

ОТЧЕТ

**За изпълнение на заложените изследвания през ЕТАП 1 по проект
„Разработване на нови биологични наночастици от слюзта на
градински охлюв *Cornu aspersum* като антимикробни агенти”, №:
КП-06-Н61/8 от 15.12.2022 г.**

ФИНАНСИРАНЕ НА ФУНДАМЕНТАЛНИ НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ – 2022

Базова организация:

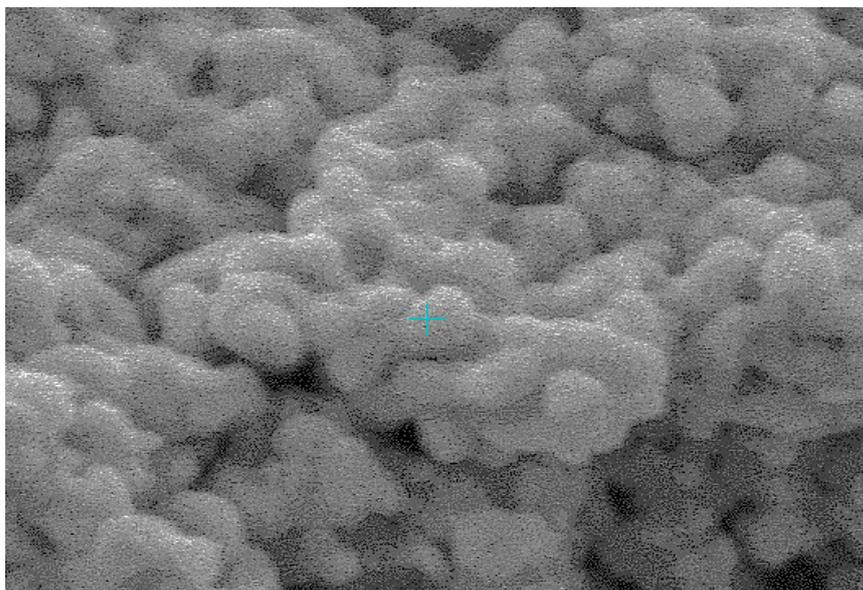
ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ - БАН

Партньорски организации:

СОФИЙСКИЯ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ", БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

Ръководител на научния колектив:

доц. д-р Александър Долашки



2024 г. София

РАБОТЕН ПАКЕТ 1: ИЗОЛИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ФРАКЦИИ ОТ СЛУЗТА НА ГРАДИНСКИ ОХЛЮВИ *C. aspersum*

Широкото разпространение на бактериалните и гъбични инфекции, както и нарастващата резистентност на патогените към повечето използвани антибиотици е сериозно предизвикателство, което акцентира върху необходимостта от разработване на нови антимикробни средства. Всяка година приблизително 37 000 пациенти умират само в ЕС в резултат на инфекции, устойчиви на антибиотици. През април 2014 г. Световната здравна организация обявява началото на “пост-антибиотична ера”, като посочва антимикробна резистентност, като сериозна опасност и приоритет за общественото здраве.

Природните съединения имат голям потенциал за използване в нови антимикробни лекарства, тъй като някои от тях притежават изразена цитотоксичност към редица патогенни бактерии и гъбички.

От друга страна, наночастиците (НЧ-ци) заемат все по-важно място в медицинските терапии, тъй като повишават ефикасността на лекарствата чрез тяхното правилно насочване и разпределение в тъканите. Подходящ източник за «зелен синтез» на биогенни НЧ-ци е слузта от градински охлюви от вида *Cornu aspersum*, която е богата на биоактивни вещества с потенциални приложения в профилактиката и/или лечението на някои човешки заболявания.

ДЕЙНОСТ 1.1. Получаване на фракции от слузта на градински охлюв *C. aspersum*:

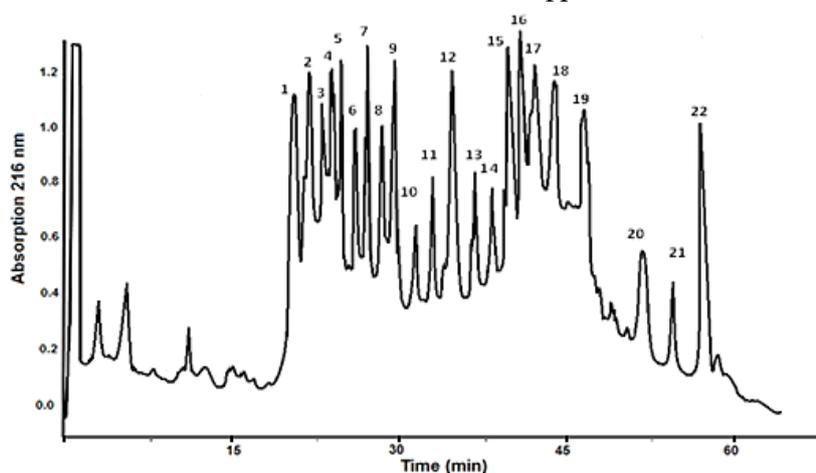
*1.1.1. Изолране чрез ултрафилтрация на три фракции от слузта на градински охлюв *C. aspersum*: фракция 1 (с МТ под 10 кДа); фракция 2 (с МТ между 10 и 50 кДа) и фракция 3 (с МТ над 50 кДа)*

След прилагане на няколко съпки на пречистване е получен екстракт от слузта на градински охлюви *C. aspersum*, който се разделя на различни фракции, посредством ултрафилтрация на Milipore филтри, с размер на порите от 10 и 50 kDa. В резултат са получени три основни фракции: Фракция 1 (съдържа активни вещества с молекулни маси под 10 kDa), Фракция 2 (съдържа активни вещества с МТ между 10-50 kDa) и Фракция 3 (съдържа активни вещества с МТ над 50 kDa).

ДЕЙНОСТ 2.1. Определяне на състава на Фракция 1 чрез съвременни методи и техники: ултравиолетова и флуоресцентна спектроскопия; елементен анализ; масспектрометричен анализ с UPLC-Q-ToF; газова хроматография; HPLC и др.

1.2.1. Изолране на пептиди и нискомолекулни метаболити чрез ултрафилтрация и йонообменна или обратнофазова високо ефективна течна хроматография

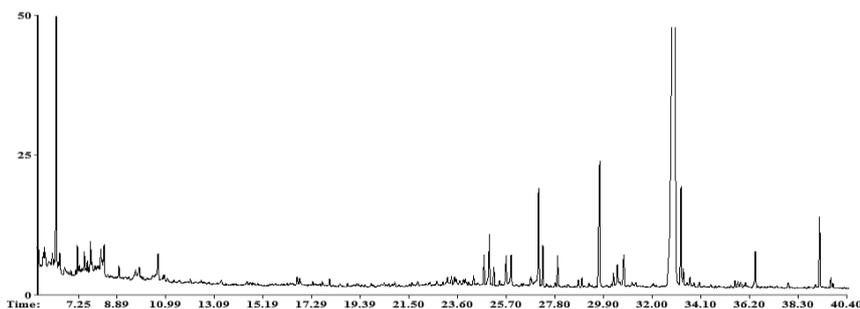
След пречистване на слузта чрез RP-HPLC на колона BioSil C18 HL 90-10, молекулните маси на биоактивните съединения във фракцията с МТ<20 kDa (Фигура 1) са идентифицирани чрез масспектрометричен анализ.



Фигура 1. Пречистване на фракция с МТ<20 kDa от слузта на колона BioSill C18 HL 90-10 (250 mm x 10 mm) чрез RP-HPLC и градиент вода-ацетонитрил (с 0.1% TFA) за 70 min при скорост на потока 1.0 ml/min.

1.2.2. Идентифициране на нискомолекулни метаболити чрез газова хроматография

Някои нискомолекулни летливи метаболити са определени чрез газова хроматография и маспектрометрия. Открити са редица метаболити чрез газова хроматография от GC-FID, потвърдени от GC-MS анализ. По-важните метаболити са представени на Фигура 2 и Таблица 1.



Фигура 2. GC-MS хроматограма на слуз от охлюв *C. aspersum*.

Таблица 1. Идентифицирани вторични метаболити в слузта на *C. Aspersum*.

Пик #	Време (RT)	Съединение	Площ, %
1	8.113	Cystathionine-diTMS	0,64
2	9.900	Urea, N,N'-bis(trimethylsilyl)-	0,17
3	16.54	L-Proline, 5-oxo-1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	0,22
4	17,25	L-Leucine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	
5	26.39	2,3,4-Trihydroxybutyric acid tetraTMS	0,27
6	27.00	D-Gluconic acid, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	2.52
7	27.92	Oleic Acid	1.01
8	28.84	D-Galactofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl) phosphate	0,25
9	29,76	D-Glucose, 6-O- α -D-galactopyranosyl-, bis-O-(trimethylsilyl) deriv., cyclic tris(methylboronate)	4.30
11	39,72	Squalene	0,28
11	46.76	D-Glucose, 6-O- α -D-galactopyranosyl-, bis-O-(trimethylsilyl) deriv., cyclic tris(methylboronate)	0,24

1.2.3. Анализ на елементите в екстракта от слуз от охлюв чрез маспектрометричен анализ с индуктивно свързана плазма (ICP-MS) и елементарен анализ (C, H, N, S).

Базираните на ICP аналитични експерименти от 2 независими измервания са обичайни за анализ на следи от елементи в широк диапазон. Резултатите от проведените анализи чрез маспектро-метричен анализ (ICP-MS) и елементарен анализ (C, H, N, S) са представени в Таблица..2.

Таблица 2. Елементи и микроелементи, определени в слузта под 10 кДа.

Макроелементи (mg/L)		Микроелементи (mg/kg lyophilisate)			
Елемент	Маса	Елемент	Маса	Елемент	Маса
Na	32,65803±	Cu	147,49042± 1.115	Sr	<LOD
Ca	74,66464± 0.12	Zn	143,43955± 0.021	Hg	<LOD
K	459,37224± 0.39	B	14,97028± 0.022	Tl	<LOD
Mg	10,47012± 0.04	Mo	9,94421± 0.025	Cd	<LOD
P	1,92704± 0.01	Mn	18,13827± 0.002	Sb	<LOD
S	10,34835± 0.02	Ag	0,037±0.001	Pd	<LOD
Si	3,50191± 0.01	Au	0,10397±0.001	Cr	44,17647± 0.004
Fe	3,50191± 0.01	Co	0,56083±0.001	Ni	<LOD
		Se	8,58116± 0.002	Pb	7,35892±0.001

В литературата има достатъчно доказателства, които показват ефекта на минералните елементи като манган, цинк и мед, участващи в тъканни, клетъчни и субклетъчни функции, мускулни контракции, регулиране на мембрания потенциал, митохондриална активност и ензимни реакции и др. Антиоксидантната активност се приписва на минерални компоненти като мед, манган и желязо. Елементите цинк, селен и магнезий играят ключова роля в превенцията и намаляването на пероксидативното увреждане. Желязото има жизненоважна роля в производството на колаген.

Аминокиселинно съдържание на слузта от градински ихлюв *C. aspersum*

Аминокиселините действат като ефективни редуциращи агенти за синтезиране на биогенни. Аминокиселинните профили на фракция с МТ<10 kDa и високомолекулна фракция с МТ>50 kDa от слузта на *C. aspersum* са получени след анализ с аминокиселинен секвенатор, като резултатите са показани в Таблица 3.

Таблица 3. Съдържание на аминокиселини [mg/g] във фракция с МТ<10 kDa и високомолекулна фракция с МТ>50 kDa, получени от слузта на *C. aspersum*.

Amino Acid	Mucus with Mw<10 kDa		Mucus with Mw>50 kDa		
	MW -H ₂ O				
Asp	0.812 µg/mg	Val	0.730 µg/mg	59.249 µg/mg	3.977 µg/mg
Thr	0.273 µg/mg	Met	0.000 µg/mg	29.913 µg/mg	26.467 µg/mg
Ser	0.363 µg/mg	Ile e	0.220 µg/mg	23.054 µg/mg	45.763 µg/mg
Glu	1.189 µg/mg	Leu	3.801 µg/mg	54.586 µg/mg	28.245 µg/mg
Pro	0.248 µg/mg	Tyr	0.064 µg/mg	22.906 µg/mg	31.823 µg/mg
Gly	3.878 µg/mg	Phe	0.268 µg/mg	25.967 µg/mg	21.553 µg/mg
Ala	0.378 µg/mg	His	0.756 µg/mg	25.144 µg/mg	26.855 µg/mg
Cys(O ₃ H)+Cys+Cys		Lys	0.409 µg/mg	8.048 µg/mg	1.900 µg/mg
2	0.174 µg/mg	Trp	0.091 µg/mg	33.003 µg/mg	30.383 µg/mg
Arg	0.592 µg/mg				
		Sum:	14.092 µg/mg		498.836 µg/mg

В състава на фракцията с МТ <10 кДа доминират Gly (5.103 µg/mg) и Leu (4.407 µg/mg), последвани от Glu (1.355 µg/mg). Определените стойности на останалите аминокиселинни остатъци са под 1 µg/mg, като най-ниско е съдържанието на Tyr (0.064 µg/mg) и Trp (0.098 µg/mg), а Met не е установен (0.000 µg/mg). Значителна разлика между двете фракции е установена в общото съдържание на аминокиселини - във висомолекулната протеинова фракция с МТ>50 кДа - 581.342 µg/mg, докато за фракцията с МТ под 10 кДа - само 16.936 µg/mg.

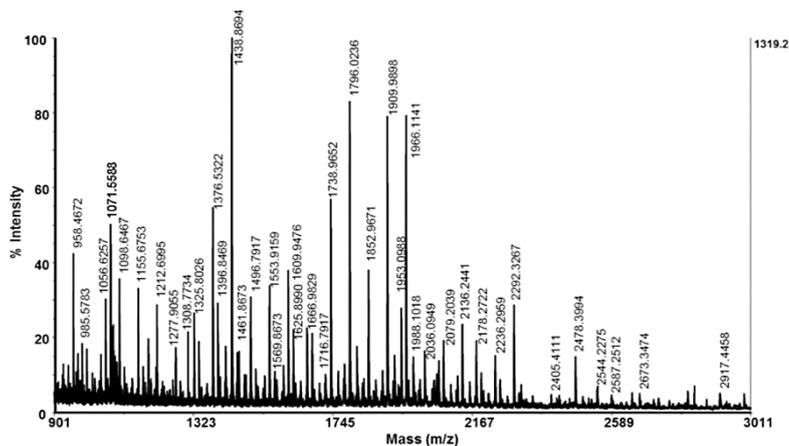
1.2.4. Идентифициране на биокомпоненти чрез:

Определяне на молекулната маса чрез маспектрометричен анализ

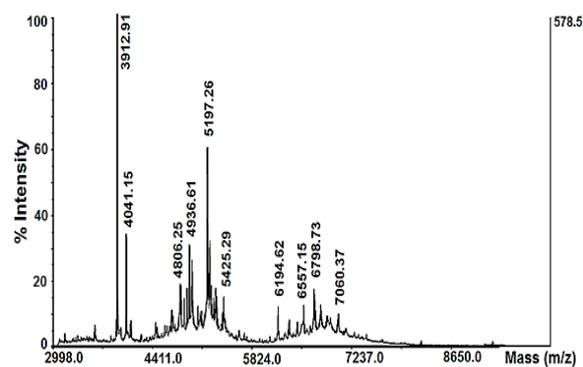
Молекулните маси на пептидите са измерени чрез MALDI-TOF-MS в положителен режим на йонизация, при дължина на вълната на лазара 355 nm. Задълбочена характеристика на фракция с МТ < 20 kDa е представена чрез MADI-TOF-MS анализ в диапазона до 3 kDa, диапазон 3-10 kDa и диапазон между 3 -20 kDa. MS-спектърът, представен на фигура 3, показва, че фракцията с МТ <3 kDa съдържа различни пептиди с различни МТ в района между 900–3011 Da.

Задълбочена характеристика на фракция с МТ<20 kDa е постигнато чрез маспектрометрични анализи в диапазон между 3 и 20 kDa. MS-спектърът, представен на Фигура 4, показва, че фракция с МТ <20 kDa съдържа различни протеини с маси в областта между 20 кДа и 100 кДа.

Пептиди и полипептиди с по-високи МТ във фракцията с МТ<20 kDa са представени на MS спектъра (Фигура 4), като молекулни протонирани йони [M + H]⁺ при m/z 3912,91 Da, 4041,15 Da, 5197,26 Da, 6194,62 Da, както и други йони с по-нисък интензитет.



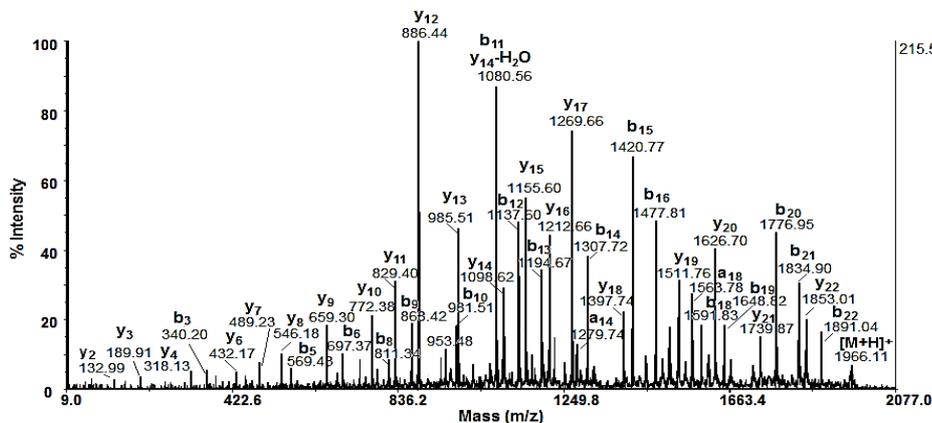
Фигура 3. MALDI-ToF-MS на фракция с $MT < 3kDa$



Фигура 4. MALDI-ToF-MS на фракция с $MT < 20$

Определяне на първичната структура на пептиди и нискомолекулни метаболити чрез тандем маспектrometerичен анализ (MS/MS).

Аминокиселинните последователности (АКП) на нискомолекулни пептиди с $MT < 3 kDa$ са идентифицирани чрез *de novo* секвениране на молекулни $[M+H]^+$ йони. След проследяване на фрагментните b- и y- йони в MS/MS спектър на пептид m/z 1966.11 $[M+H]^+$, аминокиселинната последователност LLLDNKGG-GLVGLLGGGGKGGG е определена (Фигура 5).



Фигура 5. MALDI-MS/MS спектър на пептид $[M+H]^+$ при m/z 1966.11 определена чрез *de novo* секвениране.

Идентифицираните АКП на пептидите са потвърдени и след анализ на MSMS-спектрите чрез програмата PEAK Studio.

Таблица 4. Първични структури на пептиди с $MT < 3 kDa$, в слuzта от градински охлюв *C. aspersum*, идентифицирани чрез *de novo* секвениране (MALDI-MS/MS експеримент).

No	Amino Acid Sequence of Peptides	$[M+H]^+$ Da	Net Charge	Antibacterial (%)	Antiviral (%)	Antifungal (%)
1	LLPFKEPDL	1071.60	-2/+1	28	51	19
2	ACGATLQLENCG	1179.77	-1/0	29.3	35.7	43.7
3	LNLGGNGANGLVGG	1212.76	0/0	74.0	43.1	74.3
4	AGVGGAAGNPSTYVG	1277.70	0/0	25.1	7.4	11.3
5	GGGMVKEDGSLGV	1308.77	-2/+1	40.4	31.4	33.7
6 ^a	MLGGGVNSLRPPK	1325.80	0/+2	22.8	14.0	8.9
7	CVGGAGGHGDSACKGT	1376.53	-1/+1	85.2	48.8	74.4
8	GGGGYHTWEGEGKF	1409.48	-1/+1	69.0	62.8	72.6
9	MLNVAVNKGEVKH	1438.86	-1/+2	56.4	38.0	19.7
10 ^b	NLVGGSGGGGRGGANPLG	1496.79	0/+1	66.0	33.7	48.2
11	GTMSPAGGEMGPVTAGVG	1576.04	-1/0	13.1	24.8	8.3

12	GTKGCGPGSCPPGDTVAGVG	1716.79	-1/+1	23.8	20.2	25.8
13 ^c	ACSLLLGGGGVGGGKGGGGHAG	1738.96	0/+1	82.6	49.5	67.0
14 ^a	LLLDGFGGGLLVEHDPGS	1796.00	-3/0	37	45	10
15 ^d	MGGWGGLGGGHNGGWMPPK	1852.96	0/+1	69	56.0	57.0
16 ^c	ACLTPVDHFFAGMPCGGGP	1876.88	-1/0	32.4	42.6	20.1
17 ^c	NGLFGGLGGGGHGGGKPGEGGG	1909.98	-1/+1	89.5	67.2	79.5
18	LLLDNKGGLVGGLLGGGGKGGG	1966.11	-1/+2	93	56	81
19	GMVLLHCSPALDFHKTPAV	2036.09	-1/+1	18	53	14
20	LPFLLGVGGLLGGSVGGGGGGGAPL	2136.24	0/0	66	33	36
21	MVLDGKGGGGLLGGVLLGGGKDAHLGG	2292.32	-2/+2	84.3	59.0	71
22	LLKDNGVGGLLGGGGAGGGGLVGGNLGGGAG	2478.39	-1/+1	86.4	54	66
23	KTSKLMVYLAGGGGGLLGGVGGGGGGAGGGPGGL	2843.76	0/+2	76	47	67

Получените резултати предоставят фундаментална информация за биоактивни пептиди от слюзта на *C. aspersum* и техните характеристики и потенциални биомедицински приложения.

ДЕЙНОСТ 1.3. Идентификация на активните компоненти във Фракция 2 (с МТ между 10-50 кДа) Фракция 3 (МТ>50 кДа) чрез: 1Д-ПАГЕ, FPLC хроматография, УВ- и флуоресцентна спектроскопия.

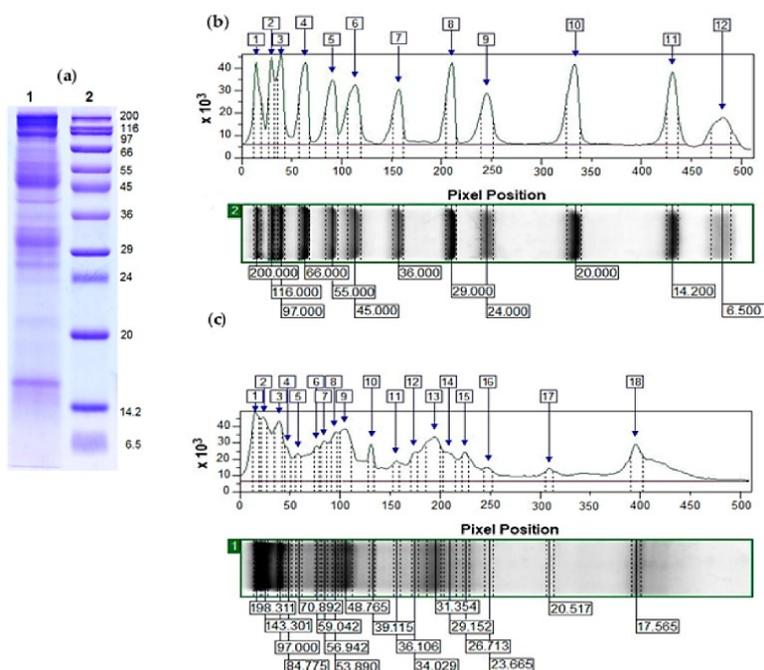
Слюзта на охлюви *C. aspersum* е главно смес от протеини, гликопротеини, киселини и др. Протеините във фракцията с MW > 20 kDa са определени чрез протеомен анализ на 1D-полиакриламидна гел електрофореза (1D-ПАГЕ), маспектрометрия и биоинформатика.

1.3.1. Електрофоретични анализи на фракция с MW > 20 kDa чрез 1Д- и 2Д-ПАГЕ.

Идентифициране и количествено определяне на протеините в пробата е постигнато чрез анализ на електрофоретичните изображения чрез софтуера програми: ImageQuant™ TL v8.2

1Д-ПАГЕ и анализ на електрофоретичното изображение чрез софтуера ImageQuant™ TL v8.2.

Електрофоретичният профил на екстракт от слюзта с МТ > 20 kDa, която включва протеините от Фракция 2 (с МТ между 10-50 кДа) и Фракция 3 (с МТ >50 кДа), е определен чрез 12% 1Д-ПАГЕ. Получените резултати, представени на Фигура 6а, ясно показват протеиновия профил на изследваната фракция, който се характеризира с наличието на редица протеини с МТ предимно в областта между 20 и 200 kDa (Фигура 6а). Най-висока експресия се наблюдава за протеините с МТ от 17.6 kDa, 26.71 kDa, 29–32 kDa, 39.115 kDa, между 48 и 60 kDa, 97.0 kDa и над 100 kDa (Фигура 6 а). Протеини с МТ 20.5 kDa, 23.6 kDa, 29.1 kDa, 35.93 kDa, 70.89 kDa и 84.77 kDa също присъстват в състава на фракцията с МТ>20 kDa, но с по-ниска експресия.



Фигура 6. Анализ на МТ и протеинов интензитет на 12% 1Д-ПАГЕ, чрез софтуер ImageQuant™ TL v8.2.0. (а) Електрофоретичен анализ: 1) стандартен протеинов маркер с МТ 200 – 6.5 kDa; 2) фракция от слюзта на *C. aspersum* с МТ>20 kDa. (б) Електрофоретичен профил на стандартен протеинов молекулен маркер (пътка 2), анализиран с ImageQuant™ TL. (с) Анализ на електрофоретичния профил на фракцията от слюзта на *C. aspersum* с МТ > 20 kDa (1) с ImageQuant™ TL.

Идентифициране на биоактивни съединения в слуз с $MT > 20$ kDa от охлюви *C. aspersum*

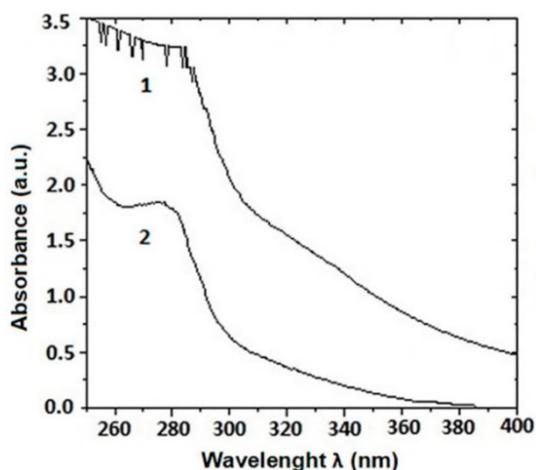
Протеините във фракцията с $MT > 20$ kDa са сравнени с базата данни UniProt (<https://www.uniprot.org>) за протеини в мекотели и коремоноги, както и на публикувани данни за протеини в слузта на охлюви с MT , съответстващи резултатите от електрофоретичния анализ (Фигура 5 с). Въз основа на проведеното търсене е изградена хипотезата, че протеинът, представен при 17 565 kDa, съответства добре на антимикробен протеин на слузта [*C. aspersum*, QEG59314], открит при 17.5 kDa в изследванията на Pitt et al., 2019. Протеините, определени в диапазона 20-31 kDa най-вероятно принадлежат към семействата на глутатион пероксидаза (GPx) и глутатион трансферази (GST), тъй като няколко проучвания са потвърдили антиоксидантните свойства, включително глутатион трансферазна активност на слузта на *C. aspersum*. Протеините с MT между 30 и 40 kDa са в добро съответствие с идентифицираните протеини в изследванията на Pitt et al., 2019, което предполага, че някои от тях са лектини и също са свързани с антимикробните свойства на слузта.

Протеините, експресирани между 48 и 59 kDa, вероятно съответстват на функционални единици или полипептиди на N-гликозилиран хемоцианин от *C. aspersum*, резултат от протеолитични процеси. Протеинът при 84–85 kDa вероятно е епифрагмин, идентифициран в адхезивната служна секреция на сухоземните охлюви - *H. aspersa*, *H. pomatia* и *Cerņuella virgata*. Електрофоретичният анализ показва също протеини с MT над 100 kDa, които най-вероятно представляват различни видове муцини, протеоглигани и колаген.

Тази хипотеза е доказана чрез идентифициране на протеините чрез протеомен анализ, включващ маспектрометрия (MS- и MS/MS експерименти) и биоинформатика. По този начин е установена висока хомология с редица протеини и гликопротеини, като NADH дехидрогеназна субединица 6 [от *Albinaria caerulea*]; глутатион S-трансфераза омега-1 [от *P. canaliculata*]; H-тип лектини, включително аглутинин; протеин с антимикробна активност в слузта с MT от 39.115 kDa [QEG59312 от *C. aspersum*]; функционална единица β C-d на хемоцианин от *C. aspersum*; L-амино оксидазо подобен протеин (като Achacin от *L. fulica*); FMRFамид-активиран амилорид-чувствителен натриев канал; zinc finger protein; еластин-подобен протеин; няколко вида колаген (колаген алфа-1, колаген α -4 и колаген алфа-6) и муцини (муцин-5AC-, муцин-5B-, муцин-2- и муцин-17-подобни протеини).

1.3.3. Структурно определяне и характеризирание на протеини от Фракция 22 (с MT 10-50 kDa) и Фракция 3 (с $MT > 50$ kDa) чрез UV-Vis и флуоресцентна спектроскопия и маспектрометрия

Посредством UV-Vis спектроскопия е анализиран нативен екстракт от слуз, събрана от охлюви *C. aspersum*, отглеждани в български екоферми, по патентована технология. След 24 h диализа и концентрация с 20 kDa мембрана, разтворът на слуз от охлюв се пречиства от добавки и се обогатява с протеини с MW по-високо от 20 kDa. Сравнителният анализ на UV спектрите на изходната слуз (Фигура 7) и получената фракция след диализа и мембранна концентрация потвърди чистотата на фракцията с преобладаващи протеини с $MT > 20$ kDa.



Фигура 7. UV-vis спектри на слуз от *C. aspersum*: 1) Суров екстракт от слузта на *C. aspersum* (нативна слуз); 2) Диализирана и концентрирана проба от слузта на *C. aspersum* с $MT > 20$ kDa.

Общата концентрация на протеин в пробата е определена въз основа на получения спектър чрез измерване на абсорбцията при 280 nm. След прилагане на метода на Брадфорд, който е по-чувствителен, е определена обща протеинова концентрация от 1,56 mg/mL в получената слуз от охлюв. UV-vis спектрите, представени на фигура 7 на слуз от охлюв преди и след диализа, потвърждават чистотата на пробата от примеси.

РАБОТЕН ПАКЕТ 2: РАЗРАБОТВАНЕ НА ЛАБОРАТОРЕН МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА БИОЛОГИЧНИ НАНОЧАСТИЦИ (БНЧ-ЦИ) ОТ СЛУЗТА НА ОХЛЮВ *C. aspersum*

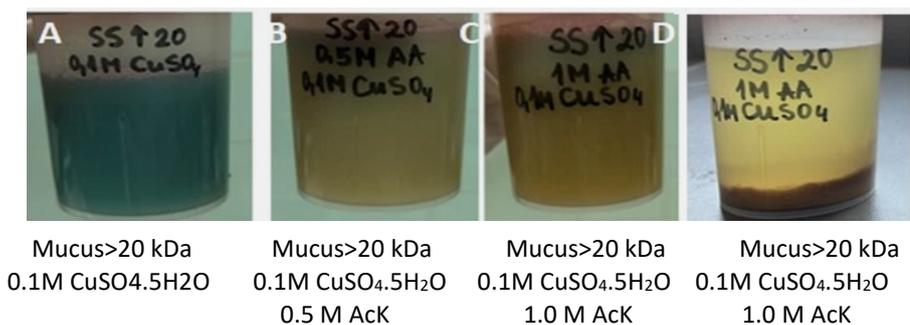
Биогеният синтез на CuОНЧ-ци проведен с прекурсор на Cu^{2+} йони в матрица от слузта с МТ > 20 kDa, обединяваща протеини и ензими, включени във фракциите с МТ между 10-50 kDa и с МТ над 50 kDa. При синтеза са използвани различни прекурсори на медни йони, като CuCl_2 , CuNO_3 и CuSO_4 . Първата индикация за протекъл синтез на биогенни наночастици е промяната на цвета на реакционната смес поради протичащите редукционни процеси. Следенето на този ключов параметър при проведените експерименти показва, че $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ е най-подходящият прекурсор за получаване на CuONPs-Muc.

Пречистена чрез диализа и концентрирана фракция от слуз на *C. aspersum* е обогатена на протеини с МТ > 20 kDa чрез ултрафилтрация, лиофилизирана и използвана като матрица за зеления синтез на CuONPs-Muc с прекурсор на медни йони $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Синтезът на CuONPs-Muc зависи от различни фактори, като концентрацията на изходната слузна проба и на медните йони. CuONPs-Muc са получени след смесване на 50 mL слуз от Фракция с МТ > 20 kDa с 50 mL 0.1 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, добавен постепенно при непрекъснато разбъркване при стайна температура (около 25°C).

Продължителността на синтеза на наночастици също е важен параметър. Синтезът на CuONPs-Muc, проследен в продължение на 5 дни, показва промяна на цвета на разтвора на реакционната смес от светло син до кафяв, което показва, че образуването на CuONPs-Muc е започнало на 24-ия час след смесването, като интензитета на цвета не се променя видимо след 3-ия ден.

След центрофугиране при 4000 rpm и 12 000 rpm за 10 минути и отстраняване на излишните продукти, последвано от трикратно промиване с вода и ацетон и сушене при 70°C за 12 часа, са получени CuO-MucNPs.

Основното предимство на метода на зелен синтез на CuONPs-Muc, медиирани от фракция от слузта с МТ > 20 kDa в присъствие на аскорбинова киселина (АсК) значително намалява времето за синтез от 3 дни на 4 часа, което е потвърдено от абсорбционните спектри, чрез наблюдение на характерния пик за CuONPs-Muc при 560 nm, най-изразен за реакционната смес с 1.0 M АсК.



Фигура 8. Синтез на CuONPs-Muc при различни концентрации на АсК: А) 0 M АсК; В) 0.5M АсК; С и D) 1.0 M АсК.

Синтезираните CuO-MucNPs в присъствие на АсК са характеризирани чрез UV-Vis и флуоресцентна спектроскопия, SEM/EDS, FTIR, термогравиметричен анализ (TG-DSC).

Биогенен синтез на ZnНЧ от Фракция с МТ>20 kDa, с протеините от Фракция 2 и 3

След пречистване на изходната слуз чрез диализа и концентрация чрез ултрафилтрация на мембрана с размер на порите 20 kDa, фракцията от слузта на *C. aspersum* с МТ > 20 kDa е използвана като матрица за получаване на биогенни наночастици ZnNPs-Muc с прекурсор на Zn^{2+} йони $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Към реакционната смес, включваща слузта от *C. aspersum* с МТ > 20 kDa и 0.1 M разтвор на $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в съотношение 1:1, е прибавен 0.5 M разтвор на АсК, което доведе до намаляване на рН от 6.5 до 2.0. Продължителността на синтеза е 72 ч., при умерено рабъркване. Образуването на ZnONPs-Muc в реакционната смес е проследено чрез UV-Vis спектроскопия. Появата и нарастването на абсорбционния пик при 358 nm, потвърждава образуването на ZnONPs-Muc. Получените резултати са в добро съответствие с абсорбционния максимум при 348 nm,

наблюдаван за ZnONPs получени чрез химичен синтез. Биосинтезираните НЧ-ци са центрофугирани 12 000 rpm. Получената утайка е промита 3 пъти с д H₂O и е изсушени при 25°C.

Търсенето на оптимални условия за получаване на ZnONPs-Мус доведе до провеждане на втори синтез, при който за разлика от първия, реакционната смес от слюзта от *C. aspersum* с MT > 20 kDa и 0.1 M разтвор на ZnSO₄·7H₂O в съотношение 1:1, е титрувана с 0.5 M разтвор на АсК до рН 5. Продължителността на синтеза е 4 часа при 25°C. Биосинтезираните НЧ-ци са утаени чрез центрофугиране при 12 000 rpm, промити 3 пъти с д H₂O и са изсушени при 40°C.

Биогенен синтез на AgНЧ в матрица от слюзта на *C. aspersum* с MT >20 kDa

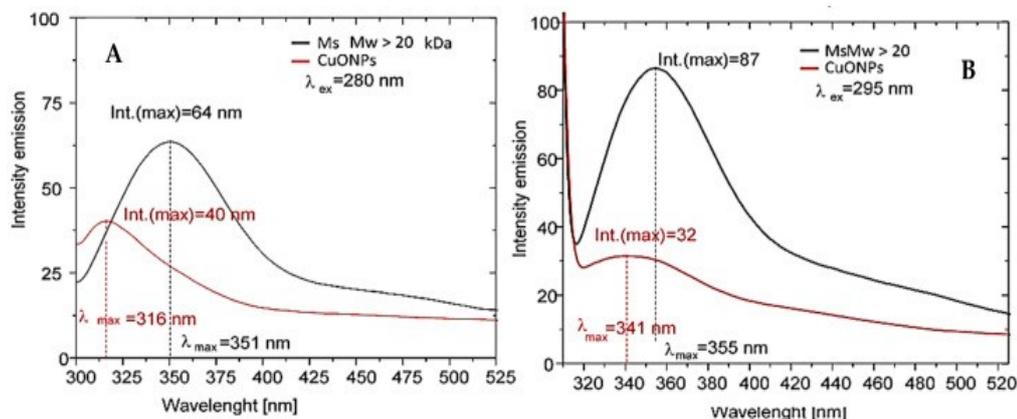
Биогенните AgНЧ-ци са получени чрез зелен синтез в матрица от слюзта на *C. aspersum* с MT > 20 kDa с прекурсор на Ag⁺ йони AgNO₃ при различни условия: вариране на съотношението между реагентите, температурата и рН на средата. Най-обещаващи резултати са получени чрез метод 1, при който към хомогенизиран разтвор на лиофилизирана слюз с MT >20 с концентрация 0.05 мг/мл в съотношение 1:1 се прибвя 50 mM AgNO₃ при непрекъснато разбъркване на тъмно. След 30 мин., към реакционната смес се добавя 250 mM аскорбинова киселина (АсК) в съотношение 1:1 и рН 1,5. След смесването, реакционната смес се излага на слъчева светлина за 15 мин. Целият процес продължава ~ 1 час. При вторият метод, 30 мин. след смесването на основните компоненти - фракцията от слюзта с MT > 20 kDa и AgNO₃, е проведено титруване на реакционната смес с 250 mM АсК до рН 3.5, а при третият метод синтезът е протекъл без използване на АсК, като допълнителен редуциращ агент. Процесът на редукция на Ag⁺ йони до AgO се наблюдава визуално и при трите метода чрез промяна на първоначалния цвят на реакционната смес от безцветен до наситено кафяво. Биосинтезираните AgНЧ-ци и при трите метода се пречистват чрез кратко центрофугиране при 4000 rpm за отстраняване на грубите частици. Получените натанти са центрофугирани още веднъж при 12 000 rpm. Получените утайките (и по трите метода) са промити 3 пъти с д H₂O са и са изсушени при 25°C, а супернатантите са лиофилизирани. Записаните UV-Vis спектри на реакцията смес (и при трите метода) показват характерен абсорбционен пик с максимум между 420-430 nm, който доказва образуването на Ag-НЧ-ци. Образованите биогенни AgNPs-Мус са характеризирани чрез сканираща електронна микроскопия, комбинирана с енергийно-дисперсионна спектроскопия (SEM/EDS).

РАБОТЕН ПАКЕТ 3: ИДЕНТИФИЦИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА СТРУКТУРАТА НА СИНТЕЗИРАНИТЕ БИОНАНОЧАСТИЦИ CuНЧ-ци, ZnНЧ-ци и AgНЧ-ци.

Характеризиране на CuONPs-Мус получени в матрица от Фракция от слюзта с MT > 20 kDa при 25°C и рН 7 чрез UV-Vis и флуоресцентна спектроскопия

Ефектът на реакционното време върху образуването на CuONPs-Мус е последван от записване на UV-vis спектри в различни времена на инкубация на реакционната смес от слюзна фракция с MW > 20 kDa и меден сулфат. Записаните абсорбционни UV-Vis спектри след 60 минути, 3 часа, 6 часа, 24 часа, 2 дни и 3 дни потвърдиха образуването на CuONPs-Мус след 3 дни инкубация чрез най-изразения максимум при 456 nm.

Образуването на CuONPs-Мус е изследвано с помощта на изключително чувствителния метод - флуоресцентна спектроскопия. Флуоресцентните емисии на аминокиселинни остатъци Trp, Tyr и Phe на протеина са индикатори за промените във физичните и химичните свойства на средата, в която се намира флуорофорът в реализираната конформация. Те отразяват промените, които се случват както в обкръжението, така и вътре в самата протеинова молекула. Тези промени се изразяват във флуоресцентните спектри с изместване на максимума и интензитета на излъчване. Анализът на емисионните спектри на първоначалната проба с MW > 20 kDa и след синтез на CuONP-Мус е извършен при възбуждане при 280 nm и 295 nm.

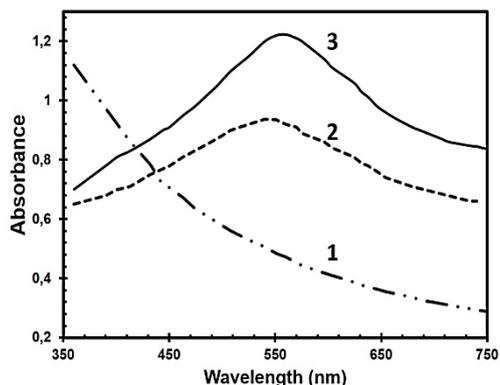


Фигура 9. Сравнителен анализ на емисионните спектри на А) фракция с МТ>20 kDa (използвана в зеления синтез) при λ_{ex} 280 nm и CuONPs-Muc ($A_{280}=0.1$ в 0.1 M Tris буфер, pH 8); Б) при λ_{ex} 295 nm

На Фигура 9А са показани емисионните спектри на фракция от слюзта с МТ>20kDa, преди зеления синтез и след получаване на CuONPs-Muc, при λ_{ex} 280 nm, което отразява промяна в интензитета и позицията на максималния интензитет на флуоресценция (λ_{max}), съответно от 351 nm до 316 nm. Б) CuONPs-Muc, при λ_{ex} 295 nm.

Характеризиране на CuONP-Muc, получени в матрица от Фракция от слюзта с МТ> 20 kDa и аскорбинова киселина чрез UV-Vis и флуоресцентна спектроскопия (сравнителен анализ)

Ефектът на различните концентрации на АсК (0 M; 0,5 M и 1,0 M) върху образуването на CuONPs е проследено чрез UV-Vis анализ на пробите при 25 °C, с различни времена на инкубация (1 час и 4 часа) на реакционна смес от Фракция от слюзта с МТ> 20 kDa, аскорбинова киселина и меден сулфат. UV-Vis спектрите са записани в диапазона 350-750 nm, през равни интервали време от 1 час.



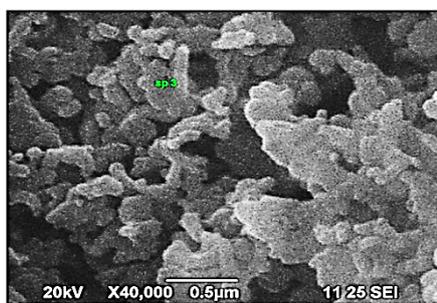
Фигура 10. UV-Vis спектри на синтезирани CuONPs след 4 часа инкубиране на фракция от слюзта с МТ>20 kDa и различни концентрации на АсК: 1) CuONPs-Muc; 2) CuONPs-Muc 0,5 M AsA и 3) CuONPs-Muc 1.0M AsA.

Показаните резултати на Фигура 10 потвърждават образуването на CuONP-Muc в матрица от Фракция от слюзта с МТ> 20 kDa и 1.0 M АсК след 4 часа инкубиране. Спектърът показва най-интензивен абсорбционен максимум при 560 nm, характерен за CuONPs в сравнение с останалите проби.

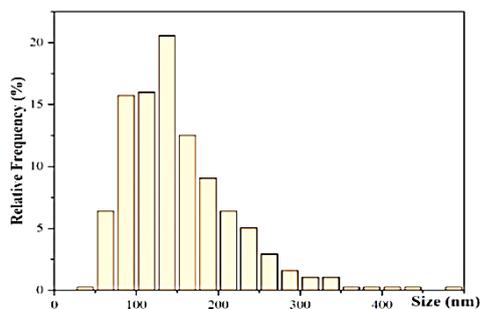
Образуването на CuONPs-Muc от фракцията на слюзта с MW>20 kDa без и в присъствието на АсК също е доказано чрез флуоресцентна спектроскопия. Известно е, че взаимодействията на аминокиселини като пролин, триптофан или тирозин с хидрофобни региони във вторичните структури на протеините участват в процесите на получаване на наночастиците. Агрегацията и фибрилизацията на протеини се изразява в промяна в интензитета или промяна във флуоресцентната емисия в резултат на взаимодействие с протеини. Такава промяна се наблюдава във флуоресцентните спектри преди и след образуването на CuONPs-Muc, което се свързва с промяна в конформацията и средата на Tr остатъци в образуваната корона в наночастиците.

Характеризиране на получените CuONPs-Muc в матрица от Фракция от слюзта с МТ> 20 kDa при 25°C и pH 7 чрез сканираща електронна микроскопия, комбинирана с енергийно-дисперсионна спектроскопия (SEM/EDS)

SEM-EDS анализът е аналитичен метод за характеризиране на наночастиците, чрез определяне на размера и основния им състав. Информацията, касаеща морфологията и формата на CuONPs, както и техния елементен състав и разпределение на размера е получена на база проведените анализи чрез SEM/EDS (Фигура 11).



(A)

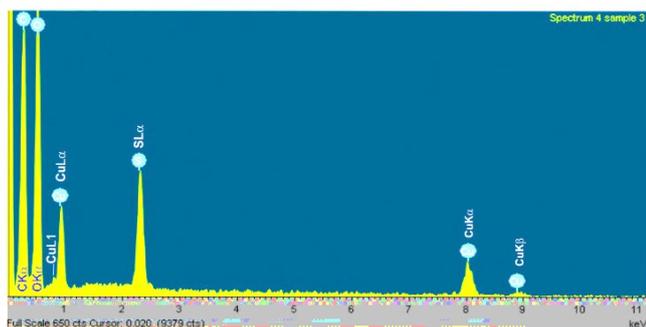


(B)

Фигура 11. (A) SEM изображения на CuONPs-Muc; (B) Разпределение по размер на CuONPs-Muc въз основа на SEM изображенията.

Резултатите показват, че формата на получените CuONPs-Muc е сферична; някои от тях са

агломерирани в по-едри структури, но независимо от това отделните частици могат да бъдат разграничени една от друга (Фигура 11 A). Получената оценка на общото разпределение по размер на наночастиците, ясно показва, че основните размери на CuONPs-Muc са в интервала между 75 и 200 nm (Фигура 11 B).



Фигура 12. EDX спектри на Cu/Cu₂ОНЧ-ци, получени от фракция от слюзта с МТ > 20 kDa.

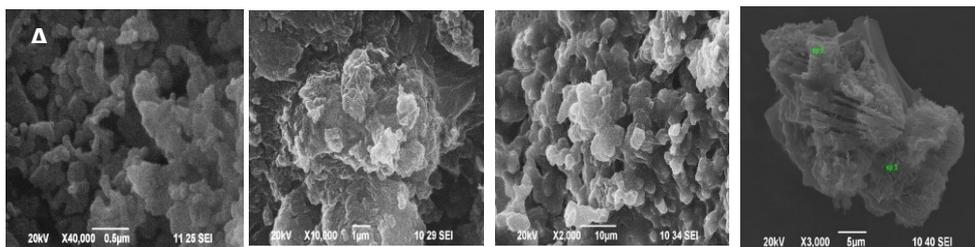
Друг анализ за характеризиране на биогенните НЧ-ци е EDX (Фигура 12), който показва шест пика, разположени между 0-9 keV. EDX спектърът на CuONPs-Muc в матрица от Фракция от слюзта с МТ > 20 kDa потвърди наличието на Cu, O, C и S.

Пикът при 0,27 keV съответства на енергията на свързване на въглерода (C). Пикът при 0.52 keV принадлежи на енергията на свързване на кислорода (O), докато пиковете, разположени при енергии на свързване от 0.80, 0.92, 8.03 и 8.90 keV, съответстват на Cu. Получените биогени CuONPs-Muc са отговорни за значителния пик при 0.92 keV, наблюдаван при EDX анализа на генерираните медни наночастици.

Характеризиране на получените CuONPs-Muc в матрица от Фракция от слюзта с МТ > 20 kDa и аскорбинова киселина чрез сканираща електронна микроскопия в комбинация с енергийно дисперсионна спектроскопия (SEM/EDS) - сравнителен анализ

Характеризирането на морфологията на CuONPs-Muc, получени в присъствие и отсъствие на АсК, е проведено въз основа на информацията, получена от сканираща електронна микроскопия, в комбинация с енергийно дисперсионна спектроскопия (SEM/EDS). Резултатите SEM показват само няколко сферични частици, синтезирани в присъствието на фракция от слюзта с МТ > 20 kDa, като редуциращ агент в рамките на 4 часа (Фигура 13A).

Най-добри резултати са постигнати след смесване на двата редуциращи агента: фракция от слюзта с МТ > 20 kDa и 1.0 М АсК (Фигура 13C). От друга страна разтворът на АсК сам по себе си не индуцира синтеза на CuONPs, както е показано на Фигура 13D. Добавянето на 0.5 М АсК към фракция от слюзта с МТ > 20 kDa също води до образуване на биогенни НЧ-ци но с по-ниска скорост и по-голяма хетерогенност (Фигура 13B).



Фигура 13. SEM изображения на CuONPs-Muc, получени чрез зелен синтез с CuSO₄.5H₂O:

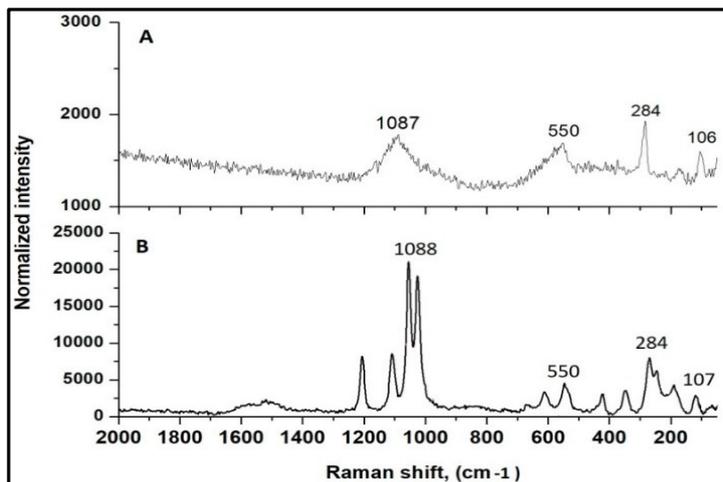
A) фракция от слюзта с МТ > 20 kDa; B) два редуциращи

агента: слюзта с МТ > 20 kDa и 0.5M АсК; C) слюзта с МТ > 20 kDa и 1.0 М АсК; и D) взаимодействие на CuSO₄.5H₂O само с 1.0M АсК.

Експерименталните данни от SEM анализа показват, че формата на получените биогенни CuONPs-Мус с различни редуциращи агенти е различна (Фигура 14). Тъй като SEM изображенията показват най-добре дефинирани отделни частици на Проба 1 (фракция от слюзта с МТ > 20 kDa) и Проба 3 (фракция от слюзта с МТ > 20 kDa и 1,0 М АсК), именно тяхното разпределение по размер е анализирано и показано със съответните хистограми.

Характеризиране на CuONPs-Мус получени в матрица от Фракция от слюзта с МТ > 20 kDa при 25°C и рН 7 чрез раманова спектроскопия и изображения

Както е показано на фигура 14, Раман спектрите за двете проби, чист CuO и CuONPs-Мус, медирани от слюзта с МТ > 20 kDa в присъствие на CuSO₄.5H₂O, са записани при дължина на вълната на лазера 532 nm.



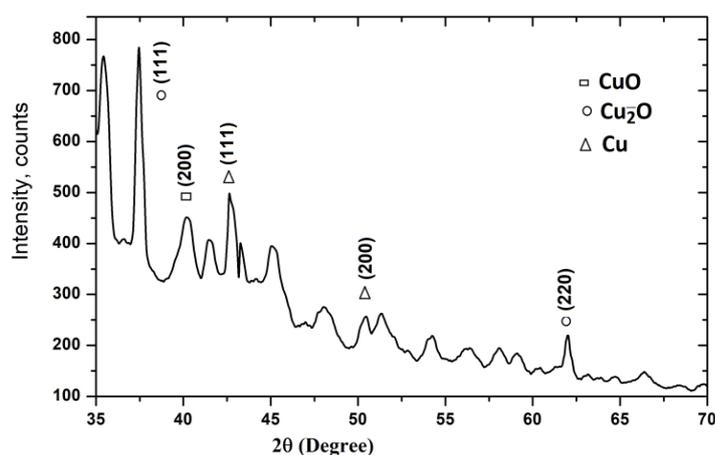
Фигура 14. Раман спектри, записани на Raman Microscope Senterra II (Bruker) при дължина на вълната на лазера 532 nm (A) чист CuO и (B) CuONPs-Мус от слюз с MW > 20 kDa с CuSO₄.

Наблюдават се характерните пикове за CuO при 107, 284 и 550 cm⁻¹ (Фигура 14A), както и пикове за валентните вибрации на SO връзката от (SO₄)²⁻ йона, при 1015, 1044 и 1098 cm⁻¹ (Фигура 14 B).

Представените резултати от Раман спектроскопия с пикове при 107, 284 и 550 cm⁻¹ потвърждават образуването на CuONPs-Мус.

Характеризиране на CuONPs-Мус чрез рентгенова дифракция (XRD)

Рентгеновата дифракция (XRD) е широко използван метод за анализ и оценка на кристалността и структурата на твърди проби.



Фигура 15. Рентгенов дифракционен (XRD) анализ на CuONPs -Мус с MW > 20 kDa и 1,0 М АсК.

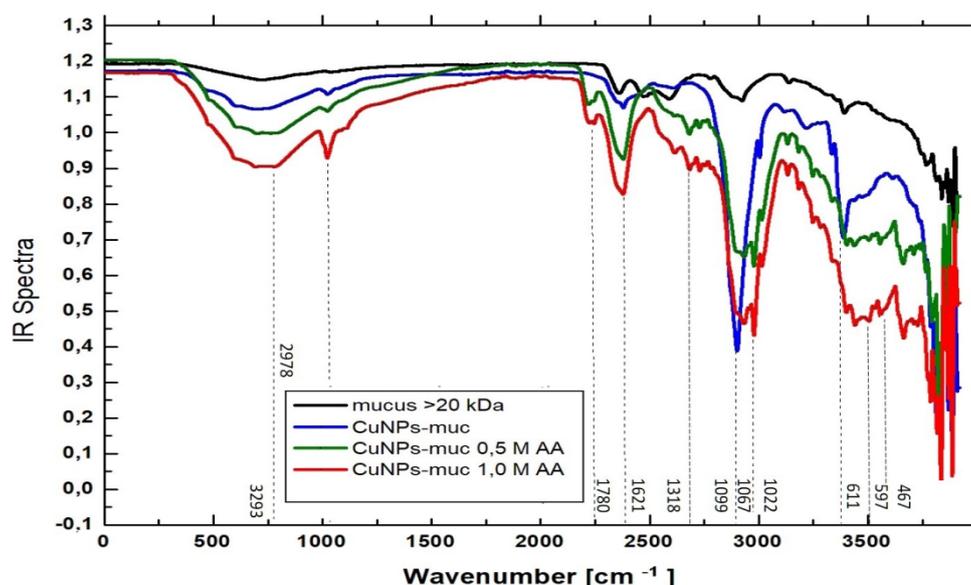
Синтезираните CuONPs-Мус са анализирани чрез XRD, който предоставя информация за кристалност и размер на биогенните наночастици, получени от фракция от слюзта с МТ > 20 kDa в присъствието на 1.0 М АсК, при рН 7. Наблюдават се четири различни дифракционни пика (Фигура 14) при 2θ =

37.46 (111), 42,6 1 (200) и 6 2.04 (220), които отразяват Cu₂O, както и един малък пик при 40.39, който се приписва на мелакоцитната фаза на CuO.

Характеризиране на CuONP в присъствие и отсъствие на аскорбинова киселина чрез инфрачервена спектроскопия с трансформация на Фурие (FTIR)

Характеризирането на образуваните CuONPs-Мус без и в присъствието на АсК е проведено чрез FT-IR. Записаните FT-IR спектри на изходната фракция от слюзта с МТ > 20 kDa и на получените биогенни медни наночастици, синтезирани с CuSO₄.5H₂O, в матрица съдържаща само слюз с МТ > 20 kDa, а също и в матрица включваща освен фракция с МТ > 20 kDa и 0.5 М или 1.0 М АсК (Фигура 16) показват, че протеините във фракцията с МТ > 20 kDa на слюзта участват в

синтеза на CuONPs-Muc. Сравнителният анализ на инфрачервените спектри на различните проби (представени на фигура 16) открива различни вибрационни ленти между 500 cm^{-1} и 4000 cm^{-1} , които отразяват промени във функционалните групи на първоначалната проба и след образуване на CuONPs-Muc при различни условия (Таблица 5). Два други пика за екстракта и наночастиците, наблюдавани при 1641 и 1530 cm^{-1} , са свързани с вибрации на разтягане на връзката C=O, което е типично за амидите (амид I и амид II). И двете ленти са много по-интензивни след диализа, отразявайки увеличаването на съдържанието на протеин в пробата. Абсорбцията при 1641 cm^{-1} , свързана с амид I, отразява вибрациите на разтягане на C=O връзката на амида, докато абсорбцията при 1530 cm^{-1} , свързана с амид II, се дължи главно на вибрациите на огъване на NH връзката.



Фигура 16. Инфрачервен спектър на слюз с МТ>20 kDa (черна линия) и образуваните CuONPs с редуциращи агенти на медни йони: слюз с МТ> 20 kDa (синя линия); слюз с МТ> 20 Da и 0,5 М АсК (зелена линия); С) слюз с МТ > 20 kDa и 1,0 М АсК (червена линия)

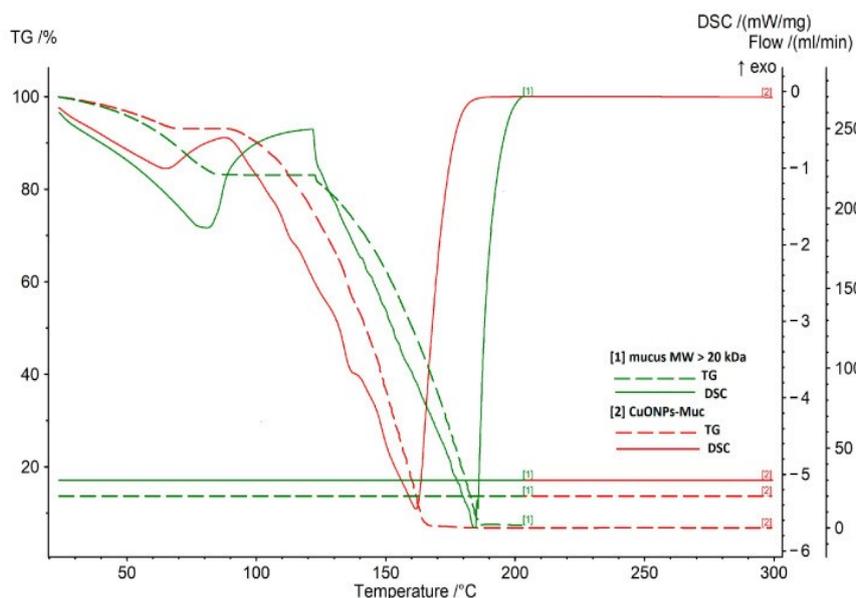
Таблица 5. FTIR характеристични пикове на фракция от слюзта на *C. aspersum* с МТ> 20 kDa и синтезираните CuONPs –Muc.

Вълново число [cm^{-1}]	Взаимодействие
467	Cu – O с разтягаща вибрация
597	връзката Cu(II)–O в CuO
611	разтягане на Cu(I)–O върху Cu ₂ O частици
1022	C – C вибрация при разтягане и O – H вибрация при огъване.
1067	връзката Cu(II)–O в CuO
1099	C – N и C–H разтягане
1318	C–H разтягане
1621	O – H огъване, NH връзка
1780 г	C=O връзка на CHO група амид I, амид II
2978	C – H разтягане
3293	O – H разтягане

Фигура 15 представя важните ленти на абсорбция в FTIR спектъра на изследвания нанокomпозит преди и след зеления синтез на наночастици Cu/Cu₂O в присъствието на два редуциращи агенти (фракция от слюзта с МТ > 20 kDa и различни концентрации на аскорбинова киселина) при 467 597, 611, 1022, 1067, 1099, 1318, 1621, 1780, 2978, 3293 cm^{-1} . Те отразяват Cu–O, C–C, C–H, C=O, O–H, Cu(II)–O и съответстват на представената вибрация на разтягане на CuO (Таблица 5).

Характеризиране на стабилността на CuONP-Мус, получени в матрица от Фракция от слюзта с $M_T > 20$ kDa при 250°C и pH7 чрез TG/DSC-MS анализ

Стабилността на синтезирания CuONPs-Мус е анализирана с помощта на термогравиметрични TG-DSC методи. По този начин са определени взаимодействията между протеините от слюзта с $M_T > 20$ kDa и медните йони, както и тяхната термична стабилност. TG кривите отразяват промените в теглото на пробата в зависимост от повишаването на температурата, докато процесите, протичащи във времето в резултат на нагряване на материала, се проследяват от DTG кривите.



Фигура 17. TG-DSC анализ на Фракция от слюзта с $M_T > 20$ kDa и CuONP-Мус наночастици.

Резултатите от TG и DSC анализите, представени на Фигура 17 и Таблица 6, ясно показват голяма разлика в процесите на термично разграждане на фракция от слюзта и синтезираните CuONPs-Мус. От TG-DSC резултатите за двете проби, могат да се разграничат два етапа в процесите на нагряване в аргонова атмосфера в диапазона 25–300 °C.

Sample	TG				DTG		
Sample	$M_{loss,IDS}$ [%]	M_{loss1} [%]	M_{loss2} [%]	$M_{loss,TOTAL}$ [%]	$T_{max, IDS}$ [°C]	T_{max1} [°C]	T_{max2} [°C]
	30–120°C	120–200°C	200–300°C				
Mucus	16.94% (9.08 mg)	75.75% (40.64 mg)	0.03% (0.016 mg)	92.72%	73.3	123.0	183.0
CuONP s- Muc	23.47% (11.49mg)	69.44% (34.05 mg)	0.04% (0.019 mg)	92.95%	62.2	134.9	160.9

Таблица 6. TG –DTG данни за проба от чист слюз и CuONP композити.

Първият етап обхваща тем-пературен диапазон между 25-120°C, с ендотермичен ефект при около 80°C и загуба на

маса, изпаряването на физически адсорбирана-та вода ($T_{max, IDS} = 73.3^\circ\text{C}$, $M_{loss, IDS} = 16.94\%$). Ендотер-мичният пик за CuONPs-Мус в същия температурен диапазон е свързан с десорбцията на физически адсорбирана вода, но се появява при по-ниска температура и с по-голяма загуба на маса в сравнение с чистата слюз ($T_{max, IDS} = 62.2^\circ\text{C}$, $M_{loss, IDS} = 23.47\%$).

И в двете проби след ендотермичния пик, дължащ се на отделянето на вода, следва екзотермичен пик, който е много по-изразен в чистата слюз и се намира при по-високи температури (T_{peak} слюз = 135.8 °C, T_{peak} композит CuONPs-Мус = 91.5 °C). Вторият етап в температурния диапазон от 120 до 300 °C се характеризира със значителна загуба на маса за чиста слюз ($M_{loss,} = 75.75\%$) и CuONPs-Мус ($M_{loss} = 69.44\%$) и T_{peak} слюз = 183.9°C, T_{peak} композит = 158.9 °C, съответно, което продължава до 180°C. Тези промени са свързани с първоначалното разрушаване на материала, като пълното унищожаване на образуваните наночастици става над 180 °C.

Изходната слюз съдържа протеини с ниско и високо молекулно тегло. При протеините с високо молекулно тегло взаимодействията между страничните вериги във вътрешността на молекулата са по-изразени, което е свързано с по-висока конформационна стабилност в сравнение с протеините с ниско молекулно тегло. Следователно по-големите стойности на енталпия (ΔH),

определени от площта на пика на DCS кривите за пробата от чист слуз ($\Delta H = -1216 \text{ J/g}$), отразяват по-силни вътрешномолекулни взаимодействия в протеина (Таблица 6).

Характеризиране на ZnONPs-Мус в матрица от Фракция от слузта с $MT > 20 \text{ kDa}$

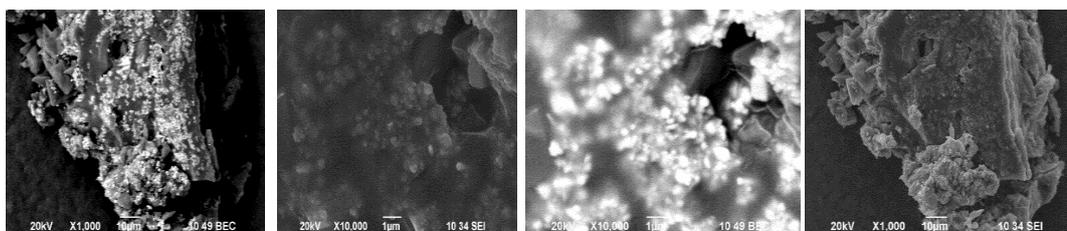
Характеризиране на ZnONPs-Мус в матрица от Фракция от слузта с $MT > 20 \text{ kDa}$

Синтезът ZnONPs-Мус и ефектът на реакционното време върху образуването на НЧ-те е последван с оптична спектроскопия. Записаните абсорбционни UV-Vis спектри след 24 ч., 48 ч. и 72 ч. потвърдиха образуването на ZnONPs-Мус в матрица от Фракция с $MT > 20 \text{ kDa}$. Образуването на ZnONPs-Мус в реакционната смес води до поява и нарастване на пик при 355 nm. Получените резултати са в добро съответствие с абсорбционния максимум при 348 nm, наблюдаван за ZnONPs, получени чрез химичен синтез.

Сканираща електронна микроскопия, комбинирана с енергийно-дисперсионна спектроскопия (SEM/EDS)

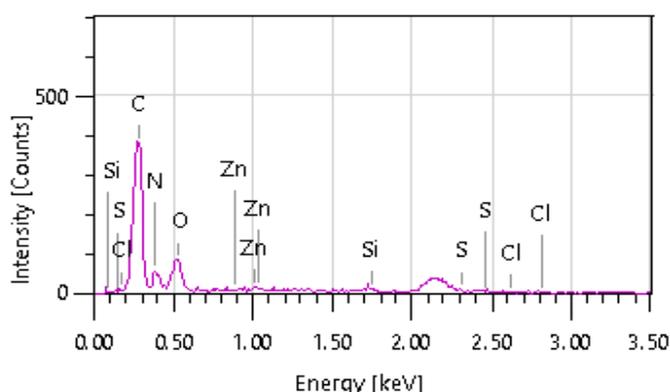
Проведените анализи със сканираща електронна микроскопия, комбинирана с енергийно-дисперсионна спектроскопия (SEM/EDS) потвърждават образуването на биогенни ZnONPs-Мус и по двата метода, но с различни характеристики.

Характеризирането на ZnONPs-Мус, получени в матрица от слузта с $MT > 20 \text{ kDa}$ за 72 ч. чрез SEM анализ е показано на Фигура 18. Резултатите показват, че се наблюдават агломерирани биогенни ZnONPs-Мус с овална форма и полидисперсен характер, като размерът им варира в широки граници от 45 до 110 nm.



Фигура 18. SEM изображение на ZnONPs-Мус, получени в матрица от фракция с $MT > 20 \text{ kDa}$, от слузта на *C. aspersum* с прекурсор ZnSO_4 .

Резултатите за биогенни ZnONPs-Мус, получени при титруване на реакционната смес с AcK до pH 5, чрез SEM и EDX анализи и обобщените данни от EDX (Фигура 19 А, Б), ясно показват, че в при този метод се получават ZnONPs-Мус с ниска концентрация и незадоволителни физикохимични характеристики.



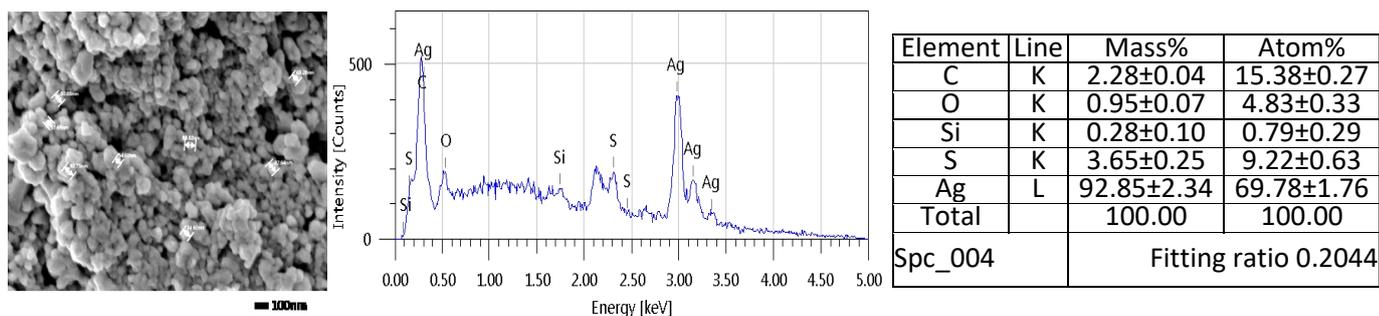
Element	Line	Mass%	Atom%
C	K	58.55±0.89	65.30±1.00
N	K	17.91±1.24	17.13±1.18
O	K	18.87±1.15	15.80±0.96
Si	K	3.02±0.73	1.44±0.35
S	K	nd	nd
Cl	K	nd	nd
Zn	L	1.66±0.60	0.34±0.12
Total		100.00	100.00
Spc_016		Fitting ratio 0.0836	

Фигура 19. Характеризиране на ZnONPs-Мус, получени след смесване на ZnSO_4 и слузта на *C. aspersum* с $MT > 20 \text{ kDa}$ в съотношение 1:1 и титрувани с AcK до pH 5: А) EDX анализи; Б) обобщени резултати от EDX.

Характеризиране на биогенни AgNPs-Мус чрез сканираща електронна микроскопия, комбинирана с енергийно-дисперсионна спектроскопия (SEM/EDS).

Морфологията на AgNPs, получени при различни реакционни условия е изследвана с помощта на SEM. На Фигура 20 са показани AgNPs-Мус, получени като утайка след центрофугиране при 12000 rpm съгласно експерименталните условия на метод 1. След

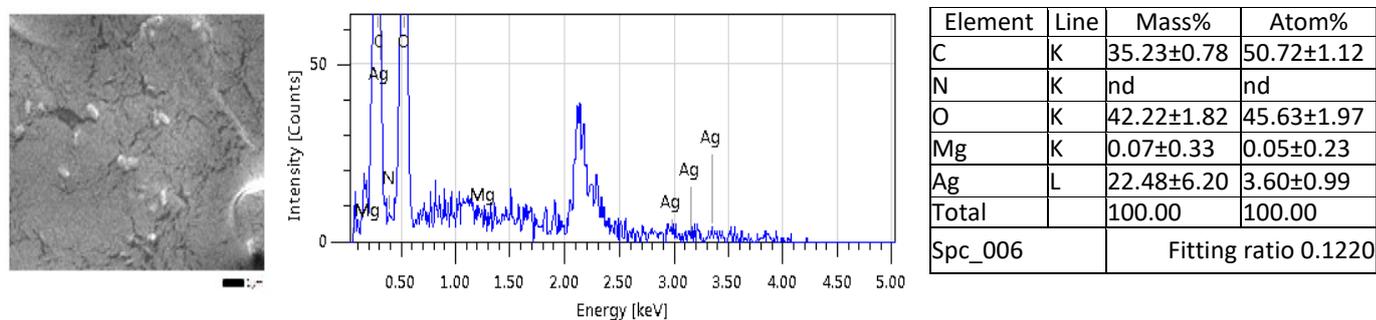
хомогинизирането на AgNO_3 и слузта с $\text{MT}>20$ кДа, се прибавя АсК, при което рН на реакционната смес е 1.5.



Фигура 20. Характеризиране на AgNPs-Мус, изолирани като утайка след центрофугиране при 12000 rpm, съгласно метод 1 чрез А) SEM и Б) EDX анализи; С) обобщени резултати от EDX

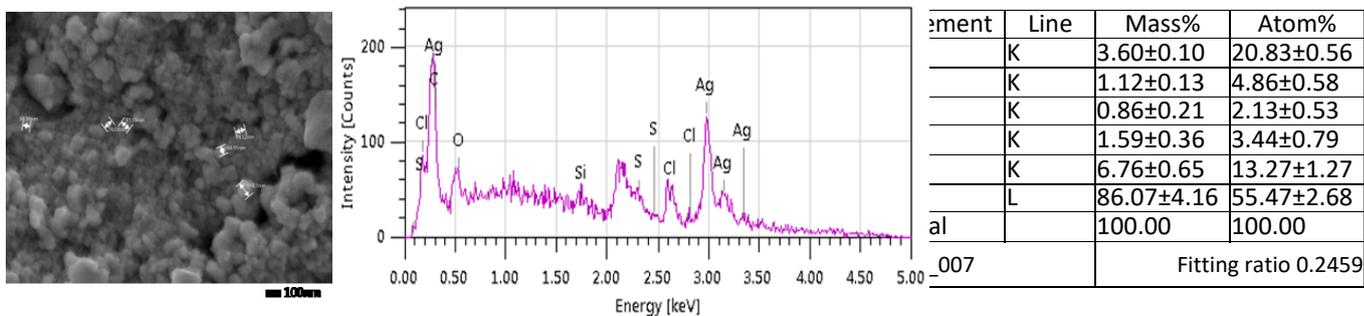
Представените резултати от SEM и EDX анализите на Фигура 20 показват, че AgNPs-Мус доминират в утайка след центрофугиране на реакционната смес при 12000 rpm, съгласно метод 1. Доказателство за това са интензивния пик при 3.00 keV и пиковите с по-нисък интензитет при 3.16 и 3.5 keV. Силният сигнал при 3 keV разкрива наличието на метално сребро в сребърни наночастици, биосинтезирани с помощта на протеинова фракция от слузта на *C. aspersum* с $\text{MT}>20$ кДа в присъствие на АсК, като допълнителен редуциращ агент (Фигура 20 В и С).

В получените резултати за лиофилизираната супернатанта също се откриват посочените пикове, но с много по-ниска интензивност, т.е. откриват се следи от Ag (Фигура 21А, В). Установени са единични частици с размер под 5 μm (Фигура 21А). Следователно, в утайката, получена след пречистване и центрофугиране на 12000 rpm (съгласно методика 1) въз основа на и EDX са доказани биогенните AgNPs-Мус с овална форма, сравнително ниска полидисперсност и с размер между 54.60-88.82 nm.



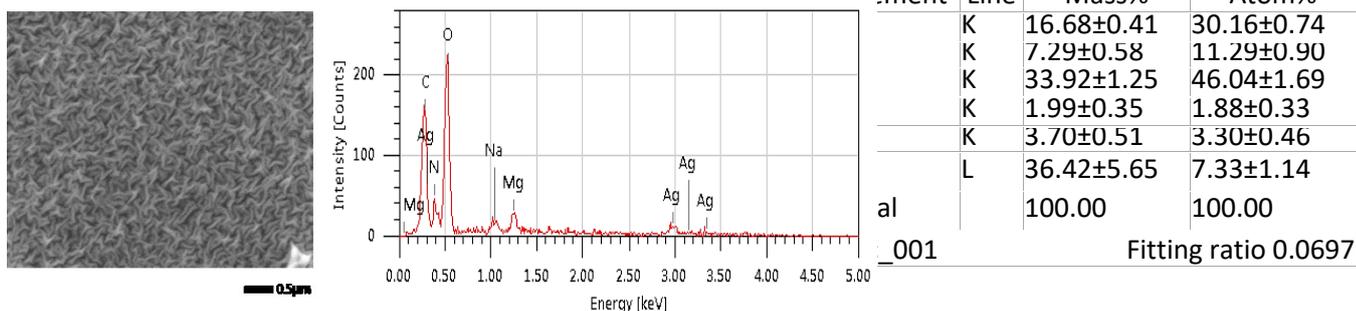
Фигура 21. Характеризиране на лиофилизираната супернатанта получена след отстраняване на утаените AgNPs-Мус, чрез центрофугиране при 12000 rpm, съгласно метод 1 чрез А) SEM и Б) EDX анализи; С) обобщени резултати от EDX.

Морфологичните характеристики на AgNPs-Мус, получени съгласно експерименталните условия на метод 2 са представени на Фигура 22. Резултатите показват, че титруването на реакционната смес, съдържаща прекурсор на Ag^+ (AgNO_3) и слуз от *C. aspersum* с $\text{MT}>20$ кДа, с АсК до рН 3.5 води до образуване на AgNPs-Мус, които са пречистени и изолирани като утайка след центрофугиране при 12 000 rpm. На фигура 22А ясно е показана овалната форма на получените биогенни AgNPs-Мус, с размери между 64 -117 nm. Получените НЧ-ци по метод 2 се отличават с по-голям размер и по-висока полидисперсност в сранение с НЧ-ците получени при рН 1.5 по методика 1. Освен това, EDX анализът установи по-нисък интензитет на пиковите между 3.0 -3.6 keV (Фигура 22В) и по-ниска концентрация на Ag (55.48% срещу 69.78%) в сравнение с биогенните НЧ-ци получени по метод 1. EDS спектърът разкрива още, че освен наличието на сребро присъстват и други елементи като кислород и хлор, които обикновено се срещат в типичните протоколи за биологичен синтез.



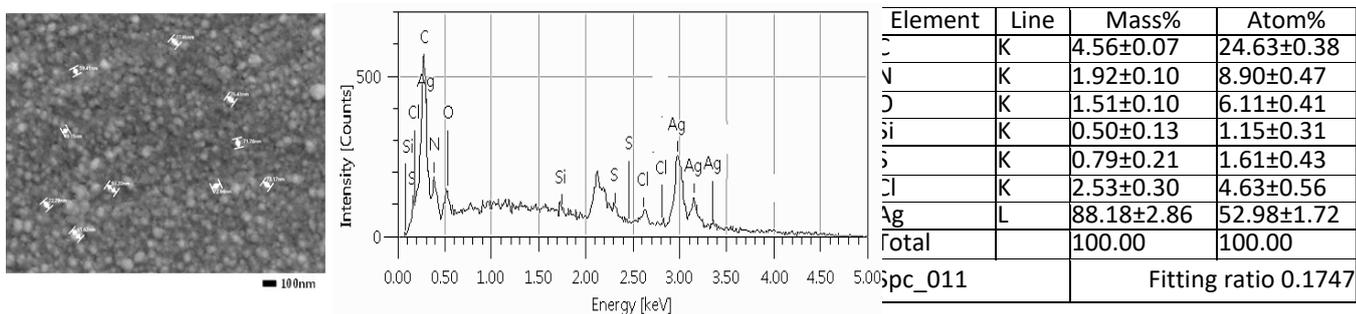
Фигура 22. Характеризиране на AgNPs-Muc, изолирани като утайка след центрофугиране при 12000 rpm, съгласно метод 2 чрез :А) SEM и Б) EDX анализи; С) обобщени резултати от EDX

Резултатите, получени за лиофилизираната супернатантата след центрофугиране при 12 000 rpm, съгласно метод 2, чрез SEM и EDX анализи и обобщените данни от EDX (Фигура 23А,В,С), ясно показват, че в нея не се откриват биогенни AgNPs-



Фигура 23. Характеризиране на лиофилизираната супернатантата, получена след отстраняване на утаените AgNPs-Muc, чрез центрофугиране при 12000 rpm, съгласно метод 2 чрез А) SEM и Б) EDX анализи; С) обобщени резултати от EDX

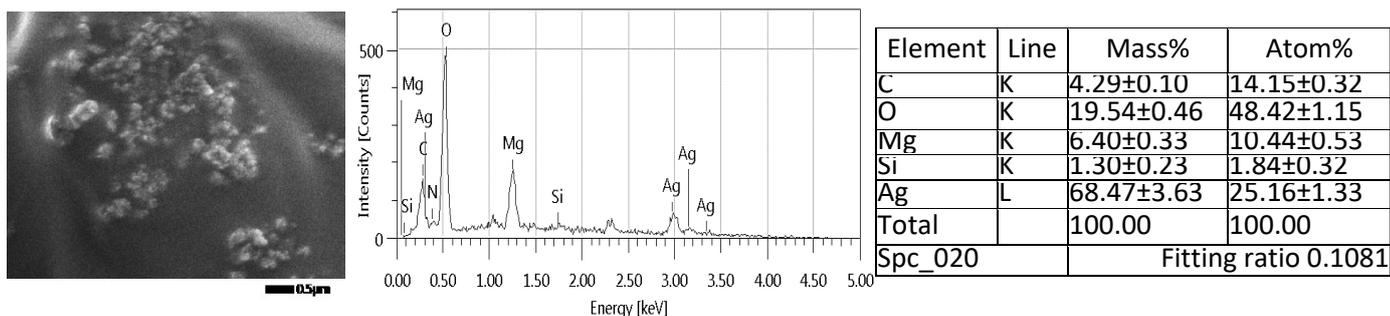
Резултатите от SEM и EDX (Фигура 24 А, В) потвърждават, че следвайки методика 3 са получени биогенни AgНЧ-ци. За разлика от другите две методики, при този метод не се използва АсК, като допълнителен редуциращ агент. Взаимодействието между перкурсор на Ag^+ и фракция от слюзта с $MT > 20$ кДа протича при рН 7. Морфологичните характеристики на утайката получена след пречистване и центрофугиране при 12 000 съгласно методика 3, доказват получаването на биогенни AgNPs-Muc с овална форма и размери между 49-95 nm (Фигура 24А). EDX спектъра (Фигура 24В) показва характерните за Ag пикове между 3.0-3.6 keV. Обобщени резултати от EDX (Фигура 24С) показват, че среброто, съставляващо 52,98% е най-важният елемент, следван от въглерод (24.63%), азот (9.90 %) и кислород (6.11%), което доказва образуването на AgNPs-Muc.



Фигура 24. Характеризиране на AgNPs-Muc, изолирани като утайка след центрофугиране при 12000 rpm, съгласно метод 3 чрез :А) SEM и Б) EDX анализи; С) обобщени резултати от EDX.

Резултатите, представени на Фигура 25А,В,С, получени за лиофилизираната супернатантата след центрофугиране при 12 000 rpm, съгласно метод 3, чрез SEM и EDX анализи и обобщените данни от EDX показват, че в нея се откриват биогенни AgNPs-Muc, макар и в по-малко количество отколкото в утайката, получена по същата методика. Наблюдават се агломерирани биогенни AgNPs-Muc с овална форма и полидисперсен характер, като размерът им варира в широки граници от 45 nm до 0,5 μm (Фигура 25А). EDS спектърът (Фигура 25В)

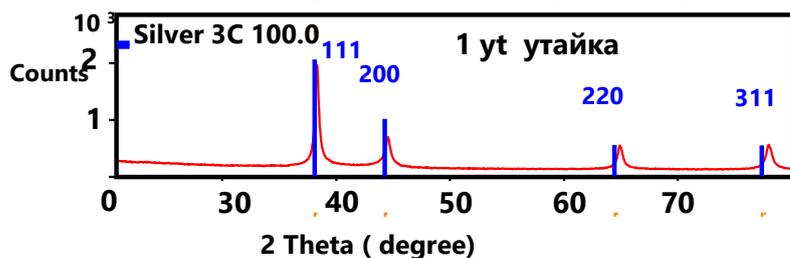
разкрива още, че освен наличието на сребро присъстват и други елементи като кислород, магнезии и силиции (макар и в ниска концентрация 1.84%) (Фигура 25С).



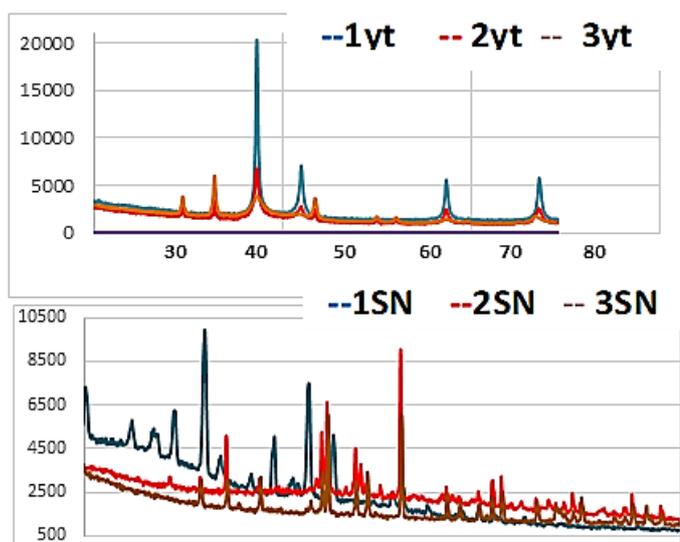
Фигура 25. Характеризиране на лиофилизираната супернатантата получена след отстраняване на утаените AgNPs-Мус, чрез центрофугиране при 12000 грм, съгласно метод 3 чрез А) SEM и В) EDX анализи; С) обобщени резултати от EDX.

XRD анализът предоставя подробна информация за формата, размера и ориентацията на наночастиците. Рентгеновата дифракционна картина на сребърни наночастици, биосинтезирани от 50 mM разтвор на AgNO₃ и слуз с МТ >20 кДа по метод 1, в присъствие на АсК (при рН 1,5) е показана на Фигура 26. Установени са пикове със значителен интензитет в XRD дифрактограмата при 2θ стойности от 38.32, 44.41, 64.53 и 77.55°, които съответстват на (hkl) стойности (111), (200), (220) и (311) равнини от сребро, което е в съответствие с изследванията на М. Alam, 2022.

Пикът при 32,32 градуса се дължи се на AgNO₃, който не може да бъде редуциран или на наличието на Ag₂O в биосинтезираните Ag-наночастици.



Фигура 26. XRD анализ на AgNPs-Мус, синтезирани от 50 mM разтвор на AgNO₃ и слуз с МТ >20 кДа по метод 1, в присъствие на АсК, при рН 1.5.



Фигура 27. А) Сравнителен анализ чрез XRD на AgNPs-Мус, получени като утайка след центрофугиране на реакционната смес при 12000 грм, съгласно експерименталните условия на методи 1, 2 и 3:

- 1) 50 mM AgNO₃, слуз с МТ>20 кДа и АсК в съотношение 1:1:1, рН 1.5.
 - 2) 50 mM AgNO₃ и слуз с МТ>20 кДа, титру-вани с АсК до рН 3.5.
 - 3) 50 mM AgNO₃ и слуз с МТ >20 кДа, рН 7
- В) Сравнителен анализ на супернатантите, получени след отстраняване на утаените AgNPs-Мус, чрез центрофугиране при 12000 грм, съгласно експерименталните условия на методи 1, 2 и 3.

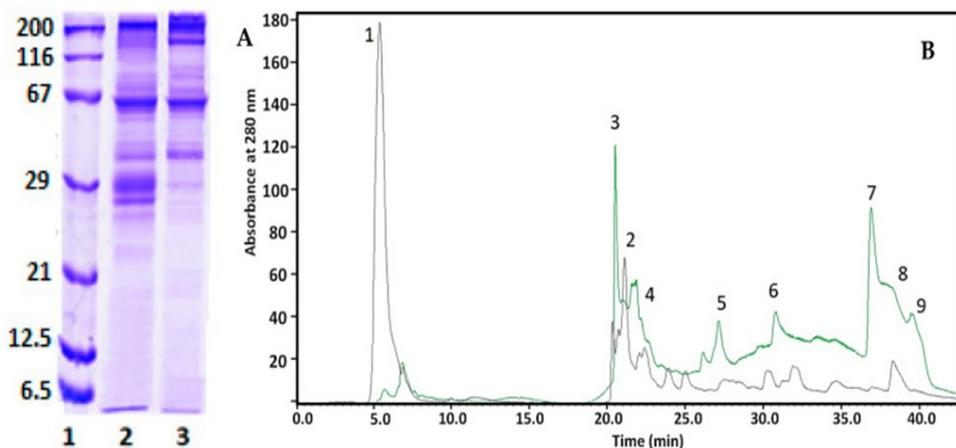
ДЕЙНОСТ 3.5. Определяне на активните компоненти, формиращи структурата на Ag-, Cu- и Zn-БНЧ-ци във Фракция 1, Фракция 2 и Фракция 3.

Проведени са изследвания чрез 1D-PAGE в комбинация с RP-HPLC и анализ с ImageQuant™ TL v8.2.0, с цел идентифициране на активните компоненти от фракцията от слузта с МТ >20 кДа, които участват във формирането на биогенните наночастици CuONPs-Мус. Използваната

протеинова фракция с МТ >20 кДа обединява протеините във Фракция 2 (с МТ 10-50 кДа) и Фракция 3 (с МТ>50 кДа). Експерименталните резултати показваха, че тя е най-подходяща за зелен синтез на CuONPs.

Идентифициране на протеини, участващи в зеления синтез на CuO-Muc NPs *1D-PAGE и RP-HPLC анализи*

Електрофоретичният анализ чрез 12% SDS-PAGE на изходната фракция от слюзта с МТ >20 кДа, използвана за зелен синтез и супернатантата след отделяне на синтезираните CuONPs-Muc, както и хроматограмите на същите тези проби са представени на Фигура 28 А и Фигура 28В.



Фигура 28. А) Анализ на 12% SDS-PAGE :

1) стандартен протеинов маркер в диапазона 6.5 kDa–200 kDa;

2) фракция от слюзта с МТ>20 kDa;

3) супернатантата след утаяване на CuONPs-Muc. (В) HPLC хроматограми на слюзта с МТ> 20 kDa (черна линия) и супернатантата след утаяване на CuONPs-Muc чрез центрофугиране (зелена

линия), разделени на RP-HPLC, с колона C18 (8,00 × 250 mm).

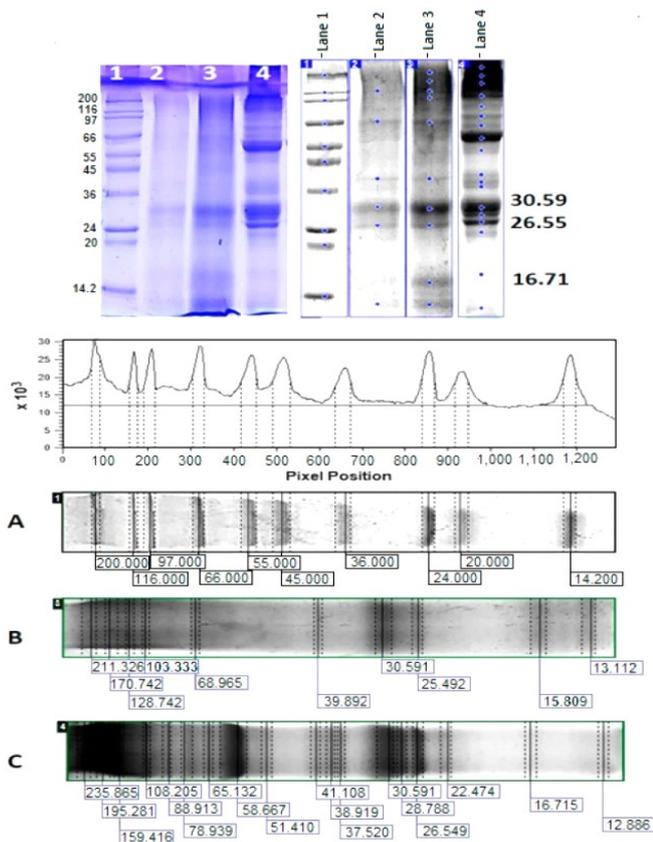
Полученият електрофоретичен профил на Фракцията с МТ >20 кДа от слюзта на *S. aspersum* показва, че протеините с МТ ~210 kDa, ~100 kDa и ~60 kDa са добре експресирани, докато тези с МТ между 55–65 kDa и 25–41 kDa са по-слабо представени (с по-нисък интензитет на експресия) (Фигура 28А). Сравнението на двата електрофоретични профила показва промяна на интензитета на протеиновите ивици при 30 kDa и 26 kDa, които са много интензивни в изходната фракция, както и силно увеличен интензитет на лентите с МТ 235 kDa и 160 kDa (Фигура 28А). Представените резултати показват много слаба промяна за протеините с МТ ~40 kDa и ~60 kDa.

Допълнителна информация за участието на протеини като редуциращ агент е сравнителният анализ на промените в хроматограмите на елуираните протеини чрез RP-HPLC на C18 колона (8,00 × 250 mm) в използваната нативна слюз с МТ>20 kDa и супернатантата след утаяване на CuONPs-Muc.

Анализ на изображението на 10% SDS-PAGE с помощта на софтуер ImageQuant™ TL v8.2.0

Електрофоретичният профил представен на Фигура 29А, показва най-висока експресия на протеини с МТ предимно над 100 kDa, както и намалена експресия на протеини с МТ 16.715 kDa, 22.474, 51.410 kDa, 65.132 kDa, 78.939 kDa и 88.913 kDa. Електрофоретичният профил на фракциите 7 и 9, елуирани на RP-HPLC с C18 колона, експресира две основни ивици с МТ 30.59 и 26.55 kDa (позиции 2 и 3 на 10% SDS-PAGE, Фигура 29). Това е потвърждение на резултата, представен на Фигура 28, където е представена разликата между фракцията от слюзта на *S. aspersa* с МТ> 20 kDa преди и след утаяване на CuONP-Muc.

В допълнение към тези протеини (общи за двете фракции), електрофоретичният анализ на фракция 9 също включва някои слабо експресирани протеини.



Фигура 29. ImageQuant™ TL анализ на 10% SDS-PAGE, визуализиран с Coomassie G-250 на: (A) линия 1—стандартен протеинов маркер в диапазона 6,5–200 kDa (SigmaMarker™, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA); (B) пътека 2, пик 7 от HPLC хроматограмата на супернатантата на мукусната фракция на *C. aspersa* с МТ > 20 kDa след утаяване на CuONPs (Фигура 28 В); (C) пътека 3—връх 9 от HPLC хроматограмата на Фигура 28В.

АВТОРИ :

Проф. дн Павлина Долашка
 Доц. д-р Людмила Велкова
 Доц. д-р Александър Долашки
 Инж. Мария Тодорова

БЛАГОДАРНОСТ : Проект №: КП-06-Н61/8 от 15.12.2022 г. „Разработване на нови биологични наночастици от слюзта на градински охлюв *Cornu aspersum* като антимикуробни агенти”, финансиран от Фонд за научни изследвания на Република България.