

Microbial synthesis of protein nanoparticles containing silver with *Bifidobacterium breve* and evaluation their physiochemical properties

Kimia Parsi¹, Masoud Javanmardi², Sepideh Khaleghi¹

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Medical Biotechnology, Applied Biophotonics Research Center, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Biological and microbial synthesis processes of nanoparticles are a safe and useful option compared to physical and chemical methods due to their compatibility with the environment and nature and their cost-effectiveness. Probiotics have beneficial effects in improving the body's immune system and are a suitable alternative in the treatment of bacterial infections. The aim of this study was the synthesis of protein nanoparticles containing silver with the probiotic bacteria *Bifidobacterium breve*.

Materials and methods: First, probiotic bacteria *Bifidobacterium breve* were cultured and then silver albumin nanoparticles (Ag-Alb-NPs) were synthesized. X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM) and dynamic light scattering (DLS) tests to investigate the physical and chemical properties of Ag-Alb-NPs used.

Results: Ag-Alb-NPs had spherical, crystalline, semi-crystalline morphology and structure. They had O-H, N-H and C-H bonds, C=C bonds in aromatic rings and C-N bonds in amine compounds and O-H and C-H bonds in CH₂ and CH₃ groups, N-H, C-O bonds in the structure of C-O-C and C-OH functional groups. In addition, DLS results of albumin-silver nanoparticles and silver nanoparticles showed that they were 259 and 85.3 nm in size, respectively, and the graph was of single peak type.

Conclusion: In general, it was concluded that the synthesized Ag-Alb-NPs had suitable structural and physicochemical characteristics that can be used for future studies.

Keywords: Albumin, Nanoparticles, Silver, Probiotics, *Bifidobacterium breve*.

Cited as: Parsi K, Javanmardi M, Khaleghi S. Microbial synthesis of protein nanoparticles containing silver with *Bifidobacterium breve* and evaluation their physiochemical properties. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 34(4): 345-356.

Correspondence to: Sepideh Khaleghi

Tel: +98 9102005098

E-mail: sp.khaleghi@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-1817-3116

Received: 19 Nov 2023; **Accepted:** 10 Mar 2024

سنتز میکروبی نانوذرات پروتئینی حاوی نقره با باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium breve* و ارزیابی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی آن

کیمیا پارسی^۱، مسعود جوانمردی^۲، سپیده خالقی^۱

^۱ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات کاربردی بیوفوتونیک، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: فرآیندهای سنتز بیولوژیکی و میکروبی نانوذرات به دلیل سازگاری با محیط زیست و طبیعت و مقرون به صرفه بودنشان نسبت به روش‌های فیزیکی، شیمیایی گزینه‌ی ایمن و مفیدی هستند. پروبیوتیک‌ها اثرات مفیدی در ارتقا سیستم ایمنی بدن دارند و جایگزین مناسبی در درمان عفونت‌های باکتریایی هستند. هدف از پژوهش حاضر، سنتز نانوذرات پروتئینی حاوی نقره با باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium breve* بود.

روش بررسی: ابتدا باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium breve* کشت شدند و سپس نانوذرات آلبومین نقره (*Ag-Alb-NPs*) سنتز شد. از تست‌های طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس (*XRD*)، طیف سنجی با مادون قرم (*FTIR*)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (*TEM*)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (*SEM*) و پراکندگی نور دینامیکی (*DLS*) برای بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی *Ag-Alb-NPs* استفاده شد.

یافته‌ها: *Ag-Alb-NPs* دارای مورفولوژی و ساختار کروی، کریستالی، نیمه کریستالی بودند. آنها دارای پیوندهای *O-H* و *N-H* و *C-H* پیوندهای *C=C* در حلقه‌های آروماتیک و پیوندهای *C-N* در ترکیبات آمینی و پیوندهای *O-H* و *C-H* در گروه‌های *CH₂* و *CH₃* پیوندهای *N-H* و *C-O* در ساختار گروه‌های عاملی *C-O-C* و *C-OH* بودند. افزون بر این، نتایج *DLS* نانوذره آلبومین نقره و نانوذرات نقره نشان داد که آنها به ترتیب دارای اندازه‌ی ۲۵۹ و ۸۵/۳ نانومتر بوده و نمودار از نوع تک قله‌ای بود.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتیجه‌گیری شد که *Ag-Alb-NPs* سنتز شده دارای ویژگی‌های ساختاری و فیزیکیوشیمیایی مناسبی است که می‌توان از آن برای مطالعات آینده استفاده کرد.

واژگان کلیدی: آلبومین، نانوذرات، نقره، پروبیوتیک، *Bifidobacterium breve*

مقدمه

نانوذرات در لبه پیشروی حوزه به سرعت در حال توسعه فناوری نانو قرار دارند. از خواص این نانوذرات در مصارف متنوعی همچون کاتالیزورها، حسگرها و پزشکی به مقدار زیادی استفاده می‌شوند (۱). در حال حاضر روش‌های فیزیکی و شیمیایی زیادی برای

سنتز نانوذرات وجود دارد، اما به طور کلی برای موجودات زنده و محیط زیست پرهزینه و خطرناک هستند (۲). در زمینه نانوشیمی، نانوذرات فلزی (Metal nanoparticles: MNPs) به دلیل ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی انحصاری که در مقیاس نانو دارند، در کاربردهای گسترده مورد توجه قرار گرفته‌اند. رویکردهای سنتز نانوذرات فلزی به اندازه ماهیت فلزات مختلف متنوع است (۳). وارد کردن هر عنصر بیولوژیکی مانند گیاه، مخمر، باکتری و قارچ همیشه یک انتخاب عالی برای یک روش سنتز نانوذرات سازگار با محیط زیست است که به عنوان "سنتز سبز" یاد می‌گردد (۴). علاوه بر محافظت از اکوسیستم، سنتز

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، دانشگاه علوم

پزشکی آزاد تهران، سپیده خالقی (email: sp.khaleghi@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-1817-3116

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۸/۲۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹

سبز در کنترل اندازه و شکل نانوذرات هدف مفید است. اخیراً استفاده از میکروبها در سیستمهای زنده برای سنتز نانوذرات فلزی برجسته شده است (۵). چندین میکروب دارای پتانسیل استثنایی برای تصفیه زیستی فلزات مضر و تبدیل آنها به شکلهای غیرمضر هستند (۶). میکروارگانیسمهای مختلف مسیرهای خارج سلولی یا درون سلولی را برای بیوسنتز نانوذرات اعمال می کنند. سنتز بیوتیک نانوذرات فلزی را می توان با استفاده از توده های سلولی کامل باکتری ها، قارچ ها و جلبک ها یا استفاده از عصاره های سلولی یا رویی کشت میکروارگانیسم ها به دست آورد (۷). طی مطالعات اخیر استفاده از پروبیوتیک ها در سنتز زیستی نانوذرات نقش برجسته ای را به خود اختصاص داده است. وجود پلیمرهای زیستی مانند پروتئین ها، آنزیم ها، پلی ساکاریدها و DNA که از واحدهای مونومری اسید آمینه ها، قندها و نوکلئوتیدها به ترتیب تشکیل شده اند، در سنتز و پایداری نانوذرات نقش موثری دارند و می توانند کارایی سنتز را افزایش دهند. باکتری ها با رهاسازی آنزیم های مانند نیتراژ ردوکتاز یا آنزیم های وابسته به NADH و NADPH می توانند سنتز نانوذرات را انجام دهند (۸). علاوه بر این در مطالعات بسیاری به تاثیر ضد باکتریایی و ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده با روش سبز و با استفاده از باکتری های پروبیوتیک اشاره شده است و توانسته اند اثر کشندگی این نانوذرات بر روی باکتری های بیماری زا و مقاوم به چند دارو (MDR) را مورد ارزیابی قرار دهند (۹).

در طول دوره های گذشته، ثابت شده است که نقره یک عامل ضدباکتری غیرآلی بی ضرر است که غیرسمی بوده و به خوبی برای مقابله با حدود ۶۵۰ نوع عفونت ناشی از میکروب شناخته شده است (۱۰). نقره پتانسیل کاربردهای بیولوژیکی متنوع همچون عوامل ضدقارچی، عوامل ضدباکتریایی، جلوگیری از سرایت، التیام زخم و ضد التهاب حتی در غلظت های پایین دارد (۱۱). یون های نقره در ساخت رزین های دندان، چسب استخوان، ایلاف تبادل یونی و پوشش ابزار پزشکی نقش دارند (۱۲). مطالعات اخیر نشان داده اند که نانوذرات نقره مهارکننده قوی برای اکثر پاتوژن ها است (۱۳). نانوذرات نقره کاربردهای گسترده ای در ساخت کاتالیزورها، خواص نوری، تصفیه فاضلاب، رشد گیاهان و تولید محصول دارد (۱۲).

آلبومین به گروهی از پروتئین های محلول در آب گفته می شود، اما در بدن انسان از نظر کاربرد و مقدار یکی از مهم ترین پروتئین های درون پلاسما بوده و جزو پروتئین هایی است که گلیکوزیله نمی شود (۱۴). باتوجه به اینکه آلبومین، نقش مهمی در بدن انسان دارد، می توان از آن در زمینه دارو و درمان بیماری استفاده کرد. داروهای درمانی دارای معایبی از جمله حلالیت کم و

بسیاری از عوارض جانبی هستند که با استفاده از نانوحامل هایی مانند آلبومین می توان بر همه آن ها غلبه کرد (۱۵). نانوذرات آلبومین در کاهش عوارض جانبی دارو و افزایش پایداری دارو نقش مهمی را ایفا می کنند (۱۵). نانوذرات آلبومین هم به صورت کروی و هم به صورت نانوکپسول مورد استفاده قرار می گیرند. نانوذرات آلبومین دارای ویژگی هایی از قبیل زیست سازگاری، غیرسمی بودن، ظرفیت اتصال بالا به داروهای مختلف، خاصیت ایمنی زایی پایین، بدون عوارض جانبی و همچنین برای تشخیص بیماری و درمان بیماری (درمان سرطان) بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۶، ۱۷). از آنجایی که نانوذرات نقره می توانند بر روی بافت های نرمال اثر سمیت و التهابی داشته باشند و علاوه بر این ناپایداری این نانوذرات باعث تغییر سایز و بار و خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات نقره خواهد شد. بنابراین استفاده از پوشش های زیستی می تواند باعث کاهش عوارض جانبی این نانوذرات بر روی بافت های نرمال شود و علاوه بر ای وجود پوشش آلبومینی باعث پایداری سایز و بار نانوذرات خواهد شد و علاوه بر این معلق بودن و آبدوستی نانوذرات را نیز افزایش خواهد داد.

بنابراین، با توجه به مشکلات و راه حل های ارائه شده در فوق، در این پژوهش بر آن شدیم تا از باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium breve* جهت سنتز میکروبی نانوذرات نقره استفاده کنیم و سپس از پوشش زیستی پروتئین آلبومین برای افزایش زیست سازگاری و پوشش دهی آنها استفاده کنیم. در پایان، خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات مذکور با روش های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه و کشت باکتری

ابتدا ۵/۲۲ گرم محیط کشت MRS Broth و ۱۰۰ سی سی آب مقطر مخلوط و روی استیرر قرارگرفت تا کامل حل شود. محلول حاصل در اتوکلاو استریل، و پس از خنک شدن آن PTCC: *Bifidobacterium breve* 1644 (تهیه شده از شرکت زیست تخمیر) تحت شرایط استریل زیر هود داخل محلول اضافه شد. تلقیح حاصله به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور شیکر دار قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، دوباره محیط کشت MRS برات بر اساس روش توصیف شده در فوق اقدام شد. سپس، از محیط حاوی اینوکولوم تهیه شده، زیر هود تحت شرایط استری ۱، میلی لیتر به محیط کشت MRS Broth جدید افزوده و به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور شیکر دار قرارگرفت تا انکوبه شود. در

سرنگ به سوسپانسیون موجود در فالكون اضافه شد و به مدت ۵ ساعت روی استیرر قرار گرفت؛ سپس به مدت ۳۰ دقیقه در rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته و روی رسوب ۱ میلی لیتر اتانول افزوده و در نهایت فالكون درون یخچال گذاشته شد.

ارزیابی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی

پراکندگی دینامیک نور یا (DLS)

پراکندگی نور دینامیکی (DLS) روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود. در این پژوهش حدود یک میلی لیتر از نانوذرات سننتز شده درون کووت مخصوص دستگاه DLS (Dynamic Light Scattering) (NanoBrook 90 Plus (Brookhaven, USA) ریخته شد و سپس اندازه نانوذرات مورد ارزیابی قرار گرفت.

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

میکروسکوپ الکترونی عبوری یا TEM (Philips EM 208S (Netherlands) نوعی میکروسکوپ الکترونی است که در آن پرتویی از الکترون‌ها از یک نمونه فوق العاده نازک عبور می‌کنند و در اثر تعامل الکترون‌های عبوری با نمونه تصویر تشکیل می‌شود. سپس تصویر بر روی یک ابزار تصویرساز مانند یک صفحه نمایش فلورسنت، یا یک لایه از فیلم عکاسی متمرکز و بزرگنمایی شده، یا توسط یک سنسور مانند یک دستگاه بارجفت شده (Charge-coupled device, CCD) که نوعی حسگر تصویربرداری می‌باشد، آشکار می‌گردد. در این پژوهش اندازه و شکل Ag-Alb-NPs و AgNPs توسط TEM تصویربرداری شد. به این صورت که حدود ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه را درون میکروتیوپ ریخته و برای تصویربرداری استفاده شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (Zeiss Evo18 (Germany) نوعی میکروسکوپ الکترونی است که قابلیت عکس برداری از سطوح با بزرگنمایی ۱۰ تا ۵۰۰۰۰۰ برابر با قدرت تفکیکی کمتر از ۱ تا ۲۰ نانومتر (بسته به نوع نمونه) را دارد. در این مطالعه، حدود ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه درون میکروتیوپ ریخته و برای تصویربرداری SEM استفاده شد.

پراش اشعه ایکس (XRD)

XRD یکی از تجهیزات منحصر بفرد برای آنالیز و تعیین مشخصات کریستال‌ها در آزمایشگاه می‌باشد. اصول طراحی آنالیز پراش اشعه ایکس XRD بر پایه تابش پرتو X به نمونه در زوایای مختلف و تحلیل الگوی پراش یا بازتابش آن است. از جمله مواردی که می‌توان در آنالیز XRD تعیین کرد تشخیص فاز

شرایط کاملاً استریل، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری کشت داده شده از مرحله ی قبل روی پلیت‌های MRS Agar کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت انکوبه شدند. جهت تهیه تک‌کلونی از باکتری کشت داده شده، در روز بعد، در ابتدا نسبت به تهیه محیط کشت MRS جامد مطابق روش ذکر شده در بالا اقدام شد و از کلنی باکتری‌ها برداشته و روی محیط جدید قرار داده شد. آنها دوباره به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. این عمل چهار بار تکرار شد و در پایان به کشتی رسید که تک کلنی باشد.

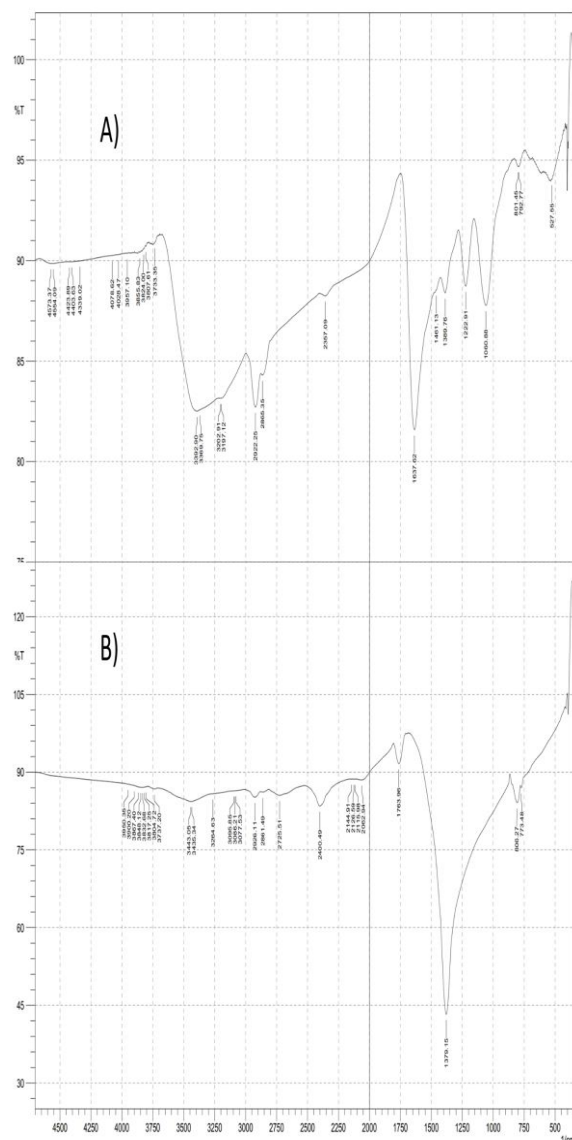
سننتز نانوذرات نقره

در ابتدا نسبت به تهیه MRS براث بر اساس روش توصیف شده در بخش قبلی اقدام شد و پلیت‌های حاوی تک‌کلنی درون این محیط کشت داده شدند. آنها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از آن، محیط حاوی باکتری‌های کشت داده شده به مدت ۲۰ دقیقه در rpm ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برداشته و فیلتر شدند. ۲۰ میلی گرم نیترات نقره به آن افزوده و دوباره فیلتر شد. فائل روی شیکر به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و بعد از آن ۳۰ میلی گرم نیترات نقره و ۵۰ میلی لیتر DMF (دی متیل فرم آمید) به محلول درون فائل اضافه و فائل دوباره روی شیکر به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. سپس، یک میلی لیتر از سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس کل سوسپانسیون از فائل به مدت ۲۰ دقیقه در rpm ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ مایع رویی دور ریخته، و زیر هود تحت شرایط استریل یک میلی لیتر اتانول غلیظ ریخته و ورتکس کرده، سپس داخل یخچال گذاشته شد. سپس، نانوذرات نقره که درون اتانول قرار دارد، ورتکس کرده و ۱ میلی لیتر از آن برداشته و سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد، ۱ میلی لیتر آب مقطر به رسوب افزوده و ورتکس شد. در نهایت، سوسپانسیون نانوذره نقره و آب مقطر چند بار به مدت ۱۰ دقیقه سونیکیت شد.

سننتز نانوذرات آلومین-نقره

۲۰۰ میلی گرم BSA و ۲ میلی لیتر آب مقطر درون فالكون ریخته، روی استیرر قرار داده شد. سپس، ۵۰۰ میکرولیتر نانوذره نقره سونیکیت شده به فالكون افزوده و به مدت ۲۴ ساعت روی استیرر قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت فالكون حاوی سوسپانسیون درون یک ارلن حاوی ۵ میلی لیتر اتانول و ۵ میلی لیتر استون ریخته و مخلوط شد و با سرنگ به صورت قطره قطره‌ای به سوسپانسیون BSA و نانو ذره نقره و آب مقطر افزوده شد. پس از ۵ دقیقه، سوسپانسیون روی استیرر قرار گرفت، ۳ میلی لیتر محلول گلوکار آلیدید ۲۵ درصد به صورت قطره قطره با

بر روی نمونه ناشی شده باشد. پیک‌های قرار گرفته در عدد موج‌های 1461cm^{-1} و 1389cm^{-1} نیز به ترتیب به ارتعاش خمشی پیوندهای C-H در گروه‌های CH_3 و CH_2 مربوط دانسته شده است که از آلودگی‌ها محیطی یا مواد اولیه باقی مانده ناشی شده است. ارتعاش کششی پیوندهای C-O در ساختار گروه‌های عاملی C-O-C و C-OH به ترتیب در عدد موج‌های 1222cm^{-1} و 1060cm^{-1} پیک جذبی نشان داده‌اند که این پیوندها نیز از آلودگی‌ها محیطی یا مواد اولیه باقی مانده ناشی شده است. پیک قابل مشاهده در عدد موج 527cm^{-1} نیز می‌تواند مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای حاوی نقره (مانند Ag-O یا Ag-N) باشد و یا ارتعاش خمشی خارج از صفحه پیوندهای C-H باشد.



شکل ۱. طیف FTIR حاصل از نانوذرات نقره (A) و نیترات نقره (B)

کریستال، اندازه و شکل دانه کریستال، فاصله بین لایه‌های کریستال، تعیین جهت‌گیری و موقعیت بلور، اندازه‌گیری درصد کریستالیت نمونه، ترکیب اتم‌های کریستال و ساختار آن می‌باشد. در این پژوهش اندازه شکل Ag-NPs و Ag-Alb-NPs توسط XRD تصویربرداری شد. به این صورت ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ها سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب نمونه‌ها درون آون قرار گرفت تا نمونه‌ها خشک شوند و به حالت پودر دربیایند. سپس برای تصویربرداری XRD استفاده شد.

طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)

طیف‌سنجی مادون قرمز یکی از پرکاربردترین دستگاه‌های روش‌ها در شناسایی کیفی مولکول‌های مختلف آلی و آلی/فلزی، تعیین ساختار مولکولی گونه مختلف و شناسایی گروه‌های عاملی موجود در ساختار یک ماده می‌باشد. Ag-NPs و Ag-Alb-NPs پس از خشک شدن در آون در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ساعت، به حالت پودری در آمد و برای تست FTIR مورد استفاده قرار گرفتند. برای ساختن قرص از نمونه به منظور بررسی طیف FTIR آن، به اندازه‌ی نوک اسپاتول از نمونه برداشته و با نسبت ۱:۱۰۰ با KBr ترکیب شد. ترکیب حاصل ۲ مرحله در دستگاه قرص‌ساز و تحت فشار ۸۰ کیلو دالتون قرار گرفت تا قرص ساخته و تحت فشار ۸۰ کیلو دالتون قرار گرفت تا قرص ساخته شود. در نهایت قرص در دستگاه FTIR (Perkin-Elmer FT-IR: 843) گذاشته و طیف مربوطه به دست آمد.

یافته‌ها

FTIR

در شکل ۱ طیف FT-IR مربوط به نمونه نانوذرات نقره (A) و نیترات نقره (B) نشان داده شده است. در طیف FT-IR مربوط به نانوذرات نقره (شکل ۱A) پیک قرار گرفته در عدد موج 3392cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای O-H است که به دلیل جذب شدن رطوبت محیط بر روی سطح ماده به وجود آمده است. همین پیوندهای O-H می‌توانند در فرکانس خاصی به صورت خمشی به ارتعاش درآیند که جذب حاصل از ارتعاش خمشی پیوندهای O-H در عدد موج 1367cm^{-1} به وقوع پیوسته است. پیک‌های قرار گرفته در عدد موج‌های 2922cm^{-1} و 2865cm^{-1} به ترتیب به ارتعاش کششی نامتقارن و متقارن پیوندهای C-H در گروه‌های CH_2 و CH_3 و پیک‌های قرار گرفته در عدد موج‌های 3202cm^{-1} و 3197cm^{-1} به ارتعاش کششی پیوندهای N-H مربوط است که می‌تواند از آلودگی‌های محیطی یا مواد اولیه باقی مانده

در طیف FT-IR مربوط به Alb (شکل ۲A)، ارتعاش کششی پیوندهای O-H و C-H سبب پدیدار شدن پیک جذبی به ترتیب در عدد موج های 3422cm^{-1} و 2929cm^{-1} شده است. ارتعاش کششی پیوندهای $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ موجود در گاز دی اکسید کربن موجود در محفظه آزمون سبب پدیدار شدن پیکی در 2348cm^{-1} شده است. جذب حاصل از ارتعاش خمشی پیوندهای O-H به همراه پیک جذبی حاصل از ارتعاش کششی پیوندهای C=C در حلقه‌های آروماتیک در عدد موج 1661cm^{-1} به وقوع پیوسته است.

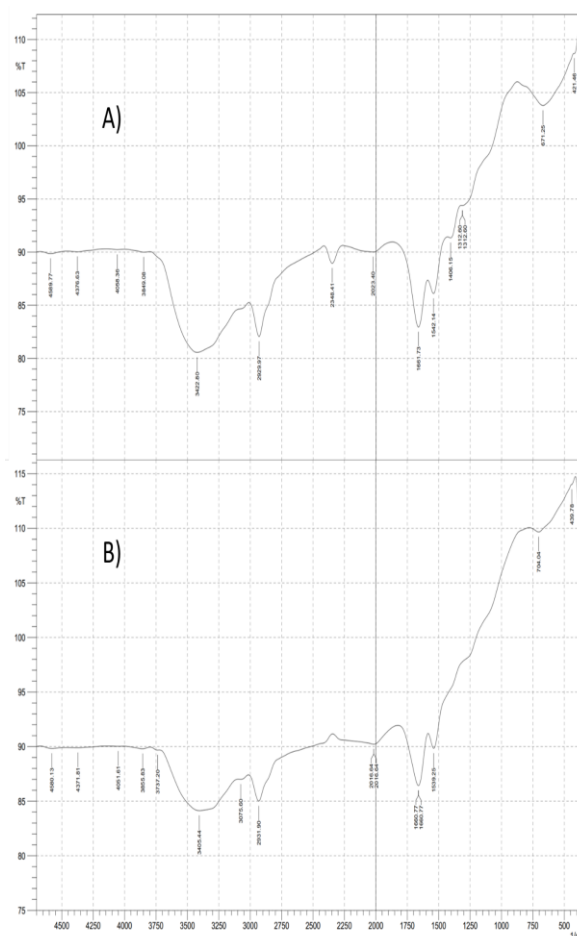
ارتعاش کششی پیوندهای C-N در ترکیبات آمینی موجود در آلبومین نیز در عدد موج 1542cm^{-1} پیک جذبی نشان داده است. همچنین پیک‌های قرار گرفته در عدد موج های 1406cm^{-1} و 1312cm^{-1} نیز به ترتیب به ارتعاش پیوندهای C-H در گروه‌های CH_2 و CH_3 مربوط دانسته شده است. علاوه بر آن پیک قابل مشاهده در عدد موج 671cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی حلقه‌های آروماتیک موجود در ترکیبات آلبومین است.

طیف FT-IR مربوط به Ag-Alb-NPs در شکل ۲B نشان داده شده است. در طیف FT-IR مربوط به آلبوآن، ارتعاش کششی پیوندهای O-H، N-H و C-H موجود در آلبومین سبب پدیدار شدن پیک‌های جذبی به ترتیب در عدد موج های 3405cm^{-1} ، 3075cm^{-1} و 2931cm^{-1} شده است. همچنین در این طیف پیک قرار گرفته در عدد موج 2016cm^{-1} نیز موید وجود یون Ag^+ در این نمونه است. جذب حاصل از ارتعاش خمشی پیوندهای O-H به همراه پیک جذبی حاصل از ارتعاش کششی پیوندهای C=C در حلقه‌های آروماتیک در عدد موج 1660cm^{-1} به وقوع پیوسته است. ارتعاش کششی پیوندهای C-N در ترکیبات آمینی موجود در آلبومین نیز در عدد موج 1539cm^{-1} پیک جذبی نشان داده است. علاوه بر آن پیک قابل مشاهده در عدد موج 704cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی حلقه‌های آروماتیک موجود در ترکیبات آلبومین است.

نتایج آنالیز DLS

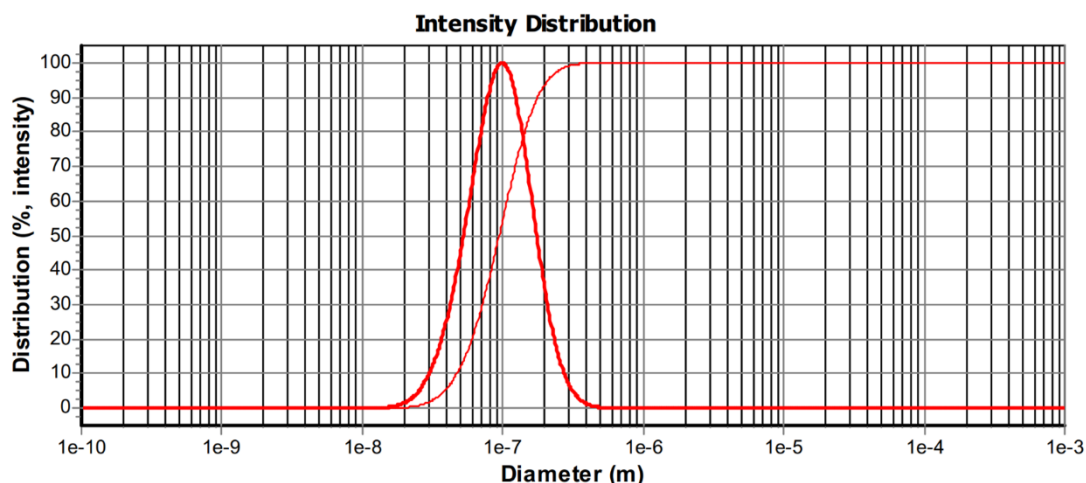
در نمودارهای حاصل از آنالیز DLS، Ag-NPs و Ag-Alb-NPs می‌توان نمودار تک قله و توزیع متوازن بین نمونه‌های مشخصه شده را مشاهده کرد. Ag-NPs در قطر (d) ۵۰ و ۹۰، به ترتیب اندازه‌های ۶۰/۵ و ۱۱۳ نانومتر را داشت (شکل ۳A). همچنین، Ag-Alb-NPs دارای اندازه ۸۵/۵ نانومتر در d برابر با ۵۰ و ۱۵۲ نانومتر در d برابر با ۹۰ بود (شکل ۳B).

طیف FT-IR مربوط به نیترات نقره در شکل ۱B نشان داده شده است. در طیف مربوط به این نمونه پیک مشخصه قرار گرفته در عدد موج 1379cm^{-1} مربوط به پیوند نیتروژن-اکسیژن موجود در ساختار نیترات است. در این طیف پیک قرار گرفته در عدد موج 2062cm^{-1} موید وجود یون Ag^+ در این نمونه است. ارتعاش کششی پیوندهای $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ موجود در گاز دی اکسید کربن موجود در محفظه آزمون سبب پدیدار شدن پیکی در 2400cm^{-1} شد. ارتعاش کششی پیوند C=O نیز در عدد موج 1763cm^{-1} پیک جذبی نشان داد. پیک قابل مشاهده در عدد موج 806cm^{-1} نیز مربوط به ارتعاش خارج از صفحه پیوندهای C-H و پیک قابل مشاهده در عدد موج 773cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی این پیوندها است. پیک‌های قرار گرفته در عدد موج های 2926cm^{-1} و 2861cm^{-1} به ترتیب به ارتعاش کششی نامتقارن و متقارن پیوندهای C-H در گروه های CH_2 و CH_3 و پیک‌های قرار گرفته در عدد موج های 3095cm^{-1} و 3443cm^{-1} به ترتیب به ارتعاش کششی پیوندهای N-H و O-H مربوط است. طیف FT-IR مربوط به آلبومین (Alb) در شکل ۲A مشاهده می‌شود.



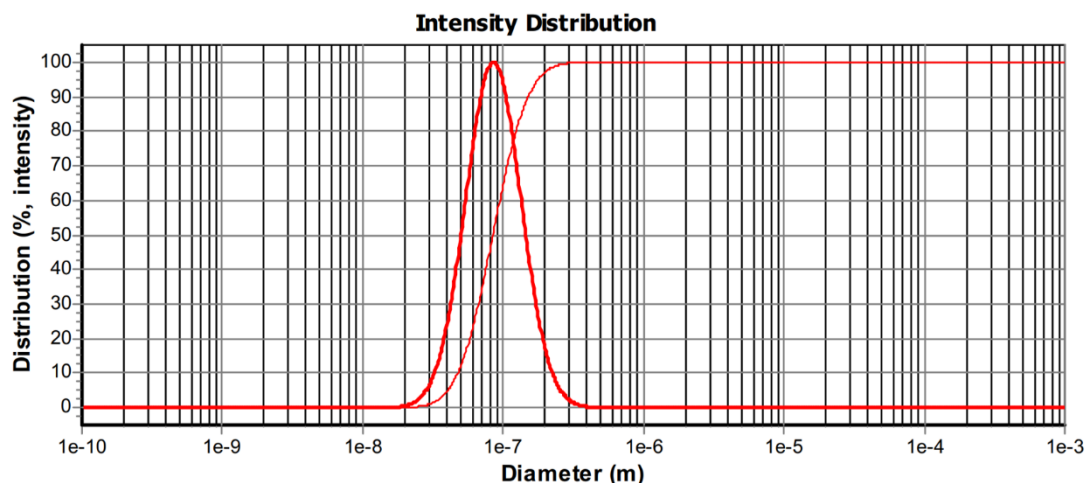
A) ¶ Analysis Results

° d(0)	12.5 nm / 11.0 nm / 10.7 nm	° d(5)	38.5 nm / 30.4 nm / 28.1 nm	° # of Peaks	3
° d(10)	47.9 nm / 36.7 nm / 33.4 nm	° d(25)	66.4 nm / 50.2 nm / 44.3 nm		57.9 nm 106 nm
° d(50)	95.2 nm / 71.8 nm / 60.5 nm	° d(75)	132 nm / 105 nm / 84.0 nm		1.65 μ m
° d(90)	178 nm / 150 nm / 113 nm	° d(95)	211 nm / 183 nm / 138 nm		
° d(100)	1.61 μ m / 4.11 μ m / 433 nm				



B) ¶ Analysis Results

° d(0)	15.5 nm / 15.5 nm / 15.5 nm	° d(5)	40.3 nm / 40.3 nm / 40.3 nm	° # of Peaks	1
° d(10)	47.9 nm / 47.9 nm / 47.9 nm	° d(25)	62.4 nm / 62.4 nm / 62.4 nm		85.2 nm
° d(50)	85.3 nm / 85.3 nm / 85.3 nm	° d(75)	115 nm / 115 nm / 115 nm		
° d(90)	152 nm / 152 nm / 152 nm	° d(95)	178 nm / 178 nm / 178 nm		
° d(100)	468 nm / 468 nm / 468 nm				



شکل ۳. طیف‌های حاصل از آنالیز پراکندگی نوری دینامیک (DLS) از نانوذرات نقره (A) و نانوذرات آلبومین-نقره (B)

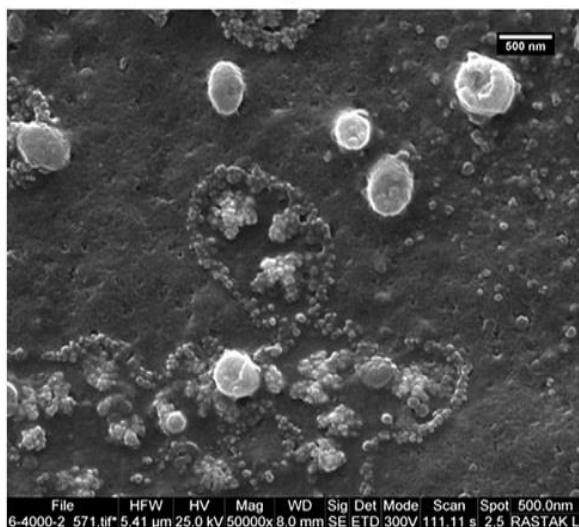
میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

نتایج بررسی با SEM حاکی از کروی بودن هر دوی Ag-NPs و Ag-Alb-NPs و محدوده اندازه ذرات ۵۰۰ نانومتر بود (شکل ۵).

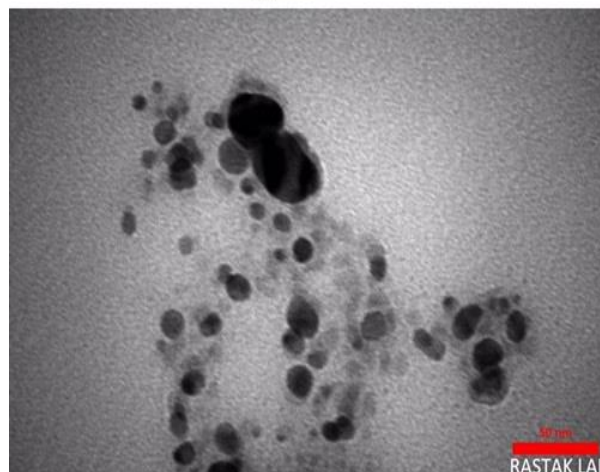
TEM

نتایج بررسی با میکروسکوپ الکترونی عبوری حاکی از مورفولوژی کروی Ag-NPs و Ag-Alb-NPs بود. اندازه Ag-NPs حدوداً 20 ± 80 نانومتر و اندازه Ag-Alb-NPs تقریباً 50 ± 20 نانومتر برآورد شد.

Ag-NPs

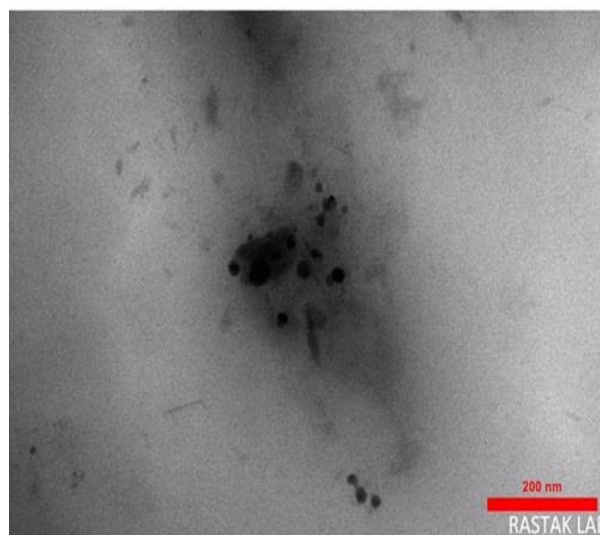
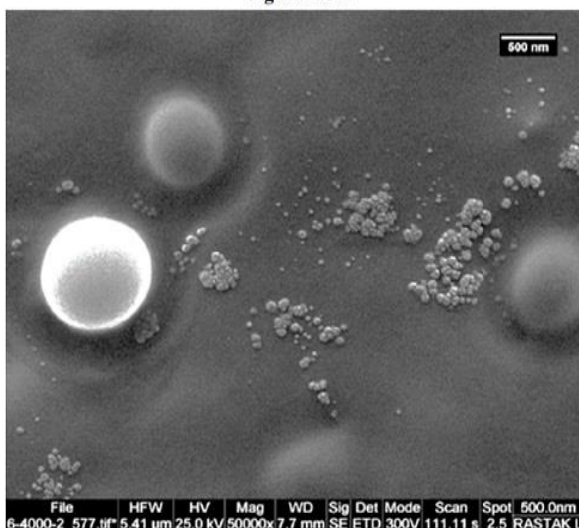


Ag-NPs



Ag-Alb-NPs

Ag-Alb-NPs



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از نانوذرات نقره (بالا) و نانوذرات آلبومین-نقره (پایین)

شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوذرات نقره (بالا) و نانوذرات آلبومین-نقره (پایین)

XRD

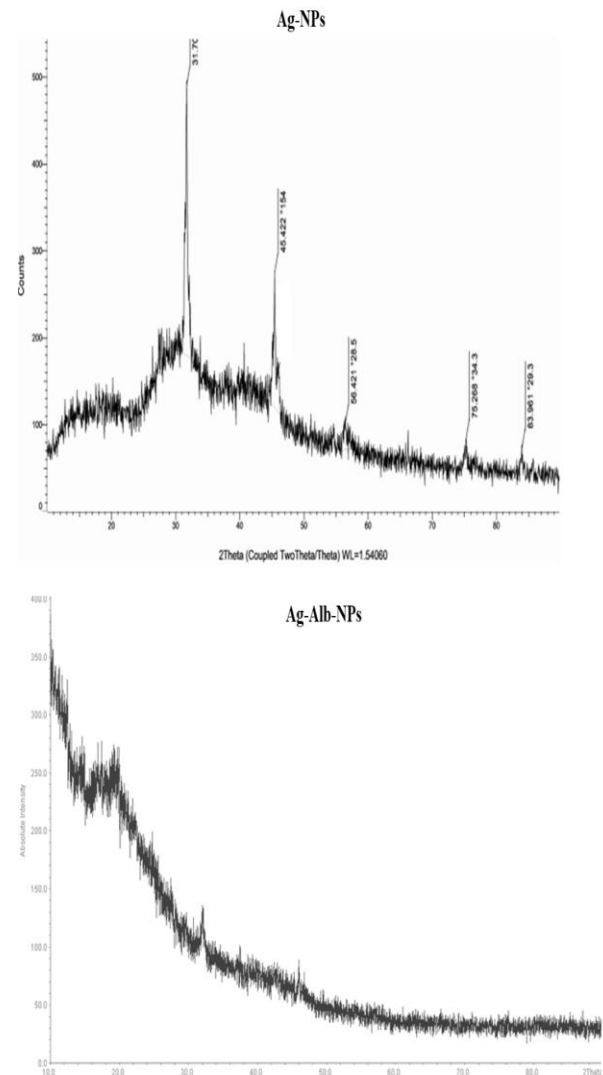
الگوهای پراش پرتو ایکس مربوط به Ag-NPs و همچنین Ag-Alb-NPs در شکل ۶ نشان داده شده است. الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به نمونه‌های Ag-NPs حاکی از ساختار کریستالی است که پیک‌های متفاوتی مشاهده می‌شود. با انطباق پیک‌های مربوط به نانوذرات نقره بر روی الگوهای پراش، مشخص شد که این نمونه مطابق با ساختار کریستالی نقره است. بر این اساس، نانوذرات نقره سنتز شده دارای ساختار کریستالی مکعبی است. در این ساختار صفحات پراش (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) و (۲۲۲) به ترتیب در زوایای 31.7° ، 45.4° ، 56.4° ، 75.3° و 83.9° مشاهده شده است (شکل ۶ بالا).

الگوی پراش اشعه ایکس از نمونه Ag-Alb-NPs حاکی از ساختار آمورف و نیمه کریستالی می‌باشد. با توجه به ساختار آمورف و نیمه کریستالی ترکیبات آلی از جمله آلبومین، طیف پراش مربوط به این نمونه پیک تیزی نشان نداده است و تنها یک پیک پهن در زاویه حدود 21° قابل مشاهده است (شکل ۶ پایین) که مشخصه سیستم‌های نیمه کریستالی است.

بنابراین، در پژوهش حاضر، نانوذرات نقره با پست بیوتیک حاصل از باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium breve* سنتز و با پروتئین آلبومین پوشش دهی شد و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه، از آلبومین سرم گاوی در پوشش دهی و پایدار سازی نانوذرات نقره استفاده شد. آلبومین سرم گاوی (BSA) یک پروتئین کروی با جرم مولکولی ۶۶۵۰۰ دالتون است که از ۵۸۳ اسید آمینه تشکیل شده است. بار خالص پروتئین در pH خنثی ۱۷- است. ۱۷ پل دی‌سولفیدی به حفظ ساختار کروی و تشکیل سه دومین ساختاری همولوگ کمک می‌کند. آلبومین‌های سرم پروتئین‌های حامل خون هستند. ساختار کروی نرم به راحتی دستخوش تغییرات ساختاری می‌شود که باعث می‌شود پروتئین به راحتی انواع مختلفی از گونه‌های محلول را در خود جای دهد و با اسیدهای چرب، لیپیدها، کاتیون‌های کوچک محلول و مولکول‌های دارویی مختلف کمپلکس تشکیل دهد و آنها را در جریان خون حمل کند. ساختار ثانویه آن اساساً مارپیچ آلفا است (۲۲). تمایل BSA به تجمع در مجموعه‌های ماکرومولکولی به تغییرات ساختاری مربوط می‌شود. پروتئین‌هایی مانند آلبومین، بسته به ویژگی‌های سطح، هنگامی که بر روی سطح غیریپولوژیکی جذب می‌شوند، تمایل زیادی به بازآرایی‌های ساختاری دارند (۲۳).

در مطالعه‌ای که توسط شارما و همکارانش در سال ۲۰۳۲ انجام شد، از گونه‌های مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برای سنتز زیستی نانوذرات نقره استفاده شد و اثرات آنتی باکتریایی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذرات با قطری حدود ۱۰ الی ۵۰ نانومتر سنتز شدند و نتایج FT-IR حاکی از وجود گروه‌های مسئول احیا یون‌های نقره به نانوذرات نقره بود (۲۴). همچنین عزیز موسوی و همکارانش از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس برای سنتز نانوذرات نقره استفاده کردند و اثرات ضد سرطانی آن را بر روی رده سلولی سرطان کولون مورد ارزیابی قرار دادند. این نانوذرات با سایزی در محدوده ۲۳۳ نانومتر باعث القا سمیت سلولی و آپتوز در رده سلولی HT-29 شدند و می‌توانند بعنوان عامل بالقوه موثر در کاربرد های درمانی و اهداف ضد سرطانی مورد استفاده قرار بگیرند (۲۵). در مطالعه دیگری که توسط Siddiqui و همکاران انجام شد، از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی برای سنتز نانوذرات نقره استفاده کردند. نانوذرات به دست آمده قطری در حدود ۵ تا ۲۰ نانومتر داشتند و اثر ضد باکتریایی بر روی باکتری های گرم مثبت و منفی نشان دادند. همچنین



شکل ۶. طیف آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD) از نانوذرات نقره (بالا) و نانوذرات آلبومین-نقره (پایین)

بحث

سنتز نانوذرات فلزات به دلیل ویژگی‌های جدید و متفاوت آنها در مقایسه با فاز ماکروسکوپی، توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده که امکان کاربردهای جذاب در زمینه‌های مختلف مانند پزشکی، بیوتکنولوژی، اپتیک، میکروالکترونیک، کاتالیز، ذخیره‌سازی اطلاعات و تبدیل انرژی را فراهم کرده است (۱۸). نانوذرات نقره دارای خصوصیات سطح ویژه بالا، اندازه بسیار کوچک (< ۲۰ نانومتر) و پراکندگی بالا هستند. روش‌های مختلف و زیادی (شیمیایی، فیزیکی و میکروبی) برای تولید نانوذرات نقره وجود دارد. اخیراً استفاده از محیط رشد پروبیوتیک‌ها در سنتز نانوذرات به دلیل کم هزینه بودن و سازگار بودن با محیط زیست بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۹-۲۱).

این نانوذرات از ایجاد بایوفیلیم به میزان معنی داری جلوگیری کردند. علاوه بر این اثر این نانوذرات بر روی رده سلولی سرطان ریه (A-549) مورد ارزیابی قرار گرفت که به طور معنی داری باعث سمیت سلولی و مهار متاستاز سلولی شدند (۲۶). خلیفا و همکارانش از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس برای سنتز نانوذرات نقره استفاده کردند. نانوذرات حاصل شده قطری در حدود ۳۳ تا ۹۰ نانومتر داشتند و توانستند اثر مهاری بر روی باکتری های مقاوم به دارو (MDR) نشان دهند (۹). Awadelkareem و همکارانش از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی برای سنتز نانوذرات نقره استفاده کردند و نانوذرات نهایی با سایز حدود ۷ نانومتر قادر به کنترل شکل گیری بایوفیلیم و مسیر کروم سنسینگ ژن های ویروالانس شدند (۲۷).

در پژوهش حاضر، سنتز میکروبی نانوذرات پروتئینی حاوی نقره با باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium breve* و ارزیابی فیزیکی و شیمیایی آن با استفاده از تکنیک های مختلف انجام شد. آنالیز XRD نشان داد که Ag-Alb-NPs دارای ساختار آمورف و نیمه کریستالی است و Ag-NPs سنتز شده دارای ساختار کریستالی مکعبی است. هر دوی TEM و SEM حاکی از کروی بودن Ag-Alb-NPs و Ag-NPs بود که مطابق با یافته های دیگر محققان است (۲۸). سایز نانوذرات ۱۰۰ نانومتر برآورد شد که نشان می دهد در محدوده مناسبی است و می توان از آن برای اهداف دارویی استفاده کرد. نتایج تست DLS نشان داد هر دوی Ag-Alb-NPs و Ag-NPs تک قله هستند. توزیع اندازه AgNPs توسط DLS تأیید شد. بیان شده است که با برهمکنش AgNP-Alb، هر دو پیک توزیع اندازه به سمت مقدار بالاتر را نشان داده که بیان کننده افزایش در اندازه متوسط است. تغییر در اندازه قطر (ΔD) را می توان به عنوان تفاوت بین قطر متوسط BSA و متوسط قطر AgNP-BSA در فرم متقابل تعریف کرد. مطالعات قبلی نشان داده اند که هنگام برهمکنش با BSA تغییر ۵-۸ نانومتر مشاهده می شود (۲۹). در مطالعه حاضر، Ag-NPs در قطر ۵۰ و ۹۰، به ترتیب اندازه های ۸۵/۳ و ۱۵۲ نانومتر را داشت (شکل ۳a). همچنین، Ag-Alb-NPs دارای اندازه ۲۵۹ نانومتر در D برابر با ۵۰ بود. مقدار ΔD بزرگتر در مطالعه کنونی را می توان با این واقعیت نسبت داد که AgNP های با اندازه بزرگتر یا AgNP های سنتز شده با رویکرد کاهش حرارتی همزمان فعالیت بیشتری دارند که در مطالعات قبلی نیز مشاهده شده بود (۳۰). این ΔD نشان دهنده جذب تعداد بیشتر مولکول BSA است.

Ag-Alb-NPs دارای پیوندهای O-H، N-H و C-H، پیوندهای C=C در حلقه های آروماتیک و پیوندهای C-N در ترکیبات آمینی و Ag-NPs دارای پیوندهای O-H، پیوندهای C-H در گروه های CH_2 و CH_3 ، پیوندهای N-H، پیوندهای C-O ساختار گروه های عاملی C-O-C و C-OH می باشد. پیوندهای آمینی با پروتئین ها می توانند به ساختار مارپیچ α کمک کنند. همانطور که نتایج FTIR نشان داد، BSA یک قله آلفا-مارپیچ در معرض 1661 cm^{-1} را در غیاب AgNP نشان داد. همچنین، طیف یک اوج متمایز را در 15224 cm^{-1} نشان داد که مربوط به صفحات بتا است. با این حال، کمپلکس Ag-Alb-NPs هیچ تغییری در اوج نشان نمی دهد که نشان می دهد صفحات β در ساختار ثانویه دست نخورده بودند. در حالی که، در حضور AgNPs، پیک آلفا-مارپیچ در معرض تغییر یافت. این تغییر در قله آلفا-مارپیچ و تغییر ناچیز در ویژگی ورق β نشان می دهد که ساختار ثانویه پروتئین BSA دست نخورده باقی می ماند و پروتئین از طریق مارپیچ α به نانوذره جذب سطحی شده است (۳۱).

اتصال محکم و اختصاصی یا غیر اختصاصی پروتئین ها با نانومواد، پوشش سطحی را تشکیل می دهد که به آن تاج پروتئینی (protein corona) می گویند (۳۲). تشکیل تاج پروتئینی به عنوان هویت بیولوژیکی نانوذرات برای تعیین عملکرد و واکنش پذیری آنها عمل می کند (۳۳). جذب و ترکیب تاج بر روی نانومواد به زمان، اندازه، شکل، خواص سطح، ترکیب شیمیایی، بار سطحی، و آگریزی سطح نانومواد بستگی دارد (۳۴). در اکثر مطالعات که اثرات خواص سطحی بر روی پروتئین و سایر جذب سطحی زیستی بررسی شده است، از پروتئین به عنوان یک ماده پوششی برای نانومواد پایدار با پذیرش بیولوژیکی بیشتر استفاده کرده اند (۳۵، ۳۶). در این مطالعه هم از آلبومین به عنوان ماده پوششی نانوذرات نقره استفاده شد. به خوبی پذیرفته شده است که سطح نانومواد پس از ورود به محیط سلولی و بیولوژیکی توسط لایه پروتئینی پوشیده می شود. سپس سیستم بیولوژیکی یا سیستم ایمنی با سطح اصلاح شده نانومواد مواجه می شود و بنابراین پاسخ های سلولی/بافتی بیشتر به ترکیب این لایه بستگی دارد. این پوشش پروتئینی همچنین بر جذب سلولی، التهاب، تجمع، تخریب و پاکسازی نانوذرات و همچنین واکنش زیستی نانوذرات تأثیر می گذارد. درک عمیق چنین تعاملاتی می تواند به سمت تولید نانومواد زیست سازگار با ویژگی های سطح کنترل شده در یک محیط زیستی هدایت شود. نانوذره سنتز شده در این پژوهش در محدوده سایز ۱۰۰ نانومتر و دارای

ساختار کریستالی آن لطمه ای وارد نشده است و این امر در نتایج FT-IR و XRD مشهود است. همچنین مشخص شد که سنتز میکروبی Ag-Alb-NPs توسط *Bifidobacterium breve* یک رویکرد دوستدار محیط با کارایی بالاست. درک پویایی این برهمکنش پیچیده پروتئین و NPs بینش مفیدی را برای توسعه/طراحی نانومواد ایمن تر و با ارزش افزوده برای کاربردهای آینده فراهم می کند.

خصوصیات کریستالی است. پوشش دهی و اتصال آلبومین بر سطح نانوذرات نقره با FT-IR و DLS اثبات شد. به طور کلی، از این مطالعه نتیجه گیری می شود که Ag-Alb-NPs خصوصیات فیزیکوشیمیایی مناسب همچون شکل کروی، اندازه مناسب، و پوشش مناسب توسط آلبومین را دارد. مواد آزاد شده در محیط کشت حاوی پروبیوتیک *Bifidobacterium breve* دارای مواد احیا کننده کافی و موثر است که منجر به سنتز زیستی نانوذرات نقره شده است و به

REFERENCES

1. Stark WJ, Stoessel PR, Wohlleben W, Hafner A. Industrial applications of nanoparticles. Chem Soc Rev 2015;44:5793-805.
2. ravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. Res Pharm Sci 2014;9:385-406.
3. Agarwal H, Nakara A, Shanmugam VK. Anti-inflammatory mechanism of various metal and metal oxide nanoparticles synthesized using plant extracts: A review. Biomed Pharmacother 2019;109:2561-2572.
4. Oza, G., et al., Plant-based metal and metal alloy nanoparticle synthesis: a comprehensive mechanistic approach. J Materials Sci 2020; 55:1309-1330. [In Ukrainian]
5. Lateef, A., S.A. Ojo, and S.M. Oladejo, Anti-candida, anti-coagulant and thrombolytic activities of biosynthesized silver nanoparticles using cell-free extract of *Bacillus safensis* LAU 13. Pro Biochem 2016;51:1406-12.
6. Elegbede JA, Lateef A, Azeez MA, Asafa TB, Yekeen TA, Oladipo IC, et al. Fungal xylanases-mediated synthesis of silver nanoparticles for catalytic and biomedical applications. IET Nanobiotechnol 2018;12:857-863.
7. Gour A, Jain NK. Advances in green synthesis of nanoparticles. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2019;47:844-851.
8. Wang X, Lee SY, Akter S, Huq MA. Probiotic-Mediated Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications against Pathogenic Strains of *Escherichia coli* O157:H7. Polymers (Basel) 2022;14:1834.
9. Khalifa E, Abdel Rafea M, Mustapha N, Sultan R, Hafez E. Silver nanoparticles synthesized by probiotic bacteria and antibacterial role in resistant bacteria. AMB Express 2023;13:140.
10. Bhuyar P, Rahim MHA, Sundararaju S. Synthesis of silver nanoparticles using marine macroalgae *Padina* sp. and its antibacterial activity towards pathogenic bacteria. Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci 2020;9:1-15.
11. Adebayo AE, Oke AM, Lateef A, Oyatokun AA, Abisoye OD, Adiji IP, et al. Biosynthesis of silver, gold and silver-gold alloy nanoparticles using *Persea americana* fruit peel aqueous extract for their biomedical properties. Nanotechnol Environ Eng 2019;4:1-15.
12. Abou El-Nour KM. Synthesis and applications of silver nanoparticles. Arab J Chem 2010;3:35-140.
13. Azeez MA, Lateef A, Asafa TB, Yekeen TA, Akinboro A, Oladipo IC. Biomedical applications of cocoa bean extract-mediated silver nanoparticles as antimicrobial, larvicidal and anticoagulant agents. J Cluster Sci 2017;28: 49-164.
14. Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. Adv Protein Chem 1994;45:153-203.
15. Joshi M, Nagarsenkar M, Prabhakar B. Albumin nanocarriers for pulmonary drug delivery: An attractive approach. J Drug Deliv Sci Technol 2020; 56: 101529.
16. Son S. Self-cross-linked human serum albumin Nano carriers for systemic delivery of polymerized siRNA to tumors. Biomaterials 2013;34:9475-9485.
17. Kudarha RR, Sawant KK. Albumin based versatile multifunctional nanocarriers for cancer therapy: Fabrication, surface modification, multimodal therapeutics and imaging approaches. Mats Sci Eng C 2017;81:607-26.
18. Lee HJ, Yeo SY, Jeong SH. Antibacterial effect of Nano sized silver colloidal solution on textile fabrics. J Mat Sci 2003; 38: 2199-2204.
19. Ghosh S, Sarkar B, Kaushik A, Mostafavi E. Nanobiotechnological prospects of probiotic microflora: Synthesis, mechanism, and applications. Sci Total Environ 2022;838:156212.

20. Gomez-Zavaglia A, Cassani L, Hebert EM, Gerbino E. Green synthesis, characterization and applications of iron and zinc nanoparticles by probiotics. *Food Res Int* 2022;155:111097.
21. Abdoli M, Mohammadi G, Mansouri K, Khaledian S, Taran M, Martinez F. A review on anticancer, antibacterial and photo catalytic activity of various nanoparticles synthesized by probiotics. *J Biotechnol* 2022;354:63-71.
22. Peters TJr. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. New York: Academic press; 1995.
23. Jahanban-Esfahlan A, Ostadrahimi A, Jahanban-Esfahlan R, Roufegarinejad L, Tabibiazar M, Amarowicz R. Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *Int J Biol Macromol* 2019;138:602-617.
24. Sharma S, Sharma N, Kaushal N. Comparative Account of Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles Using Probiotics and Their Antimicrobial Activity Against Challenging Pathogens. *BioNanoScience* 2022;12: 833-840.
25. Aziz Mousavi SMA, Mirhosseini SA, Rastegar Shariat Panahi M, Mahmoodzadeh Hosseini H. Characterization of biosynthesized silver nanoparticles using *Lactobacillus rhamnosus* GG and its in vitro assessment against colorectal cancer cells. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2020;12:740-746.
26. Siddiqui AJ, Patel M, Jahan S, Abdelgadir A, Alam MJ, Alshahrani MM, et al. Silver Nanoparticles Derived from Probiotic *Lactobacillus casei*-a Novel Approach for Combating Bacterial Infections and Cancer. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2023;12.
27. Awadelkareem AM, Siddiqui AJ, Noumi E, Ashraf SA, Hadi S, Snoussi Met al. Biosynthesized Silver Nanoparticles Derived from Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (AgNPs-LR) Targeting Biofilm Formation and Quorum Sensing-Mediated Virulence Factors. *Antibiotics (Basel)* 2023;12:986.
28. Mathew TV, Kuriakose S. Studies on the antimicrobial properties of colloidal silver nanoparticles stabilized by bovine serum albumin. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;101:14-8.
29. Huang R, Carney RP, Ikuma K, Stellacci F, Lau BL. Effects of surface compositional and structural heterogeneity on nanoparticle-protein interactions: different protein configurations. *ACS Nano* 2014;8:5402-12.
30. Dasgupta N, Ranjan S, Rajendran B, Manickam V, Ramalingam C, Avadhani GS, et al. Thermal co-reduction approach to vary size of silver nanoparticle: its microbial and cellular toxicology. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016;23:4149-63.
31. Rajeshwari A, Pakrashi S, Dalai S, Madhumita V, Iswarya N, et al., Spectroscopic studies on the interaction of bovine serum albumin with Al₂O₃ nanoparticles. *J Luminescence* 2014;145:859-865.
32. Khan S, Gupta A, Nandi CK., Controlling the Fate of Protein Corona by Tuning Surface Properties of Nanoparticles. *J Physic Chem Letters* 2013. 4:3747-3752.
33. Jain A, Ranjan S, Dasgupta N, Ramalingam C. Nanomaterials in food and agriculture: An overview on their safety concerns and regulatory issues. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018;58:297-317.
34. Babushkina EA, Belokopytova LV, Grachev A, Meko DM, Vagano EA. Variation of the hydrological regime of Bele-Shira closed basin in Southern Siberia and its reflection in the radial growth of *Larix sibirica*. *Regional Envir Change* 2017; 17:1725-37.
35. Martin MN, Allen AJ, MacCuspie RI, Hackley VA. Dissolution, agglomerate morphology, and stability limits of protein-coated silver nanoparticles. *Langmuir* 2014;30:11442-52.
36. Zheng XS, Hu P, Cui Y, Zong C, Feng JM, Wang X, et al. BSA-coated nanoparticles for improved SERS-based intracellular pH sensing. *Anal Chem* 2014;86:12250-57.