

---

# БІОСЕНСОРИ

---

# BIOSENSORS

---

---

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2019.4.189024>

## БІОСЕНСОРНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНУ В1 В СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІЙ ПРОДУКЦІЇ

*В. М. Архипова<sup>1</sup>, К. В. Степурська<sup>1</sup>, К. С. Циганенко<sup>2</sup>, Я. І. Савчук<sup>2</sup>, Г. В. Єльська<sup>1</sup>,  
С. В. Дзядевич<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,  
вул. Заболотного, 150, 03143, м. Київ, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,  
вул. Заболотного, 154, 03143, м. Київ, Україна

<sup>3</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна  
E-mail: [avalka@yahoo.com](mailto:avalka@yahoo.com), [dzyad@yahoo.com](mailto:dzyad@yahoo.com)

## БІОСЕНСОРНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНУ В1 В СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІЙ ПРОДУКЦІЇ

*В. М. Архипова, К. В. Степурська, К. С. Циганенко, Я. І. Савчук, Г. В. Єльська, С. В. Дзядевич*

**Анотація.** В роботі оптимізовано характеристики потенціометричних біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів та ефекту зворотнього інгібування холінестераз для визначення концентрацій афлатоксину В1 (АФВ1) в сільськогосподарській продукції. Біологічно активні мембрани формували зшивкою ферментів з бичим сироватковим альбуміном на поверхні перетворювачів в атмосфері насичених парів глютарового альдегіду.

Підібрано оптимальні робочі параметри біосенсорів на основі ацетилхолінестерази із електричного вугря (КФ 3.1.1.7), обрано біоселективну мембрану з 1% вмістом ферменту, підібрано концентрацію ацетилхолінхлориду як субстрату для подальшого інгібіторного аналізу АФВ1, перевірено операційну стабільність сенсора та стабільність при зберіганні. Також в роботі було вивчено вплив пробопідготовки на роботу біосенсора. Як зразки для тестування розробленого біосенсора були використані волоський горіх, горох, а

також арахіс, пшениця, овес та кукурудза, спеціально інфіковані пліснявим грибом *Aspergillus flavus* в Інституті мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України. Як контроль використовували екстракти, отримані за тією ж методикою з тих же субстратів, але не інфіковані грибом *Aspergillus*.

Проведено експерименти по кількісній оцінці змісту АФВ1 в зразках та визначено їхні концентрації.

**Ключові слова:** потенціометричний біосенсор, ацетилхолінестераза, *Aspergillus flavus*, афлатоксини

## BIOSENSORS DETERMINATION OF AFLATOXIN B1 IN AGRICULTURAL PRODUCTS

*V. M. Arkhyova, K. V. Stepurska, K. S. Tsyganenko, Ya. I. Savchuk, A. V. Elskaya, S. V. Dzyadevych*

**Abstract.** The characteristics of potentiometric biosensors based on pH-sensitive field-effect transistors and the effect of reversible cholinesterase inhibition for determination of concentrations of aflatoxin B1 (AFB1) in agricultural products are optimized. Biologically active membranes were formed by crosslinking enzymes with bovine serum albumin on the surface of the transducers in an atmosphere of saturated vapors of glutaraldehyde.

The optimal operating parameters of biosensors based on acetylcholinesterase from electric eel (KF 3.1.1.7) were determined, bioselective membrane with 1% enzyme content was selected, the concentration of acetylcholine chloride as a substrate for further inhibitory analysis of AFB1, and verifiability were received. The influence of sample preparation on the work of the biosensor was also studied.

Walnuts, peas, as well as peanuts, wheat, oats and corn, specially infected by the mold fungus *Aspergillus flavus* at the Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, were used as samples for testing the developed biosensor. As a control, extracts obtained by the same method from the same substrates but not infected with *Aspergillus* were used.

Experiments were carried out to quantify the content of AFB1 in the samples and to determine their concentrations.

**Keywords:** potentiometric biosensor, acetylcholinesterase, *Aspergillus flavus*, aflatoxins

## БИОСЕНСОРНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА В1 В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ

*В. Н. Архипова, К. В. Степурськая, К. С. Циганенко, Я. И. Савчук, А. В. Ельскаая, С. В. Дзядевич*

**Аннотация.** В работе оптимизированы характеристики потенциометрических биосенсоров на основе рН-чувствительных полевых транзисторов и эффекта обратимого ингибирования холинэстераз для определения концентраций афлатоксина В1 (АФВ1) в сельскохозяйственной продукции. Биологически активные мембраны формировали сшивкой ферментов с бычьим

сывороточным альбумином на поверхности преобразователей в атмосфере насыщенных паров глутарового альдегида.

Подобраны оптимальные рабочие параметры биосенсоров на основе ацетилхолинэстеразы из электрического угря (КФ 3.1.1.7), выбрано биоселективную мембрану с 1% содержанием фермента, подобрано концентрацию ацетилхолинхлорида в качестве субстрата для дальнейшего ингибиторного анализа АФВ1, проверено операционную стабильность сенсора и стабильность при хранении. Также в работе было изучено влияние пробоподготовки на работу биосенсора.

В качестве образцов для тестирования разработанного биосенсора были использованы грецкий орех, горох, а также арахис, пшеница, овес и кукуруза, специально инфицированные плесневым грибом *Aspergillus flavus* в Институте микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины. В качестве контроля использовали экстракты, полученные по той же методике с тех же субстратов, но не инфицированные грибом *Aspergillus*.

Проведены эксперименты по количественной оценке содержания АФВ1 в образцах и определены их концентрации.

**Ключевые слова:** потенциометрический биосенсор, ацетилхолинэстераза, *Aspergillus flavus*, афлатоксины

## Вступ

Афлатоксини – це продукти життєдіяльності мікроскопічних грибків *Aspergillus*. Плісняві грибки *Aspergillus* з'являються при неправильному зберіганні в багатьох продуктах. Афлатоксини забруднюють широкий спектр сільськогосподарської продукції та кормів, як правило, це плоди рослин з високим вмістом олії. Найбільш схильні до ураження афлатоксинами кукурудза, рис, пшениця та інші зернові, а також горіхи та спеції. Афлатоксин В1 (АФВ1) - найбільш токсичний та канцерогенний серед всіх афлатоксинів.

У зв'язку з великою його поширеністю і високою токсичністю багато країн прийняли правила, які регулюють рівень АФВ1 в продуктах, сировині та кормах.

Для контролю рівня афлатоксинів в багатьох країнах впроваджені правила, що регулюють їхній вміст. Допустимі межі афлатоксинів залежать від типу сільськогосподарської продукції. В Європейському союзі максимально допустимі концентрації встановлені на рівні  $8,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$  для АФВ1 та  $15,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$  для загального вмісту афлатоксинів в арахісі та інших олійних культур, які будуть піддаватися сортуванню або іншій фізичній обробці до споживання людиною або використання як інгредієнтів харчових продуктів. Ці межі зна-

чно нижче ( $2,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$  для АФВ1 та  $4,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$  для визначення загальної кількості афлатоксинів) для арахісу та інших олійних культур та продуктів їх переробки, призначених для безпосереднього споживання людиною. Такі ж обмеження наведені для всіх зернових і всіх продуктів, отриманих із зернових, в тому числі продукти переробки зернових, в той час як максимальні рівні для кукурудзи та рису, які будуть піддаватися сортуванню або іншій фізичній обробці до споживання людиною або використання як інгредієнтів харчових продуктів, становлять  $5,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$  для АФВ1 та  $10,0 \text{ нг} \times \text{г}^{-1}$  для загальної кількості афлатоксинів [1].

Аналіз мікотоксинів є складним завданням, тому що ці молекули присутні у складних матрицях в низьких концентраціях, вони можуть виникати в різних комбінаціях та продукуватись при цьому як одним, так і декількома видами грибів.

На сьогоднішній день більшість аналізів мікотоксинів виконуються висококваліфікованим персоналом в акредитованих лабораторіях з використанням імуноферментного аналізу (ІФА), радіоіммуноаналізу (RIA) або складніших та дорожчих методів, а саме на основі розділення токсинів за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) або газової хроматографії (ГХ) та їх детектування

за допомогою флуоресцентної спектроскопії або мас-спектрометрії. Перед стадією розділення дуже часто необхідна стадія екстракції з подальшим очищенням для зменшення або усунення небажаних компонентів матриці, та, можливо, концентрування зразку.

У ряді недавніх робіт розглянуто аналітичні методи для аналізу мікотоксинів [2-11], деякі з них з акцентом на конкретні харчові продукти [5] та конкретні групи мікотоксинів, такі як тріхотецени [6] або афлатоксини [7-8]. Також розглянуто нові тенденції в області хроматографічного/мас-спектрометричного методів та їх поєднання для визначення мікотоксинів та інших забруднюючих речовин [9-11].

Метод традиційної тонкошарової хроматографії (ТШХ) розглядається як потужний інструмент скринінгу на наявність афлатоксинів та надійний метод кількісної оцінки в поєднанні з денситометрією. Проте, не дивлячись на нові розробки в цій технології (а саме високопродуктивна ТШХ, двовимірна ТШХ, високоефективна ТШХ під тиском), тонкошарову хроматографію для кількісного аналізу афлатоксинів замінила високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ чи HPLC) [7]. Найостаннішими методами для визначення афлатоксинів в кормах та продуктах харчування є високоефективна рідинна хроматографія (HPLC) [12], мікроHPLC [13], ультра-високоефективна рідинна хроматографія (UHPLC) [14-16] або 2D-рідинна хроматографія [17]. Ці методи завдяки високій розподільній можливості дають можливість одночасного розділення не тільки різних афлатоксинів, але також і інших мікотоксинів, таких як охратоксин А, зераленон, Т-2, НТ-2 або інших класів токсинів (наприклад пестицидів). Два недавніх огляди присвячені новим тенденціям в UHPLC-MS [18] та HPLC-MS / MS [19] для різних класів забруднюючих речовин в їжі.

Паралельно з цим, в останні роки збільшилась увага до більш простих у використанні та високочутливих імуноферментних методів аналізу (ELISA). В літературі є повідомлення про використання ELISA для аналізу дезоксініваленолу [20, 21], афлатоксину В1 [21, 22], зераленону та охратоксину [21], одночасного

визначення афлатоксину В1 і афлатоксину М1 [23].

Класичні аналітичні методи визначення афлатоксинів забезпечують високу надійність та досить низькі межі виявлення речовин, але віднімають багато часу, вимагають кваліфікованого персоналу та дорогого обладнання. Інтерес до біосенсорів обумовлений їх певними перевагами перед класичними методами аналізу. Перш за все, при використанні біосенсорів відпадає необхідність у дорогому та громіздкому обладнанні. По-друге, аналіз за допомогою біосенсорів є більш простим та орієнтовним на звичайного користувача, тому не потребує спеціальних навичків. Таким чином використання біосенсорного аналізу, в цілому, є дешевшим та зручнішим. Сьогодні біосенсори широко використовуються для потреб контролю якості харчових продуктів [24]. Як інструменти скринінгу, біосенсори можуть допомогти відібрати досить певне число підозрілих зразків, що будуть додатково проаналізовані за допомогою класичних методів, тим самим знижуючи вартість і час аналізу [25].

На сьогодні в літературі пропонується низка електрохімічних біосенсорів для аналізу мікотоксинів, більшість з них орієнтовані на аналіз охратоксину та афлатоксину. В основі їхньої роботи лежить взаємодія із антитілами або аптамерами [26, 27]. Також достатня увага приділяється розробці біосенсорних експрес-методів аналізу мікотоксинів на основі ферментів [28-30]. В роботах [31-33] наведено результати по розробці лабораторних прототипів електрохімічних ферментних біосенсорів для аналізу афлатоксину В1. Але аналіз реальних зразків не є тривіальною задачею. Найбільш важливими питаннями для такого аналізу є пробопідготовка та оцінка матричного ефекту зразка. Тому представлена робота присвячена саме оптимізації параметрів біосенсора для визначення афлатоксинів в реальних зразках, що є невід'ємною частиною розробки біосенсорів для потреб моніторингу сільськогосподарської продукції.



## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### Матеріали

Для виготовлення біоселективної мембрани використовували фермент ацетилхолінестераза (АцХЕ) із *Electrophorus electricus* (ЕС 3.1.1.7) активністю 425,94 од. акт./мг (Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), сироватковий альбумін бика (БСА, фракція V) (Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) («ч.д.а.»Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), гліцерол (чистота 99%, Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина);

Як субстрат використовували ацетилхолін хлорид (АцХХ, чистота 99%) фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина).

Як інгібітори використовували наступні речовини: афлатоксин В1(чистота 98%, Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), афлатоксин G1(чистота 98%, Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина).

Фосфатний буфер був виготовлений з дігидроортофосфат калію ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (чистота 98.5%, Helicon, Росія) та гідроксиду натрію (NaOH) (чистота 99%, Helicon, Росія).

Як розчинники були використані наступні речовини: ацетонітрил (чистота 99,8%, Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), метанол (чистота 99,9% , Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), етанол (чистота  $\geq 99.8\%$ ., Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), диметилсульфоксид (ДМСО) (чистота  $\geq 99.8\%$ ., Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина).

### Потенціометричні датчики і портативний вимірювальний пристрій

Потенціометричні перетворювачі були зроблені в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України. Датчик складається з двох ідентичних пар транзисторів р-канального типу ( $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ -ISFETs), розташованих на монокристалічній кремнієвій підкладці загальною площею  $8 \times 8$  мм. Один транзистор є робочим електродом, а другий використовується як електрод порівняння. Сенсорні елементи, що використовувались в роботі, демонстрували рН-чутливість приблизно 40 мВ/рН, забезпечуючи тим са-

мим рН-чутливість струму в каналі транзистора приблизно 15-20 мкА/рН. Гранична напруга рН-ПТ складала близько 2,5 В. Виміри проводилися з початкової величини струму в каналі близько 500 мкА, напруга витік-стік складала приблизно 2 В. На рис. 1. зображено загальний вигляд сенсора та наближене зображення біоселективної мембрани, отримане за допомогою оптичної мікроскопії.

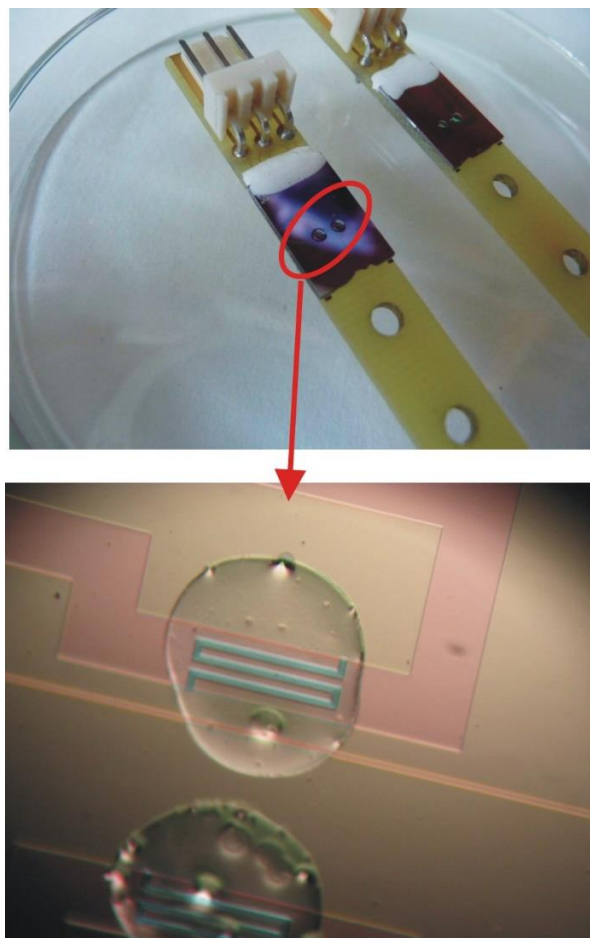


Рис. 1. Загальний вигляд потенціометричних перетворювачів та наближене зображення біоселективної та референтної мембран.

Виміри проводилися за допомогою портативного пристрою, розробленого та виготовленого в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України (рис. 2). Пристрій працює шляхом вимірювання поверхневого потенціалу на затворі транзистора з використанням вимірювальної схеми з негативним зворотнім зв'язком, що підтримує постійну величину струму в каналі

польового транзистора 0,3 мА при постійній напрузі витік-стік близько 2 В. Вихідний сигнал відповідає потенціалу затвора. Пристрій дозволяє працювати в диференціальному режимі (із 10 або 100-кратним підсиленням сигналу), а також в режимі моніторингу (тобто, вимірює різницю сигналів, отриманих з двох пар електродів або окремих сигналів від кожного з двох каналів). Інформація від датчиків імпортується в комп'ютер та обробляється за допомогою програмного забезпечення MSW\_32 (Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України).

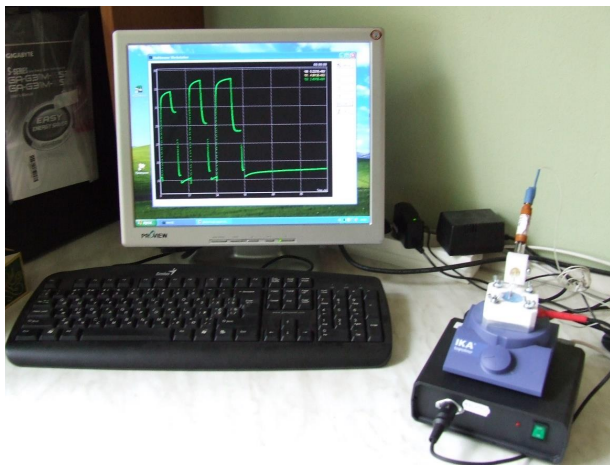


Рис. 2. Загальний вигляд портативного пристрою для вимірювань з потенціометричними біосенсорами

### Виготовлення біоселективних мембран

Біоселективні мембрани були сформовані зшивкою ацетилхолінестерази з бичачим сироватковим альбуміном на поверхні перетворювача в насичених парах глутарового альдегіду. Для виготовлення робочих біоселективних мембран використовували розчин: 1 % ацетилхолінестераза, 1 % БСА та 10 % гліцерин у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,0. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість фермента брали тільки БСА з кінцевою концентрацією 2 %. Після нанесення приготвлених розчинів на робочі поверхні перетворювачів, їх розміщували у насичених парах глутарового альдегіду на 20 хв., а потім витримували 10-15 хв. на повітрі за кімнатної температури. Після цього біосенсори

відмивали у робочому буфері протягом 15 хв. (кожні 5 хв. змінювали буфер) від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани.

### Потенціометричні вимірювання

Потенціометричні вимірювання проводилися після розміщення перетворювачів у вимірювальній комірці, заповненої 5мМ фосфатним буфером, рН 7,0. Розчин постійно переміщувався. Всі експерименти проводилися в двох або трьох серіях повторів. Неспецифічні зміни в вихідному сигналі, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища та іншими факторами були усунені за рахунок використання диференціального режиму вимірювання.

Після стабілізації диференціального вихідного сигналу в вимірювальну комірку додавали певну аліквоту концентрованого розчину субстрату, а після стабілізації відгуку на субстрат, вводили необхідні обсяги концентрованих розчинів мікотоксинів та вимірювали рівень інгібування.

### Підготовка зразків для аналізу

Для визначення афлатоксинів було використано зразки двох типів, що були підготовлені різними методами.

Зразки першого типу (кунжут, волоський горіх, зелений горошок) були придбані в магазині, висушені та подрібнені. 1 г матеріалу було змішано з 4 мл суміші ацетонітрил/вода (80:20 об/об). Отриману суспензію поміщали в горизонтальний шейкер (модель ТН 15, Edmund Bühler) на термін 2 год, після чого зразки центрифугували при 15 000 g протягом 15 хв (модель 2-16K, Sigma).

Зразки другого типу були спеціально інфіковані пліснявим грибок *Aspergillus flavus* в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Продуцент афлатоксину В1 вирощували на субстратах (пшениця, овес, кукурудза та арахіс) протягом 21 доби. На рис. 3 та 4 представлено фотографії, що демонструють процес зростання пліснявого грибка *Aspergillus flavus* на 15 добу та 21 добу відповідно.



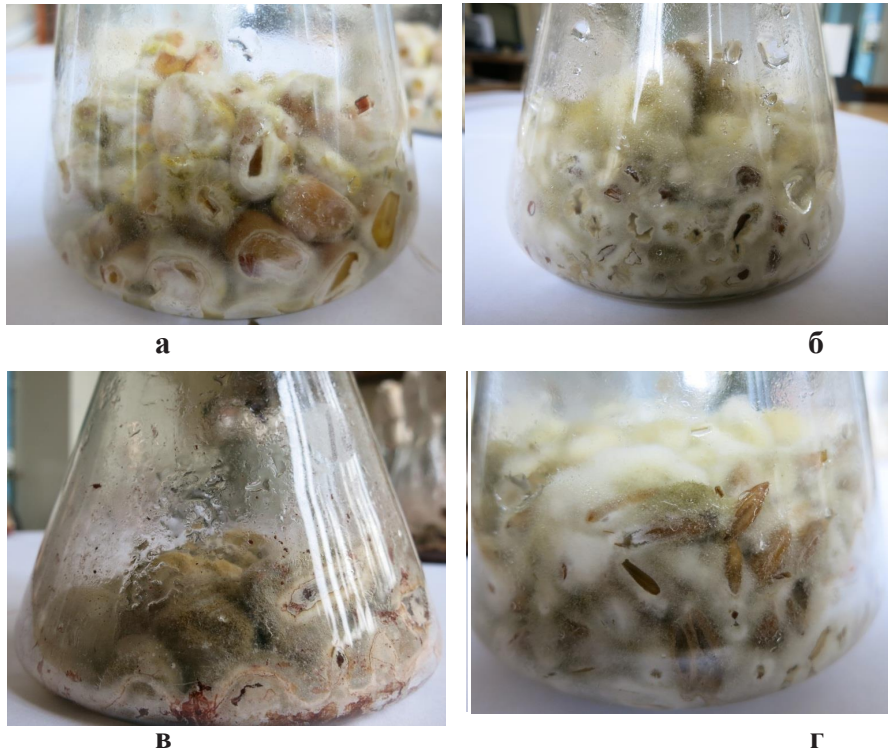


Рис. 3. Фото сільськогосподарських культур, заражених грибом *Aspergillus flavus* на 15 добу культивування (а – кукурудза, б – пшениця, в – арахіс та д – овес).



Рис.4. Фото сільськогосподарських культур, заражених грибом *Aspergillus flavus* на 21 добу культивування (а – кукурудза, б – пшениця, в – арахіс та д – овес).

Афлатоксин В1 було екстраговано із зразків згідно наступного протоколу екстракції. Заражені субстрати висушували при температурі не більше 60°C, подрібнювали до стану муки, додавали 4 % KCl та екстрагували протягом 30 хв. при інтенсивному струшуванні. Екстракцію із пшениці та вівса проводили, використовуючи ацетонітрил, а для кукурудзи та арахісу – ацетон. Отримані екстракти упарювали при нормальних умовах в темряві до повного випаровування екстрагента (розчинника). Отримані зразки були розчинені в 10 мл метанолу та відфільтровані від великих частинок, які можуть механічно пошкодити робочу мембрану біосенсора. Подальша робота проводилась із підготовленими таким чином екстрактами.

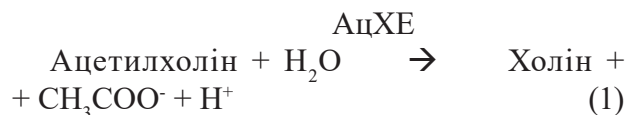
### Хроматографічний аналіз

Хроматографічний аналіз проводився за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (HPLC) в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, використовуючи систему рідинної хроматографії Agilent 1200 (Agilent technologies, USA), обладнану трьома детекторами: діодним G1315, флуоресцентним G1321A та мас-спектрометричним G1956B. Розділення проводили при швидкості потоку 0,25 мл/хв, використовуючи колонку Zorbax SB-C18 (2,1 мм×150 мм, 3,5 мкм) в режимі ізократичної елюції. Рухома фаза була MeOH/ACN/H<sub>2</sub>O 40/10/50 (об/об). УФ-детектування проводили в діапазоні 200–400 нм з особливим наголосом на 230 та 365 нм. Флуоресцентну детекцію проводили при довжині хвилі 365 нм для збудження та 455 нм для емісії. Для того, щоб підтвердити наявність афлатоксинів, використовували мас-детектор, налаштований на фіксоване значення m/z в режимі SIM. Зразки іонізували методом електростатичного розпилення (ESI) в позитивному режимі.

### Результати та їх обговорення

#### Принцип роботи біосенсора

В основі роботи біосенсора лежить ферментативна реакція, що відбувається в мембрані з ацетилхолінестеразою, нанесеній на поверхню перетворювача:



В процесі проходження ферментативної реакції ацетилхолінестераза розщеплює ацетилхолін на холін та оцтову кислоту. Оцтова кислота, в свою чергу, дисоціює, тим самим збільшуючи локальну концентрацію протонів в робочій мембрані. Зміни рН в мембрані детектуються за допомогою датчика на основі ІСПТ, що призводить до збільшення сигналу біосенсора. Подальше додавання інгібіторів ацетилхолінестерази, наприклад, афлатоксину В1, у вимірвальну комірку призводить до зменшення числа протонів, що утворюються в результаті ферментативної реакції, і відгук біосенсора зменшується (рис. 5).

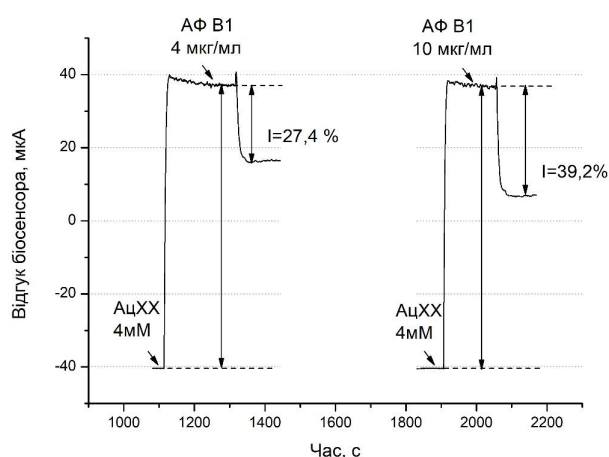


Рис. 5. Відгук потенціометричного біосенсора на 4 мМ АцХХ до та після інгібування АФВ1. Виміри проводилися в 5мМ фосфатному буфері, рН 6,5.

Порівнюючи відгуки біосенсора на субстрат до та після інгібування, можна обчислити рівень інгібування, що пропорційний концентрації інгібітора у вимірвальній комірці.

$$I = A_i / A_0 * 100 \% \quad (2)$$

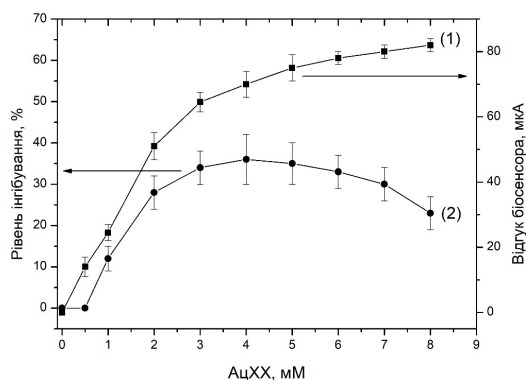
#### Підбір робочої концентрації субстрату

На першому етапі роботи необхідно було підібрати робочу концентрацію ацетилхолінхлориду як субстрату для подальшого інгібиторного аналізу. Для цього отримували відгу-



ки на різні концентрації АцХХ. Концентрації субстрату в комірці об'ємом 2 мл задавали додаванням до робочої комірки аликвот концентрованого 500 мМ розчину АцХХ. Для визначення оптимальної робочої концентрації саме для інгібіторного аналізу відгуки на різні концентрації субстрату були проаналізовані до та після інгібування 10 мг/мл АФВ1. Інгібування відбувалось додаванням до робочої комірки аликвот концентрованого розчину АФВ1 в той момент, коли взаємодія фермент-субстрат досягає динамічної рівноваги (відгук на субстрат стабілізується та виходить на «плато»). Після додавання АФВ1 до комірки відгук на субстрат зменшувався. Рівень інгібування біоселективної мембрани оцінювався відповідно до формули (2). Після кожного відгуку біосенсора на субстрат та інгібітор, біоселективний елемент відмивали від надлишку субстрату, продукту та інгібітору в робочому буфері протягом 5 хвилин, тричі змінюючи буферний розчин.

За результатами дослідження побудовано калібрувальну криву залежності величини відгуку біосенсора від концентрації субстрату (рис. 6, крива 1) та криву залежності рівня інгібування біосенсора від різних концентрації АцХХ в присутності інгібітору (рис.6, крива 2).



**Рис. 6.** Вплив різних концентрації АцХХ на відгуки потенціометричного біосенсора на основі АцХЕ (1) та на величину рівня інгібування біосенсора концентрацією 10 мкг/мл афлатоксину В1 (2). Виміри проводилися в 5мМ фосфатному буфері, рН 6,5.

Як видно з рис. 6, відгук біосенсора на субстрат лінійно зростає зі збільшенням концентрації субстрату і поступово виходить на плато. Найбільший же рівень інгібування спостерігався при концентрації 4 мМ АцХХ, а при більш високих концентраціях спостерігалось повільне зниження рівня інгібування. Така картина характерна для конкурентного інгібування, де субстрат та інгібітор конкурують за один сайт зв'язування. Тому 4 мМ АцХХ було обрано як робочу концентрацію субстрату для подальших експериментів.

### Оцінка можливості біосенсорного визначення афлатоксинів в сільськогосподарській продукції

Афлатоксини планується визначати в сільськогосподарській продукції, тому на першому етапі було досліджено вплив попередньої підготовки та матричного ефекту зразка на роботу біосенсора. Як органічний розчинник для афлатоксину було вибрано ацетонітрил, так як він найчастіше використовується в роботах для аналізу АФВ1. Для цього експерименту були відібрані незабруднені токсинами зразки кунжуту, волоського горіху та сушеного гороху. Ці зразки були підготовлені відповідно до протоколу екстракції афлатоксинів.

Відповідно до протоколу інгібіторного аналізу, після отримання відгуку на субстрат, у вимірювальну комірку додавали по 100 мкл чистого екстракту та оцінювали рівень інгібування (рис.7). Всі зразки впливали на роботу біосенсора, а рівень інгібування складав 10%. Для того, щоб переконатися, що зразки, насправді не містили токсичних речовин, а інгібування відбувається за рахунок впливу розчинника (ацетонітрилу), у вимірювальну комірку після отримання відгуку на субстрат додавали 100 мкл ацетонітрилу. Як і слід було очікувати, рівень інгібування ацетонітрилом співпадав із рівнем інгібування підготовлених зразків. Тобто компоненти зразків (якщо вони не містять токсини) не впливають на відгук біосенсора на основі АХЕ.

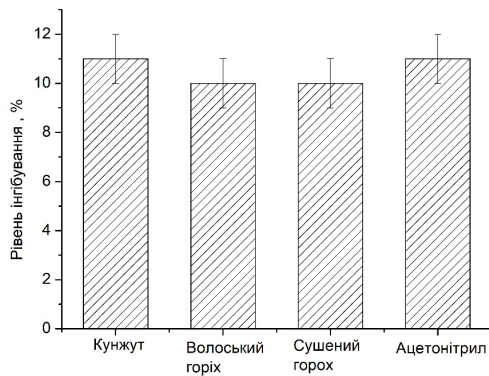


Рис. 7. Вплив зразків та ацетонітрилу на рівень інгібування. Виміри проводилися в 5мМ фосфатному буфері, рН 6,5, концентрація АцХХ - 4 мМ, додавання 100 мкл екстракту та ацетонітрилу.

Вплив розчинника на підготовлені зразки було враховано подалі. Підготовлені екстракти були спеціально забруднені концентрованим розчином афлатоксину В1. В ході експерименту, після отримання відгуку на субстрат, у вимірювальну комірку додавали 100 мкл зразку із відомою концентрацією афлатоксину. Ті ж самі концентрації афлатоксину були додані у вимірювальну комірку разом із чистим розчинником. За результатами експерименту були побудовані калібрувальні криві визначення АФВ1 в забруднених екстрактах реальних зразків (рис.8).

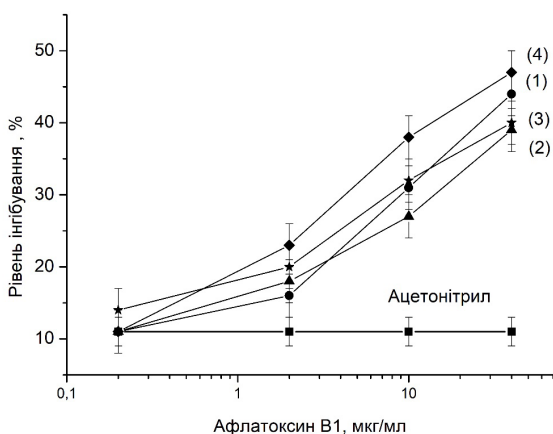


Рис. 8. Залежність рівня інгібування біосенсора від концентрації штучно доданого афлатоксину В1 в екстракти із реальних зразків (кунжут(1), волоський горіх(2), сушений горіх(3) та ацетонітрил (4)). Виміри проводилися в 5мМ фосфатному буфері, рН 6,5, концентрація АцХХ - 4 мМ, додавання 100 мкл екстракту.

Як видно, розроблений біосенсор був чутливий до афлатоксину в зразках, і всі калібрувальні криві знаходились приблизно в тому ж діапазоні, тобто існує принципова можливість аналізу афлатоксину В1 в реальних зразках.

### Вибір розчинника для екстракції афлатоксинів

На наступному етапі роботи було перевірено вплив різних розчинників афлатоксинів на роботу біосенсора на основі АцХЕ при додаванні різних об'ємів у вимірювальну комірку (Рис. 8). Для експерименту були обрані етанол, диметилсульфоксид (ДМСО), ацетонітрил та метанол, які найчастіше використовують для розчинення афлатоксину.

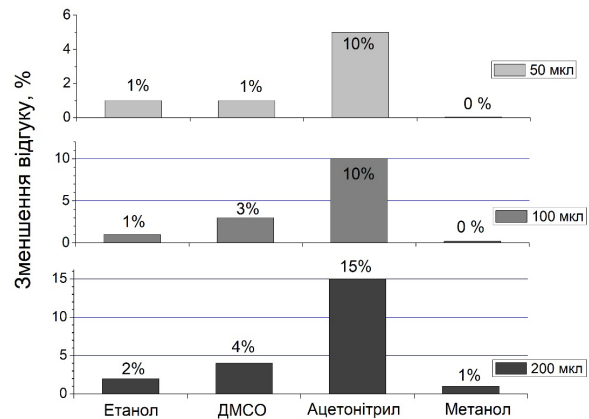


Рис. 9. Вплив різних об'ємів (50 мкл, 100 мкл і 200 мкл) розчинників афлатоксинів (етанол, ДМСО, ацетонітрил і метанол) у вимірювальній комірці на відгук біосенсора на основі АцХЕ.

З графіку видно, що метанол найменше впливає на роботу біосенсора, тому його було обрано для подальшої роботи як розчинник афлатоксинів.

### Аналіз афлатоксинів в інфікованих зразках сільськогосподарської продукції

На наступному етапі було перевірено зразки пшениці, вівса та кукурудзи, інфіковані афлатоксином В1. Із інфікованих та контрольних зразків готувались екстракти, після додавання яких до вимірювальної комірки оцінювали рівень інгібування біосенсора. Також ці зразки були проаналізовані за допомогою

високоєфективної рідинної хроматографії.

Спочатку будувалась калібрувальна крива залежності рівня інгібування біосенсора від концентрації афлатоксину В1. Стоковий розчин афлатоксину В1 було отримано за допомогою розведення 5 мг сухої речовини у 1 мл метанолу. На рис. 10 представлено отриману калібрувальну криву для визначення АФВ1 в лінійних і напівлогарифмічних координатах.

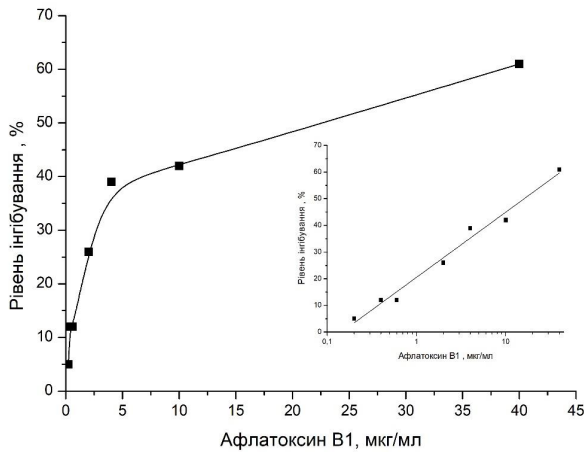


Рис. 10. Калібрувальна крива для визначення АФВ1 в лінійних і напівлогарифмічних координатах.

З графіку видно, що біосенсор характеризувався лінійним діапазоном визначення АФВ1 в межах від 0,2 мкг/мл до 2 мкг/мл.

На рис. 11 представлено кінетику впливу контрольного зразка екстракту вівса та послідовне інгібування біоселективного елемента екстрактом із інфікованого зразка.

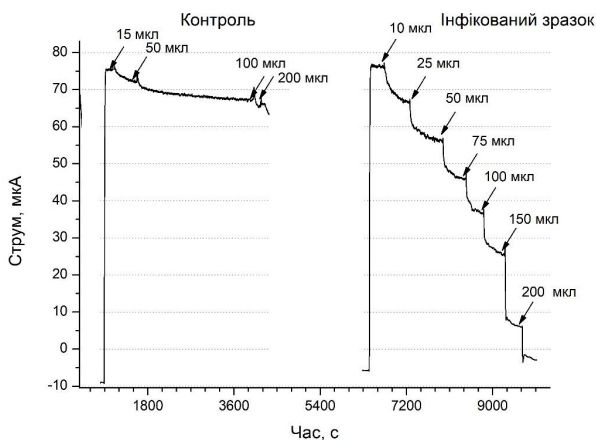


Рис. 11. Відгуки біосенсора на додавання різних об'ємів зразків контрольного екстракту і екстракту з інфікованого вівса.

Наступна серія експериментів була проведена із зразками, отриманими з кукурудзи. Вимірювання проводили як інфікованого, так і контрольного зразків. Також як один із видів контролю після отримання відгуків на контрольний зразок було отримано серію відгуків на ті ж самі об'єми чистого метанолу, щоб впевнитись, що зменшення відгуку відбувається не за рахунок впливу розчинника (рис. 12).

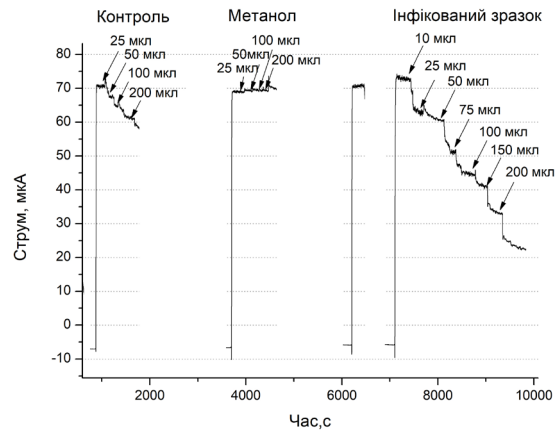


Рис. 12. Відгуки біосенсора на додавання різних об'ємів контрольного зразка, відповідного об'єму розчинника метанолу та інфікованої кукурудзи.

Результати підтвердили, що метанол (в тих концентраціях, які використовуються в експерименті) не впливає на роботу біосенсора, існує невеликий «матричний ефект» та досить сильний вплив на відгук інфікованого зразка.

Наступні експерименти проводились з інфікованою та контрольною пшеницею (рис. 13).

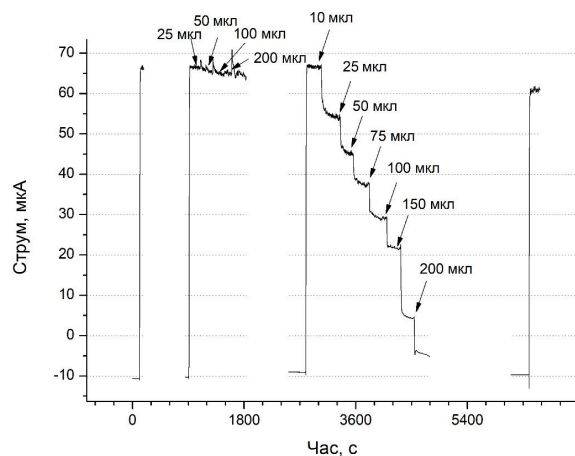


Рис. 13. Відгуки біосенсора на додавання різних об'ємів зразків контрольного екстракту і інфікованої пшениці.



З рисунку добре видно, що інгібування біоселективної мембрани контрольним зразком практично не відбувається, в той час як інфікований екстракт (як і в попередніх експериментах) досить сильно інгібує активність ферментної мембрани.

Проведення вимірювань із зразками, отриманими із заражених горіхів та контрольної

Таким чином біосенсори на основі АцХЕ можуть бути використані як швидкі скринінгові методи попередньої діагностики вмісту афлатоксинів в зразках сільськогосподарської продукції.

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках цільової програми на-

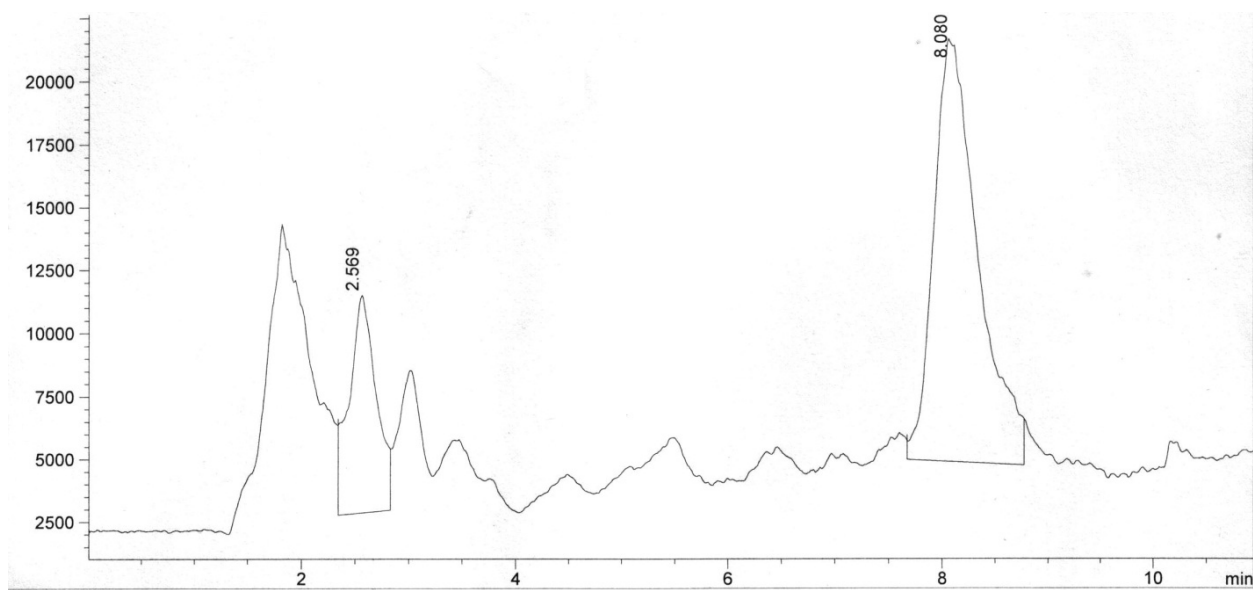


Рис. 14. Хроматограма екстракту інфікованого зразку пшениці. Флуоресцентна детекція (збудження: 355 нм, емісія: 465 нм).

партії виявилось практично неможливим в силу того, що в екстракті горіхів дуже високий вміст жирів. Тому екстракти вийшли дуже маслянистими, що призводило до утворення плівок як на поверхні вимірювальної комірки, так і на поверхні селективного елемента. Доступність активних речовин в мембрану різко обмежувалась і ми не отримували навіть відтворених відгуків на субстрат АцХХЛ. Тому такі експерименти були відкладені.

Ці ж самі зразки були проаналізовані методом високоефективної рідинної хроматографії із використанням флуоресцентного детектора та мас-спектрометра (рис 14). Серед різних токсинів, які можуть продукувати гриби роду *Aspergillus* в зразках було знайдено тільки АФВ. Цей результат підтверджує наявність інгібіторів ацетилхолінестерази в зразку, вже виявлених за допомогою біосенсора.

укових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій».

### Список використаної літератури

- [1]. European Commission, 2014. COMMISSION REGULATION (EC) No1881/2006 on setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Amended values. Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20140701&from=FR>
- [2]. L. Anfossi, C. Giovannoli, C. Baggiani. Mycotoxin detection // *Curr. Opin. Biotechnol.* 37, pp. 120–126 (2016).
- [3]. A. W. Turner, H. Bramhmbhatt, M. Szabo-Vezse, A. Poma, R. Coker, S. A. Piletsky.

- Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014) // *Anal. Chim. Acta*, 901 pp. 12-33 (2015).
- [4]. J. N. Selvaraj, L. Zhou, Y. Wang, Y.-J. Zhao, F.-G. Xing, X.-F. Dai, Y. Liu. Mycotoxin detection - Recent trends at global level // *J. Integr. Agr.*, 14, pp. 2265–2281 (2015).
- [5]. V. L. Pereira, J. O. Fernandes, S. C. Cunha. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis // *Tr. Food Sci. Technol.*, 36, pp. 96-136 (2014).
- [6]. J. P. Meneely, F. Ricci, H. P. van Egmond, C. T. Elliott. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food // *Trends Anal. Chem.*, 30, pp. 192-203 (2011).
- [7]. H. Yao, Z. Hruska, J. Diana Di Mavungu. Developments in detection and determination of aflatoxins // *World Mycotoxin J.*, 8, pp. 181-191 (2015).
- [8]. G. S. Shephard. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century // *Anal. Bioanal. Chem.*, 395, pp. 1215–1224 (2009).
- [9]. P. Li, Z. Zhang, X. Hu, Q. Zhang. Advanced hyphenated chromatographic-mass spectrometry in mycotoxin determination: current status and prospects // *Mass Spectrom. Rev.*, 32, pp. 420–452 (2013).
- [10]. A. Garrido Frenich, R. Romero-Gonzalez, M. M. Aguilera-Luiz. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS // *Trends Anal. Chem.*, 63, pp. 158–169 (2014).
- [11]. J. O'Mahonya, L. Clarke, M. Whelan, R. O'Kennedy, S. J. Lehotay, M. Danaher. The use of ultra-high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection in the analysis of agrochemical residues and mycotoxins in food – Challenges and applications // *J. Chrom. A*, 1292, pp. 83–95 (2013).
- [12]. M. Solfrizzo, A. De Girolamo, V. M. T. Lattanzio, A. Visconti, J. Stroka, A. Alldrick, H. P. van Egmond. Results of a proficiency test for multi-mycotoxin determination in maize by using methods based on LC-MS/MS // *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods*, 5 (1), pp. 15–48 (2013).
- [13]. S. Hickert, J. Gerding, E. Ncube, F. Hübner, B. Flett, B. Cramer, H.-U. Humpf. A new approach using micro HPLC-MS/MS for multi-mycotoxin analysis in maize samples // *Mycotoxin Res.*, 31, 109-115 (2015).
- [14]. G. Martínez-Domínguez, R. Romero-González, A. Garrido Frenich. Multi-class methodology to determine pesticides and mycotoxins in green tea and royal jelly supplements by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry // *Food Chem.*, 197, pp. 907–915 (2016).
- [15]. C.-D. Liao, J. W. Wong, K. Zhang, P. Yang, J. B. Wittenberg, M. W. Trucksess, D. G. Hayward, N. S. Lee, J. S. Chang. Multi-mycotoxin Analysis of Finished Grain and Nut Products Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography and Positive Electrospray Ionization–Quadrupole Orbital Ion Trap High-Resolution Mass Spectrometry // *J. Agric. Food Chem.*, 63, pp. 8314–8332 (2015).
- [16]. C. McElhinney, P. O'Kiely, C. Elliott, M. Danaher. Development and validation of an UHPLC-MS/MS method for the determination of mycotoxins in grass silages // *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32, p. 2101–2112 (2015).
- [17]. A. Breidbach, F. Ulberth. Two-dimensional heart-cut LC-LC improves accuracy of exact-matching double isotope dilution mass spectrometry measurements of aflatoxin B1 in cereal-based baby food, maize, and maize-based feed // *Anal. Bioanal. Chem.*, 407, pp. 3159–3167 (2015).
- [18]. A. Garrido Frenich, R. Romero-Gonzalez, M. M. Aguilera-Luiz. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS // *Trends Anal. Chem.*, 63, pp. 158–169 (2014).
- [19]. J. O'Mahonya, L. Clarke, M. Whelan, R. O'Kennedy, S. J. Lehotay, M. Danaher. The use of ultra-high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection in the analysis of agrochemical residues

- and mycotoxins in food – Challenges and applications // *J. Chrom. A*, 1292, pp. 83–95 (2013).
- [20]. Z. Dzuman, M. Vaclavikova, I. Polisen-ska, Z. Veprikova, M. Fenclova, M. Zachari-asova, J. Hajslova. Enzyme-linked immuno-sorbent assay in analysis of deoxynivalenol: investigation of the impact of sample matrix on results accuracy // *Anal. Bioanal. Chem.*, 406 (2), pp. 505–14 (2014).
- [21]. H. Du, J. Liu, Y. Xun, J. Liang, S. Li, and G. Chen. Determination of Deoxynivalenol, Zearalenone, Aflatoxin B1, and Ochratoxin by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay // *Anal. Lett.*, 47 (11), pp. 1912–1920 (2014).
- [22]. B. H. Liu, Y. T. Hsu, C. C. Lu, F. Y. Yu. Detecting aflatoxin B1 in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immu-nosorbent assay and gold nanoparticle im-munochromatographic strip // *Food Control*, 30 (1), pp. 184–189 (2013).
- [23]. W. Jiang, Z. Wang, G. Nölke, J. Zhang, L. Niu, J. Shen. Simultaneous Determination of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 in Food Matrices by Enzyme-Linked Immunosor-bent Assay // *Food Anal. Methods*, 6 (3), pp. 767–774 (2013).
- [24]. V. Scognamiglio, F. Arduini, G. Palleschi, G. Rea. Biosensing technology for sustain-able food safety // *Trends Anal. Chem.*, 62, pp. 1-10 (2014).
- [25]. T. F. McGrath, C. T. Elliott, T. L. Fodey. Biosensors for the analysis of microbio-logical and chemical contaminants in food // *Anal. Bioanal. Chem.*, 403, pp. 75–92 (2012).
- [26]. J. C. Vidal, L. Bonel, A. Ezquerra, S. Hernández, J. R. Bertolín, C. Cubel, J. R. Castillo. Electrochemical affinity biosensors for detection of mycot oxins: A review // *Bi-osen. Bioelectron.* 49, pp. 146–158 (2013).
- [27]. L. Reverte, B. Prieto-Simon, M. Campas. New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems. A review // *Anal. Chim. Acta*, 908, pp. 8-21 (2016).
- [28]. M. A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. D. T. Román, M. J. Arcos-Mar-tínez, Horseradish peroxidase-screen printed biosensors for determination of Ochratoxin A // *Anal. Chim. Acta.*, pp. 49–53 (2011).
- [29]. M. A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. Ferreira-Gonçalves, M. J. Arcos-Martínez. Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A // *Biosens. Bioelectron.*, 25, pp. 1333–1337 (2010).
- [30]. S. C. Li, J. H. Chen, H. Cao, D. S. Yao, D. L. Liu. Amperometric biosensor for af-latoxin B-1 based on aflatoxin-oxidase im-mobilized on multiwalled carbon nanotubes // *Food Control*, 22, pp. 43-49 (2011).
- [31]. O. S. Burdak, O. O. Soldatkin, T. A. Ser-geyeva, V. M. Arkhypova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin. Acetylcholinesterase-based conductometric biosensor for determination of aflatoxin B1 // *Sensors and Actuators B*. 188, pp. 999-1003 (2013).
- [32]. K. V. Stepurska, O. O. oldatkin, I. S. Kucherenko, V. M. Arkhypova, S. V. Dzy-adevych, A. P. Soldatkin. Feasibility of appli-cation of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analy-sis of toxic compounds of different nature. // *Anal. Chim. Acta*, 854, pp. 161-168 (2015).
- [33]. K. V. Stepurska, O. O. Soldatkin, V. M. Arkhypova, A. P. Soldatkin, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault, S. V. Dzyadevych. De-velopment of novel enzyme potentiomet-ric biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for aflatoxin B1 analysis in real samples // *Talanta*, 144, pp. 1079–1084 (2015).

Стаття надійшла до редакції 09.12.2019 р.



UDC: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2019.4.189024>

## BIOSENSORS DETERMINATION OF AFLATOXIN B1 IN AGRICULTURAL PRODUCTS

*V. M. Arkhypova<sup>1</sup>, K. V. Stepurska<sup>1</sup>, K. S. Tsyganenko<sup>2</sup>, Ya. I. Savchuk<sup>2</sup>, A. V. Elskaya<sup>1</sup>,  
S. V. Dzyadevych<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine,  
150 Zabolotnogo Str., 03143, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Zabolotnogo Institute of Microbiology and Virology,  
154 Zabolotnogo Str., 03143, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv,  
64 Volodymyrska Str., 01003, Kyiv, Ukraine  
E-mail: [avalka@yahoo.com](mailto:avalka@yahoo.com), [dzyad@yahoo.com](mailto:dzyad@yahoo.com)

### Summary

**Aim:** optimization of potentiometric biosensor characteristics based on pH-sensitive field-effect transistors and the effect of reversible cholinesterase inhibition for determination of aflatoxin B1 concentrations in agricultural products.

**Methods.** The biosensor is based on pH-sensitive field-effect transistors with immobilized acetylcholinesterase. Biologically active membranes were formed by crosslinking enzymes with bovine serum albumin on the surface of the transducers in an atmosphere of saturated vapors of glutaraldehyde. In the process of enzymatic reaction, protons are produced, which leads to a change in the pH in the membrane and an increase in the biosensor signal. Further addition of acetylcholinesterase inhibitors, such as aflatoxin B1, into the measuring cell leads to a decrease in the number of protons formed by the enzymatic reaction, and the response of the biosensor decreases.

**Results.** The optimal operating parameters of biosensors based on acetylcholinesterase from electric eel were selected, the bioselective membrane was selected with 1% enzyme content, the concentration of acetylcholine chloride was selected as a substrate for further inhibitory analysis of AFB1, the operative stability was checked and the stability was maintained. The influence of sample preparation on the work of the biosensor was also studied. Experiments were carried out to quantify the content of AFB1 in the samples and to determine their concentrations.

**Conclusions.** Conducted experiments to quantify the content of AFB1 in evidence that biosensors based on acetylcholinesterase can be used as rapid screening methods for the preliminary diagnosis of aflatoxin content in agricultural samples.

**Keywords:** potentiometric biosensor, acetylcholinesterase, *Aspergillus flavus*, aflatoxins

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2019.4.189024>

## БІОСЕНСОРНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АФЛАТОКСИНУ В1 В СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІЙ ПРОДУКЦІЇ

В. М. Архипова<sup>1</sup>, К. В. Степурська<sup>1</sup>, К. С. Циганенко<sup>2</sup>, Я. І. Савчук<sup>2</sup>, Г. В. Єльська<sup>1</sup>,  
С. В. Дзядевич<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,  
вул. Заболотного, 150, 03143, м. Київ, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,  
вул. Заболотного, 154, 03143, м. Київ, Україна

<sup>3</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

**E-mail:** [avalka@yahoo.com](mailto:avalka@yahoo.com), [dzyad@yahoo.com](mailto:dzyad@yahoo.com)

### Реферат

**Мета:** оптимізація характеристик потенціометричних біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів та ефекту зворотнього інгібування холінестераз для визначення концентрацій афлатоксину В1 в сільськогосподарській продукції.

**Методи дослідження.** Біосенсор базується на рН-чутливих польових транзисторах з іммобілізованою ацетилхолінестеразою. Біологічно активні мембрани формували зшивкою ферментів з бичачим сироватковим альбуміном на поверхні перетворювачів в атмосфері насичених парів глутарового альдегіду в процесі ферментативної реакції продукуються протони, що призводить до зміни рН в мембрані і збільшення сигналу біосенсора. Подальше додавання інгібіторів ацетилхолінестерази, наприклад, афлатоксину В1, у вимірювальну комірку призводить до зменшення числа протонів, що утворюються в результаті ферментативної реакції, і відгук біосенсора зменшується.

**Результати дослідження.** Підібрано оптимальні робочі параметри біосенсорів на основі ацетилхолінестерази із електричного вугря, обрано біоселективну мембрану з 1% вмістом ферменту, підібрано концентрацію ацетилхолінхлориду як субстрату для подальшого інгібіторного аналізу АФВ1, перевірено операційну стабільність сенсора та стабільність при зберіганні. Також в роботі було вивчено вплив пробопідготовки на роботу біосенсора. Проведено експерименти по кількісній оцінці змісту АФВ1 в зразках та визначено їхні концентрації.

**Висновки.** Проведені експерименти по кількісній оцінці змісту АФВ1 в свідчать, що біосенсори на основі АцХЕ можуть бути використані як швидкі скринінгові методи попередньої діагностики вмісту афлатоксинів в зразках сільськогосподарської продукції.

**Ключові слова:** потенціометричний біосенсор, ацетилхолінестераза, *Aspergillus flavus*, афлатоксини