

УДК: 602.1.53.082.9:615.372

¹Н. Ф. Шпирка, аспірант

¹М. В. Таран, аспірант

¹Ю.В. Рубан, аспірант

¹О. Ю. Паренюк, канд. біол. наук

²Р.В. Вітер, канд. фіз.-мат. наук

¹К. Є. Шаванова, канд. біол. наук

¹Національний університет біоресурсів і природокористування
України

²Латвійський університет
(Київ, Україна)

РОЗРОБКА НОВОГО МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ОХРАТОКСИНУ А НА ОСНОВІ ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ НАНОЧАСТИНОК ОКСИДУ ЦИНКУ

Проблема безпечності харчової продукції та кормової сировини зараз набуває особливої актуальності. Охратоксин А (ОТА) є одним з найнебезпечніших мікотоксинів, природним забруднювачем зернових та бобових культур, продуцентами якого є гриби роду *Aspergillus* і *Penicillium*.

Нами було розроблено і протестовано новий метод визначення охратоксину А на основі фотолюмінесценції наночастинок оксиду цинку. Для цього використовували волоконно-оптичний спектрометр, за допомогою якого реєстрували спектри фотолюмінесценції мікотоксину на поверхні ZnO.

У результаті проведених досліджень нами було підтверджено ефективність використання оксиду цинку як нового матеріалу для трансдьюсерних поверхонь та реалізовано алгоритм іммобілізації біологічних компонентів на поверхні ZnO нанородів. Зниження інтенсивності фотолюмінесценції свідчить про утворення біокомплексу на поверхні нанородів оксиду цинку за принципом «ключ-замок».

Визначення вмісту охратоксину А імунним біосенсором на основі оксиду цинку має достатню специфічність реакції, враховуючи значне зниження сигналу при внесенні концентрацій в діапазоні від 0,01 до 5,0 нг/мл.

Ключові слова: мікотоксини, охратоксин А, іммобілізація, оксид цинку, фотолюмінесценція.

Постановка проблеми. Щороку в Україні загострюється проблема мікотоксикозів, що виникають через споживання продуктів харчування та кормів, уражених мікотоксинами.

Численні дослідження вказують на високий відсоток (від 30 до 45%) контамінації рослинної сировини різними мікотоксинами або мікроскопічними грибами [1, с. 26-27; 2, с. 174-177].

Ураження зернових посівів грибами роду *Aspergillus* і *Penicillium* призводить до забруднення сировини різними видами мікотоксинів, одним з яких є охратоксин А. Мікотоксини – це вторинні метаболіти

мікроскопічних грибів, які є токсичними для тварин і людини [3, с. 249-255].

Хімічна структура молекули охратоксину А (рис. 1) має похідне β – фенілаланін-дигідроізокумарин, який є стійким до високих температур та стабільним до гідролізу, а, отже, обробка кормової сировини та рослинної харчової продукції не розкладає мікотоксин, і він залишається в кінцевих продуктах переробки [4, с.182-186; 5, с. 31-42].

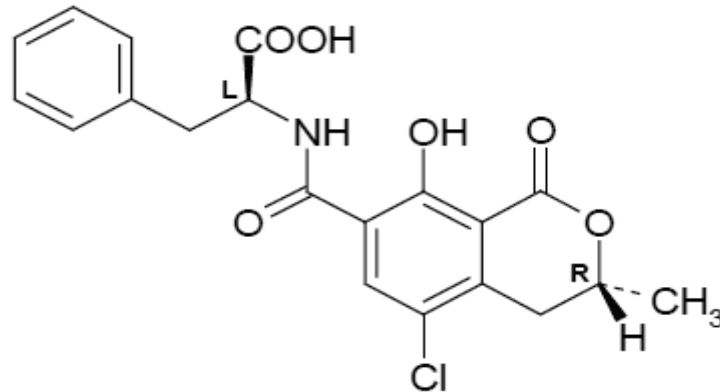


Рис. 1. Структурна формула охратоксину А

Забруднення охратоксином А може відбуватися в період дозрівання і збирання врожаю зернових культур за несприятливих метеорологічних умов і неправильного зберігання, саме тому сільськогосподарський ринок має нагальну потребу у розвитку системи контролю якості продукції, яка б здійснювала швидкий аналіз різних сільськогосподарських об'єктів.

Оксид цинку (ZnO) інтенсивно досліджувався протягом декількох десятиліть, але останнім часом значні розробки здійснюються в області отримання його наноструктур та вивчення їхніх властивостей [6, с. 2643-2647]. Наноструктури ZnO мають ряд специфічних властивостей, що робить їх потенційно корисними для використання при проведенні біоаналітичних вимірювань та конструюванні біосенсорів. За рахунок унікального поєднання люмінесцентних, напівпровідникових та п'єзоелектричних властивостей ZnO може використовуватися для створення сенсорів, що базуються на різних принципах реєстрації сигналу [7, с. 233-244; 8, с. 2028-2034].

Такі традиційні методи діагностики мікотоксикозів як імуноферментний аналіз (ІФА) та вискоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) є досить коштовними, складними та потребують спеціального обладнання і реагентів.

Оскільки важливо проводити аналіз параметрів якості продукції на вміст мікотоксинів у реальному часі на всіх стадіях вирощування, обробки і транспортування продукції, то розробка нового методу

діагностики вмісту охратоксину А з використанням оптичних біосенсорів на основі фотолюмінесценції (ФЛ) наноструктур оксидів металів дасть змогу у польових умовах та у режимі реального часу здійснювати скринінгові дослідження рослинної продукції на вміст різних типів мікотоксинів.

Мета дослідження – випробувати новий метод визначення охратоксину А використанням ефекту фотолюмінесценції оксиду цинку.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження були проведені протягом 2016 р. на базі Національного університету біоресурсів і природокористування України (м. Київ, Україна) та Інституту ядерної фізики і спектроскопії Латвійського університету (м. Рига, Латвія).

Під час проведення досліджень використовували волоконно-оптичний спектрометр (Ocean Optics HR2000) з діапазоном світіння 360-420 нм для реєстрації спектрів фотолюмінесценції охратоксину А на поверхні ZnO, метод скануючої електронної мікроскопії (SEM) для вивчення мікроструктури нанородів оксиду цинку.

Охратоксин А (Sigma Aldrich) готували шляхом розчинення токсину в ацетонітрилі в концентрації 1 мг/мл з використанням фосфатного буферу (рН 7,4) для подальших розведень. Моноклональні антитіла, білок А і БСА готували в PBS (рН 7,4) і використовували для подальших розведень.

ZnO (Sigma Aldrich), форма – нанопорошок, (зразок ~ 80% Zn основи, розмір часток <100 нм, площа поверхні 15-25 м²/г) розчиняли в бутанолі в концентрації 1 мг/мл та гомогенізували ультразвуком протягом 30 хв. На окремі скляні пластинки наносили по 20 мкл розчину ZnO наностержнів для формування поверхні ZnO/скло. Зразки просушували при кімнатній температурі, потім випалювали в муфельній печі протягом 3 год за температури 400°C.

На поверхні зразків ZnO протягом 20 хв адсорбували білок А (20 мкг/ мл) та промивали фосфатним буфером (рН 7,4). Потім інкубували 20 мкг/ мл охратоксину А протягом 20 хв та для запобігання неспецифічної адсорбції інкубували розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА) протягом 20 хв на поверхні ZnO.

Імобілізація всіх біологічних компонентів проводилась в ексікаторі за підтримання вологого середовища з часом експозиції розчинів у 20 хв, що є достатнім для ефективною фіксації сполук на поверхні ZnO наностержнів.

Перед кожним наступним внесенням речовини поверхня промивалася PBS (рН 7,4). Кожен крок імобілізації записували через зміну інтенсивності фотолюмінесценції. Робочий розчин охратоксину А вносили у колонку в різних концентраціях для встановлення і реєстрації найбільш оптимальної взаємодії біомолекул і визначення

чутливості біосенсора. Спектри ФЛ реєстрували після кожної іммобілізації біомолекул на поверхні ZnO [9, с. 233-239].

Результати дослідження. Морфологію поверхні наночастинок оксиду цинку було охарактеризовано за допомогою методу скануючої електронної мікроскопії (SEM). З рис. 2а видно, що поверхня сукупності наночастинок оксиду цинку щільно складена з субмікронного розміру агрегатів ZnO.

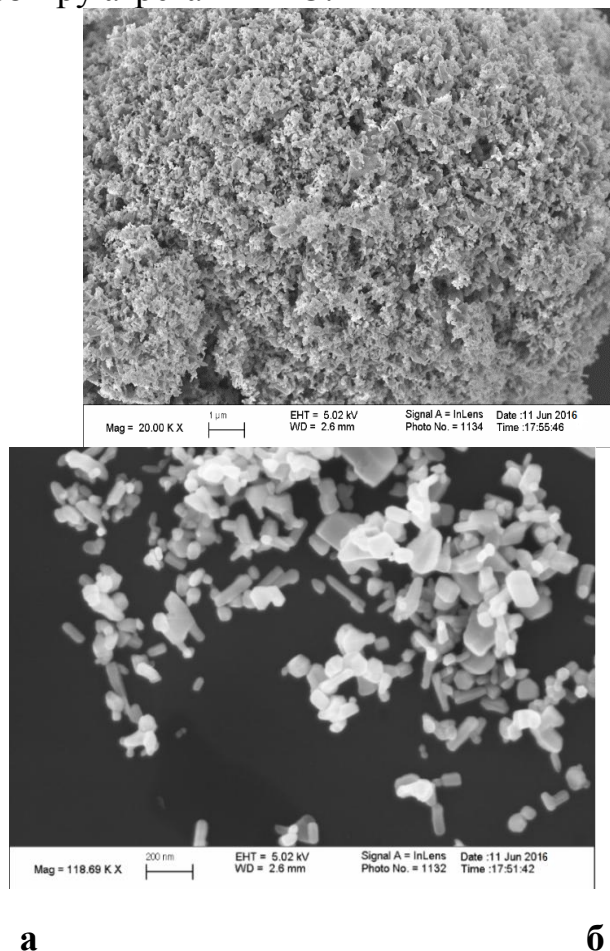


Рис. 2. SEM наночастинок оксиду

Ці агрегати мають розмір з діаметром від декількох десятків до сотні нанометрів, саме тому на зображеннях видно невпорядковану структуру. З рис. 2б видно, що у разі збільшення, зображення SEM показує, що наночастинки ZnO мають сферичну форму, але внаслідок дії різних чинників, наприклад, зі зростанням температури синтезу, ступінь сферичної агломерації нанокристалітів поступово руйнується, саме тому, на рис. 2б ми спостерігаємо зразки наночастинок гексогональної, кубічної, прямокутної, овальної структури.

Для контролю адсорбції біомолекул на поверхні ZnO застосовували метод фотолюмінесценції. Використання білка А, який дозволяє здійснити іммобілізацію антитіл охратоксину А зручним

орієнтованим способом, де шар антитіл, що мають вільні антиген-зв'язуючі сайти, направлені в бік розчину, значно підвищує кількість адсорбованого антигену, а отже, і величину показника фотолюмінесценції (рис. 3). Адсорбція бичачого сироваткового альбуміну (БСА) для блокування вільних місць на поверхні оксиду цинку призвела до зниження ФЛ порівняно з уже сформованими шарами біокомпонентів.

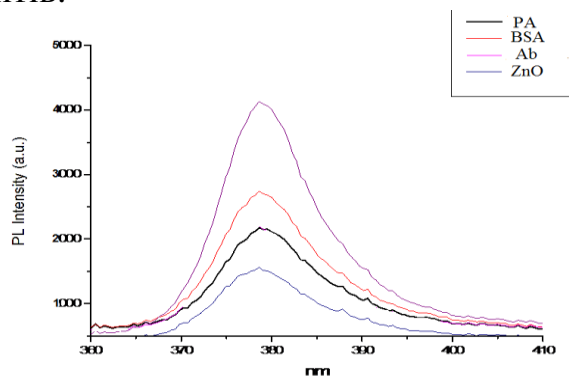


Рис. 3. Спектри фотолюмінесценції ZnO після адсорбції на поверхні біоселективного шару ZnO-білок А (РА)-антитіла охратоксину А (Ab)- BSA

Варто зазначити, що відповідно до процедури модифікація по БСА була взята як кінцева стадія з утворенням біоселективного шару біосенсора. Після цього зразок поміщали в колонку. Тепер і сигнал фотолюмінесценції буде інтерпретуватися як фоновий сигнал і від нього відраховуватиметься реакція іммобілізації антигену охратоксину А (Ag). Після нанесення на біоселективну поверхню антигену в різних розведеннях, а саме 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5,0 нг/мл, спостерігали спадання ФЛ (рис. 4, 5).

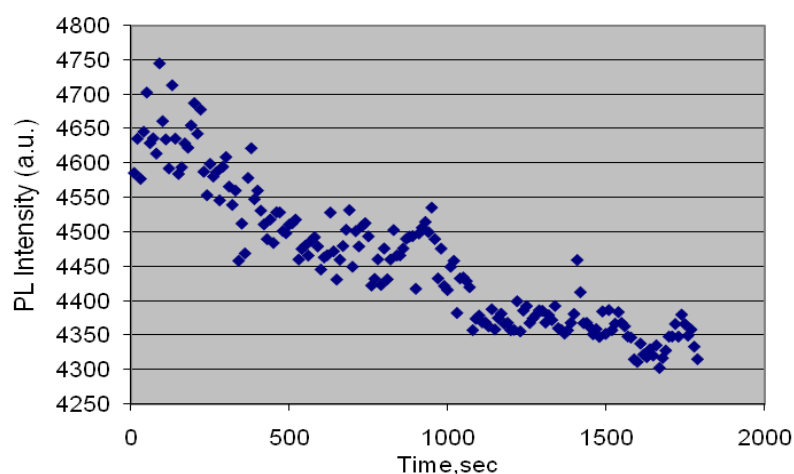


Рис. 4. Кінетика адсорбції антигена ОТА 0,1 нг/мл на поверхні біокомплексу ZnO-РА-Ab-BSA. Сенсорограма зниження рівня фотолюмінесценції у разі внесення 0,1 нг/мл Ag охратоксину А

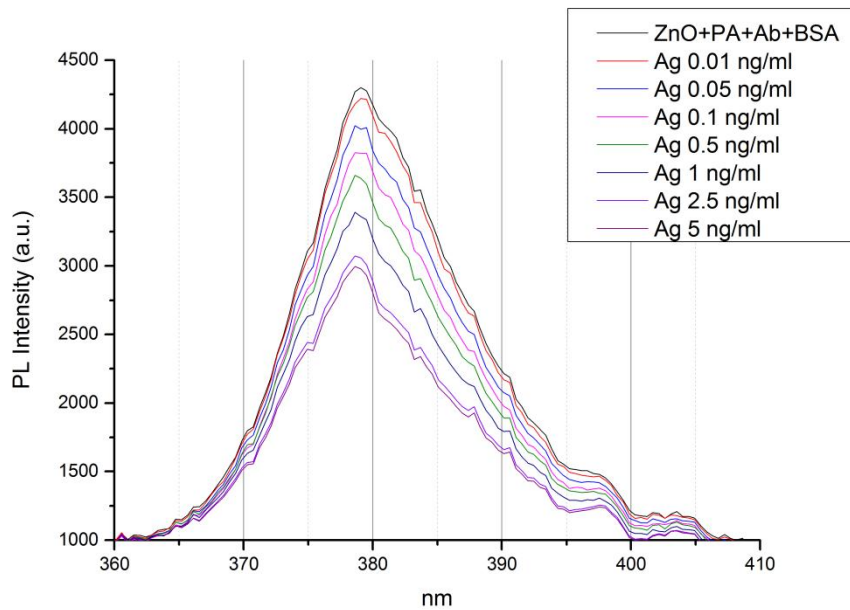


Рис. 5. Зниження спектрів фотолюмінесценції ZnO нанородів при внесенні різних концентрацій охратоксину А, нг/мл

Отже, при внесенні розчинів специфічних Ag охратоксину А в концентраціях від 0,01 до 5,0 нг/мл спостерігалось зниження ФЛ, що свідчить про утворення комплексу за принципом «ключ-замок» і супроводжується модифікацією структури попередньо адсорбованих молекул Ab, що призводить до зниження інтенсивності ФЛ ZnO.

Чутливість оптичного біосенсора для визначення охратоксину А була обрхована за таким рівнянням (1):

$$S = \frac{I(\text{BSA}) - I(\text{Ab})}{I(\text{BSA})}, \quad (1)$$

де $I(\text{BSA})$ та $I(\text{Ab})$ відповідно – інтенсивності фотолюмінесценції після адсорбції БСА та антитіл до охратоксину А.

Дані наведеної нижче таблиці свідчать, що висока чутливість біосенсора стосовно до охратоксину А коливається в межах 0,1-2,5 нг/мл, тоді як при внесенні концентрації в 5,0 нг/мл спостерігається насичення, а за концентрацій 0,01 та 0,05 – низький відгук сигналу. Таким чином, ми можемо стверджувати, що ця модель є чутливою, ефективною і швидкою щодо детекції охратоксину А.

Продовження досліджень з вивчення використання імунних біосенсорів на основі оксиду цинку, що при попередніх дослідженнях показують достатньо високу специфічність реакції та швидкість аналізу, можуть суттєво пришвидшити і здешевити процес моніторингу якості продукції ще на стадії вирощування зернових культур.

**Чутливість оптичного біосенсора на основі ZnO
для визначення охратоксину А**

Концентрація охратоксину А, нг/мл	S, умовні одиниці
0,01	0,02
0,05	0,07
0,1	0,11
0,5	0,15
1,0	0,21
2,5	0,29
5,0	0,31

Висновки і перспективи. Отже, в результаті проведених досліджень нами було підтверджено ефективність використання оксиду цинку як нового матеріалу для трансдьюсерних поверхонь та реалізовано алгоритм іммобілізації біологічних компонентів на поверхні ZnO нанородів.

Використання такого методу діагностики дає змогу проведення швидкого контролю якості продукції при порівняно невисокій складності аналізу. Таким чином, подальше вивчення і вдосконалення такого методу визначення охратоксину А та інтерпретація отриманих результатів для детекції різних типів мікотоксинів дозволить скоротити тривалість і вартість аналізу в реальних зразках та покращить мобільність сенсорів для проведення вимірювань в польових умовах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Мікотоксикологічний моніторинг концентрованих кормів Лісостепу України / О. Калінін, О. Куцак, Г. Шевцова [та ін.] // Тваринництво України. – 2003. – № 12. – С. 26–27.
2. Мельник О.В. Моніторингові дослідження кормів на наявність грибів роду *Aspergillus* / О.В. Мельник // Вісн. Полтав. держ. аграр. акад. – 2011. – № 3. – С. 174–177.
3. Walker R. Risk assessment of ochratoxin: current views of the European Scientific Committee on Food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. *Adv Exp Med Biol*(2002) 504: 249–255.
4. Raters M, Matissek R (2005) Study on distribution of mycotoxins in cocoa beans. *Mycotoxin Res* 21: 182–186.
5. Vega FE, Posada F, Peterson SW, Gianfagna TJ, Chaves F (2006) *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia* 98: 31–42.
6. Khranovsky V, Lazorenko V, Lashkarev G, Yakimova R. Luminescence anisotropy of ZnO microrods. *Journal of Luminescence*. Volume 132, Issue 10, October 2012, Pages 2643–2647.

7. Nakanishi K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon / K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura // Journal of Bioscience and Bioengineering. — 2001. — Vol. 91, N 3. — P. 233–244.

8. Viter R., V. Khranovsky, N. Starodub, et. al, Application of Room Temperature Photoluminescence From ZnO Nano-rods for Salmonella Detection, IEEE Sensors Journal, 14(6) (2014) 2028-2034.

9. Ricciardi A., Castagna R., Ferrante I., Frascella F., Marasso S.L., Ricci A., Canavese G., Lorè A., Prella A., Gullino M.L., Spadaro D. (2013) – Development of a microcantilever-based immunosensing method for mycotoxin detection. Biosensors and Bioelectronics, 40, 233-239. DOI: 10.1016/j.bios.2012.07.029.

*Стаття надійшла до редакції
19.12.2016*

¹**Н. Ф. Шпырка**, аспірант

¹**М. В. Гаран**, аспірант

¹**Ю. В. Рубан**, аспірант

¹**Е. Ю. Паренюк**, канд. биол. наук

²**Р. В. Витер**, канд. физ.-мат. наук

¹**Е. Е. Шаванова**, канд. биол. наук

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

²Латвийский университет

Киев, Украина

Разработка нового метода диагностики охратоксина А на основе фотолюминесценции наночастиц оксида цинка

Охратоксин А (ОТА) – один из самых опасных микотоксинов, продуцируемый грибами рода *Aspergillus* и *Penicillium*, он является естественным загрязнителем зерновых и бобовых культур.

Поскольку проблема безопасности пищевой продукции и кормового сырья приобретает особую актуальность, нами был разработан и протестирован новый метод определения охратоксина А на основе фотолюминесценции наночастиц оксида цинка. Для этого использовали волоконно-оптический спектрометр, с помощью которого регистрировали спектры фотолюминесценции микотоксина на поверхности ZnO.

В результате проведенных исследований нами было подтверждена эффективность использования оксида цинка в качестве нового материала для трансдьюсерных поверхностей и реализован алгоритм иммобилизации биологических компонентов на поверхности ZnO нанородов.

Снижение интенсивности фотолюминесценции свидетельствует об образовании биокомплекса на поверхности нанородов оксида цинка по принципу «ключ-замок».

Определение содержания охратоксина А иммунным биосенсором на основе оксида цинка обладает достаточной специфичностью реакции, учитывая значительное снижение сигнала при внесении концентраций в диапазоне от 0,01 нг / мл до 5,0 нг / мл

Ключевые слова: микотоксини, охратоксин А, іммобілізація, оксид цинка, фотолюмінесценція.

N. Shpyrka, post-graduate student

M. Taran, post-graduate student

Y. Ruban, post-graduate student

O. Pareniuk, PhD (Biology)

R. Viter, PhD (Physics and of Math)

K. Shavanova, PhD (Biology)

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

²University of Latvia

Kiev, Ukraine

Development of the new method of ochratoxin A determination, based on zinc oxide nano particles luminescence

The problem of mycotoxicosis gains more and more importance every year, as the amount of infected food and feed arises.

Ochratoxin-A (OTA) is one of the most dangerous mycotoxins. It is a natural contaminant of grains and legumes, produced by *Aspergillus* and *Penicillium* fungi. Therefore, it is important to control the quality parameters and the presence of for mycotoxins in products in real time at all stages of cultivation, processing and transportation of products.

Therefore, the problem of food and feed safety is of particular relevance.

To this end, a new method for determination of ochratoxin A, based on photoluminescence of zinc oxide nanoparticles was developed and tested. Due to the unique combination of fluorescent, semiconductor and piezoelectric properties, of ZnO can be used to create sensors that are based on different principles of signal registration. Fiber-optic spectrometer, whereby photoluminescence spectra of mycotoxin on the surface of ZnO were recorded.

ZnO nanodust was dissolved in butanol (1 mg/ml) and sonicated for 30 minutes. 20 ml of ZnO nanorods solution were applied on individual glass plates up to the formation ZnO/glass surface. Samples were dried at room temperature and fired in a muffle furnace for 3 hours.

Protein A (20 mg/mL) was adsorbed on the surface of ZnO samples for 20 min and washed with phosphate buffer (pH 7,4). Afterwards ochratoxin A solution (20 mg/mL) was incubated during 20 minutes, and, to prevent nonspecific adsorption, additionally samples were incubated with bovine albumin serum (BSA) for 20 minutes on the surface of ZnO.

Immobilization of biological components was conducted in a desiccator for maintaining a wet environment during 20 minutes, what is sufficient to fix the compounds on the surface of ZnO nanorods.

In accordance with the procedure, modification of BSA was taken as the final stage of biosensor bioselective layer formation. Then sample was placed into the column and photoluminescence signal was interpreted as a background signal and, based on it. ochratoxin A antigen (Ag) immobilization signal was calculated. After applying various dilutions of antigen (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5.0 ng/ml) on bioselective surface decrease of PL was observed.

As a result of the research, we have confirmed the efficiency of zinc oxide as a new material for transducer surfaces and implemented an algorithm for biological components immobilization on the surface of ZnO nanorods.

Decrease of the photoluminescence intensity indicates the formation of nanorods biocomplex on the surface of zinc oxide on a "key-lock" principle

Determination of ochratoxin A by zinc oxide based immune biosensor has a sufficient reaction specificity, given the significant reduction in signal when measuring concentrations ranging from 0,01ng/ml to 5,0 ng/ml

Consequently, the proposed immune biosensor is not only highly sensitive and relatively easy to use, but also optimized for fast work and has the potential for the chips re-use, which significantly reduces the cost analysis.

Therefore, further study and improvement of the method for determining ochratoxin A and interpretation of the results for the detection of various types of mycotoxins will reduce the duration and cost of the analysis in real samples and improve sensor mobility for measurements in the field.

Keywords: mycotoxins, ochratoxin A, immobilization, zinc oxide, photoluminescence.

УДК 60:57.085.2:582.717.4

Н.Г. Нестерова, канд. с.-г. наук, асистент¹

О.Ю. Чорнобров, канд. с.-г. наук, наук. співробітник²

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України

²ВП НУБіП України «Боярська лісова дослідна станція»

(Київ, Україна)

ОСОБЛИВОСТІ ВВЕДЕННЯ ЕКСПЛАНТАТИВ РОСЛИН *HYDRANGEA MACROPHYLLA L. В УМОВИ IN VITRO*

Гортензія великолиста (*Hydrangea macrophylla L.*) – цінний декоративний деревний вид, розміри суцвіть якого суттєво перевершують дикорослі форми рослин. Вона широко використовується для оформлення зелених зон міських парків, ботанічних садів, скверів, алей тощо.

Рослини *H. macrophylla* яскраво вирізняються з-поміж інших видів особливою пігментацією суцвіть, що залежить від механічного та мінерального складу ґрунту і його рН. Проте така ознака, як синя або слабо-фіолетова пігментація суцвіть, не закріплюється в поколінні, бо є виключно фенотипічною реакцією рослин на умови місцезростання, і це суттєво знижує можливості формування декоративних ансамблів з гортензії.

Установлено способи одержання асептичних життєздатних експлантатів рослин *H. macrophylla*, ізольованих із донорів у різних фенофазах, та досліджено їхню регенераційну здатність *in vitro*.

Показано, що ефективна стерилізація експлантатів рослин *H. macrophylla* досягалася лише шляхом їх ізоляції у фенофазі розгортання листків рослин-донорів із подальшим витримуванням у 0,1% розчині HgCl₂ упродовж 10 хв. Так, регенераційна здатність таких експлантатів достовірно вища, ніж у фенофазі цвітіння.