorach lub komorach hodowlanych [31]. Wysoka wydajność i stabilność procesu oraz mnogość bioaktywnych związków sprawiają, że grzyby są atrakcyjnymi biofabrykami do produkcji nanostruktur [32]. Grzyby owocnikowe charakteryzują się niską zawartością tłuszczu a ponadto bogactwem białek, węglowodanów, błonnika pokarmowego, minerałów (m.in. potasu i miedzi) oraz witamin (np. niacyn, ryboflawin) [33]. Obecność licznych związków bioaktywnych czyni grzyby, zarówno owocniki, jak i samą grzybnię, doskonałym materiałem do syntezy NPs. Hodowla grzybów na dużą skalę jest relatywnie prosta, co czyni je swoistymi nanofabrykami, umożliwiającymi produkcję NPs o zróżnicowanych, precyzyjnych kształtach i rozmiarach. Wszystko to stanowi ekonomiczną zaletę tej metody [34], zaś mykonanotechnologia, będąca innowacją naukową i technologiczną, staje się interesującym kierunkiem badań [21].

PRZYKŁADY GATUNKÓW WYKORZYSTYWANYCH W BIOSYNTETYZIE NANOCZĄSTEK

W literaturze opisano szeroką gamę gatunków grzybów zdolnych do biosyntezy nanocząstek metali, takich jak srebro (Ag), złoto (Au), miedź (Cu), cynk (Zn) oraz tlenki metali, w tym tlenek cynku (ZnO) i dwutlenek tytanu (TiO₂).

Grzyby oferują szerokie możliwości jako źródło do syntezy NPs, co czyni je cennymi organizmami do wykorzystania m.in. w biotechnologii i medycynie (Tab. 1). Ich zdolność do produkcji ekologicznych nanostruktur o unikalnych właści-

wościach stanowi atrakcyjną alternatywę dla konwencjonalnych metod syntezy nanomateriałów.

PODSUMOWANIE

Rosnąca świadomość na temat zielonej chemii oraz potrzeba opracowywania przyjaznych dla środowiska metod syntezy nanocząstek (NPs) skłaniają naukowców do wykorzystywania grzybów, w tym gatunków jadalnych, jako potencjalnych biofabryk. Zaletą stosowania grzybów jest wysoka zawartość różnorodnych związków i metabolitów oraz prostota hodowli, co czyni je atrakcyjnym źródłem do produkcji NPs. Główną rolę w tym procesie odgrywają reduktazy, enzymy kluczowe w syntezie NPs zarówno wewnątrz, jak i zewnątrzkomórkowej. Mnogość metod prowadzących do uzyskania NPs zachęca naukowców do dalszej analizy mechanizmów odpowiedzialnych za ich formowanie. Zrozumienie procesów, które determinują wielkość i kształt NPs, pozwoli na ich optymalizację i pełną kontrolę nad powstawaniem struktur o pożądanych właściwościach.

Dalsze badania nad mechanizmami formowania NPs przez różne gatunki grzybów otwierają drogę do stworzenia NPs o unikalnych właściwościach fizykochemicznych. Ma to ogromne znaczenie dla szerokiego spektrum zastosowań w chemii, medycynie, rolnictwie i innych gałęziach przemysłu. Potencjalnym kierunkiem rozwoju jest również wykorzystanie genetycznie modyfikowanych grzybów, które mogłyby produkować większe ilości enzymów zaangażowanych w proces syntezy NPs. Dzięki optymalizacji technik produkcyjnych możliwa będzie szybka produkcja dużych ilości NPs, co z kolei przyczyni się do efektywnego wykorzystywania nanomateriałów.

PIŚMIENNICTWO

1. Feynman RP (1960) There's Plenty of Room at the Bottom. *Eng Sci* 23(5): 22-36
2. Taniguchi N (1974) On the Basic Concept of Nanotechnology. *Proc Int Conf Prod Eng Tokyo Part II*: 18-23
3. Franks A (1987) Nanotechnology. *J Phys E: Sci Instr* 20(12): 1442-1451
4. Drexler KE (1992) *Nanosystems - Molecular machinery, manufacturing, and computation*. Wiley. New York
5. Banjara RA, Kumar A, Aneshwari R, Satnami ML, Sinha SK (2024) A comparative analysis of chemical vs green synthesis of nanoparticles and their various applications. *Environ Nanotechnol Monit Manag* 22: 100988
6. Harish V, Ansari MM, Tewari D, Gaur M, Yadav AB, Garcia-Betancourt ML, Abdel-Haleem FM, Bechelany M, Barhoum A (2022) Nanoparticle and nanostructure synthesis and controlled growth methods. *Nanomaterials* 12(18): 3226
7. Chandrakala V, Aruna V, Angajala G (2022) Review on metal nanoparticles as nanocarriers: Current challenges and perspectives in drug delivery systems. *Emergent Mater* 5(6): 1593-1615
8. Haleem A, Javaid M, Singh RP, Rab S, Suman R (2023) Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health J* 7(2):70-77
9. Vázquez-Núñez E, Molina-Guerrero CE, Peña-Castro JM, Fernández-Luqueño F, de la Rosa-Álvarez MG (2020) Use of nanotechnology for the bioremediation of contaminants: A review. *Processes* 8(7): 826
10. Irvani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B (2014) Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci* 9(6): 385-406
11. Ghorbani HR (2014) A review of methods for synthesis of Al nanoparticles. *Orient J Chem* 30(4): 1941-1949

12. Mafuné F, Kohno JY, Takeda Y, Kondow T, Sawabe H (2000) Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution. *J Phys Chem B* 104(39): 9111-9117
13. Wolska K, Markowska K, Wypij M, Golińska P, Dahm H (2017) Nanocząstki srebra, synteza i biologiczna aktywność. *Kosmos* 66(1): 125-138
14. Hassanjani-Roshan A, Vaezi MR, Shokuhfar A, Rajabali Z (2011) Synthesis of iron oxide nanoparticles via sonochemical method and their characterization. *Particuology* 9(1): 95-99
15. Jara N, Milán NS, Rahman A, Mouheb L, Boffito DC, Jeffries C, Dahoumane, SA (2021) Photochemical synthesis of gold and silver nanoparticles - A review. *Molecules* 26(15): 4585
16. Abbasi E, Milani M, Fekri Aval S, Kouhi M, Akbarzadeh A, Tayefi Nasrabadi H, Samiei M (2016) Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Crit Rev Microbiol* 42(2): 173-180
17. Koczkur KM, Mourdikoudis S, Polavarapu L, Skrabalak SE (2015) Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton transactions* 44(41): 17883-17905
18. Parashar M, Shukla VK, Singh R (2020) Metal oxides nanoparticles via sol-gel method: a review on synthesis, characterization and applications. *J Mater Sci-Mater El* 31(5): 3729-3749
19. Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK (2008) Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *J Nanoparticle Res* 10: 507-517
20. Fath-Alla AA, Mohamed AS, Khalil NM, Abd El-Ghany M (2024) Yeast-mediated nanoparticles and their biomedical applications. *Egypt J Bot* 64(4): 166-188
21. Srivastava S, Usmani Z, Atanasov AG, Singh VK, Singh NP, Abdel-Azeem AM, Bhargava A (2021) Biological nanofactories: Using living forms for metal nanoparticle synthesis. *Mini Rev Med Chem* 21(2): 245-265
22. Salem SS (2023) A mini review on green nanotechnology and its development in biological effects. *Arch Microbiol* 205(4): 128
23. Priyadarshini E, Priyadarshini SS, Cousins BG, Pradhan N (2021) Metal-Fungus interaction: Review on cellular processes underlying heavy metal detoxification and synthesis of metal nanoparticles. *Chemosphere* 274: 129976
24. Mattoon E, Cordero R, Casadevall A (2021) Fungal melanins and applications in healthcare, bioremediation and industry. *J Fungi* 7(6): 488
25. Kumar V, Dwivedi SK (2021) Mycoremediation of heavy metals: Processes, mechanisms, and affecting factors. *Environ Sci Pollut Res* 28(9): 10375-10412
26. Šebesta M, Vojtková H, Cyprichová V, Ingle AP, Urík M, Kolenčík M (2022) Mycosynthesis of metal-containing nanoparticles - Fungal metal resistance and mechanisms of synthesis. *Int J Mol Sci* 23(22): 14084
27. Hussein SM, Salah TA, Anter HA (2015) Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* 4(3): 225-231
28. Maruyama T, Fujimoto Y, Maekawa T (2015) Synthesis of gold nanoparticles using various amino acids. *J Colloid Interface Sci* 447: 254-257
29. Dhanjal DS, Mehra P, Bhardwaj S, Singh R, Sharma P, Nepovimova E, Chopra C, Kuca K (2022) Mycology-Nanotechnology Interface: Applications in Medicine and Cosmetology. *Int J Nanomed* 17: 2505-2533
30. Loshchinina EA, Vetchinkina EP, Kupryashina MA, Kursky VF, Nikitina VE (2018) Nanoparticles synthesis by *Agaricus soil basidiomycetes*. *J Biosci Bioeng* 126(1): 44-52
31. Narayanan KB, Sakthivel N (2010) Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Sci* 156(1-2): 1-13
32. Kalia A, Kaur G (2018) Biosynthesis of nanoparticles using mushrooms. *Biology of Macrofungi* 351-360
33. Cheung PC (2010) The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin* 35(4): 292-299
34. Khan NT, Khan MJ, Jameel J, Jameel N, Rheman SUA (2017) An overview: biological organisms that serves as nanofactories for metallic nanoparticles synthesis and fungi being the most appropriate. *Bioceram Dev Appl* 7(1):100-101
35. Sriramulu M, Shanmugam S, Ponnusamy VK (2020) *Agaricus bisporus* mediated biosynthesis of copper nanoparticles and its biological effects: An in-vitro study. *Colloid Interfac Sci* 35: 100254
36. El-Sonbaty S, Kandil EI, Haroun RAH (2023) Assessment of the antitumor activity of green biosynthesized zinc nanoparticles as therapeutic agent against renal cancer in rats. *Biol Trace Elem Res* 201(1): 272-281
37. Sanghi R, Verma P (2009) Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. *Bioresource Technol* 100(1): 501-504
38. Faisal S, Khan MA, Jan H, Shah SA, Shah S, Rizwan M, Akbar MT (2020) *Edible mushroom (Flammulina velutipes)* as biosource for silver nanoparticles: from synthesis to diverse biomedical and environmental applications. *Nanotechnology* 32(6): 065101
39. Zhang L, Wei Y, Wang H, Wu F, Zhao Y, Liu X, Su H (2020) Green synthesis of silver nanoparticles using mushroom *Flammulina velutipes* extract and their antibacterial activity against aquatic pathogens. *Food Bioprocess Technol* 13: 1908-1917
40. Kareem HJ, Al-Araji AM (2025) Synergistic effect of *Ganoderma lucidum* Triterpenoids and biosynthesized Zinc Oxide nanoparticles against some dermatophytes. *Nanomed Res J* 9(3): 228-242
41. Manimaran K (2024) Synthesis and characterization of *Pleurotus citrinopileatus* extract-mediated iron oxide (FeO) nanoparticles and its antibacterial and anticancer activity. *Biomass Convers Biorefin* 14(13): 15011-15020
42. Manimaran K, Murugesan S, Ragavendran C, Balasubramani G, Natarajan D, Ganesan A, Seedeve P (2021) Biosynthesis of TiO₂ nanoparticles using edible mushroom (*Pleurotus djamor*) extract: Mosquito larvicidal, histopathological, antibacterial and anticancer effect. *J Clust Sci* 32: 1229-1240
43. Kocak Y, Meydan I, Gur Karahan T, Sen F (2023) Investigation of mycosynthesized silver nanoparticles by the mushroom *Pleurotus eryngii* in biomedical applications. *Int J Environ Sci Technol* 20(5): 4861-4872
44. Priyadarshni KC, Krishnamoorthi R, Mumtha C, Mahalingam PU (2022) Biochemical analysis of cultivated mushroom, *Pleurotus florida* and synthesis of silver nanoparticles for enhanced antimicrobial effects on clinically important human pathogens. *Inorg Chem Commun* 142: 109673
45. Debnath G, Das P, Saha AK (2019) Green synthesis of silver nanoparticles using mushroom extract of *Pleurotus giganteus*: characterization, antimicrobial, and α -amylase inhibitory activity. *Bionanoscience* 9: 611-619
46. Mkhize SS, Poee OJ, Khoza S, Mongalo IN, Khan R, Simelane MBC (2022) Characterization and biological evaluation of zinc oxide nanoparticles synthesized from *Pleurotus ostreatus* mushroom. *Appl Sci* 12(17): 8563
47. Kocak Y, Okumus E, Meydan I, Seckin H, Bekmezci M, Sen F (2024) Role of *Trametes multicolor* in green nanotechnology based antioxidant, antimicrobial, lipid peroxidation inhibition from fungi to nanoparticles. *Int J Environ Sci Technol* 1-10
48. Philip D (2009) Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract. *Spectrosc Acta Pt A-Molec Biomolec Spectr* 73(2): 374-381

Mechanisms of nanoparticle biosynthesis by fungi

Małgorzata Jakubiak, Monika Asztemborska✉

University of Warsaw Faculty of Biology, Warsaw, Poland

✉corresponding author: m.asztemborska@uw.edu.pl

Keywords: biosynthesis, fungi, mycosynthesis, nanoparticles, nanotechnology

ABSTRACT

In the 21st century, nanomaterials play an increasingly important role, being used in many sectors, including: agriculture, medicine, chemical, textile, electronics and energy industries. Traditional nanoparticle (NP) synthesis methods rely on chemicals, leading to toxicity and high energy use. Green biological synthesis of NPs offers a safe, more sustainable alternative. The synthesis of NPs using fungi is an interesting, constantly developing field of research due to its simplicity, relatively low economic outlays and energy efficiency. Mycosynthesis eliminates the need for harmful chemicals. Moreover, fungi produce compounds that serve dual functions, acting as both reducing agents and stabilizers for NPs, allowing for stable, non-aggregating structures with enhanced biological activity. The variety of metabolites such as enzymes, polysaccharides, polypeptides, proteins and other macromolecules, have made fungi an excellent tool for nanoparticle synthesis. This paper reviews NP synthesis methods, with a particular focus on the use of fungi in the process.

BIOSYNTETYZA NANOCZĄSTEK PRZEZ GRZYBY

