PHÁT TRIỀN CẢM BIẾN SINH HỌC ALKALINE PHOSPHATASE TRÊN CƠ SỞ BIẾN TÍNH ĐIỆN CỰC BẰNG ÔNG CARBON NANO ĐỀ XÁC ĐỊNH ĐỘC TỐ NẤM MỐC PATULIN.

Đến tòa soạn 31 - 3 – 2015

Mai Thị Thanh Huyền Trường Đại học Vinh **E.P.Medyantseva, R.M. Varlamova** Đại học Tổng hợp Quốc gia Kazan, Nga

SUMMARY

DEVELOPMENT OF ALKALINE PHOSPHATASE BIOSENSORS BASED ON ELECTRODES MODIFIED WITH MULTIWALLED CARBON NANOTUBES FOR THE DECTERMINATION OF PATULIN.

Amperometric biosensors based on platinum screen-printed electrodes modified with multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) and immobilized enzymes alkaline phosphatase developed for the determination of patulin. Biosensor used in patulin detection based on the inhibition of enzymatic activities. The working concentration range is $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-10}$ mol/l, limit of quantitation is 5×10^{-11} mol/l. Modification of electrode with MWCNT allows achieving wider range of detectable concentrations, lower detection limits, and more pronounced effect of inhibition.

Keywords: patulin, alkaline phosphatase, mycotoxins, carbon nanotube, amperometric biosensor.

1. MỞ ĐẦU

Mycotoxin là một trong những nhóm độc tố nguy hiểm gây ra các mối đe dọa với sức khỏe của cộng đồng. Patulin (PAT) mặc dù không phải là một trong những độc tố mạnh nhưng được quan tâm bởi khả năng gây ung thư, ức chế hệ miễn dịch, gây sưng và viêm loét niêm mạc ruột. Patulin được hình thành do chủng nấm mốc *Aspergillus* và *Penicillium*, được phát hiện trong nước trái cây, rượu táo và các sản phẩm từ táo. Patulin thường được xác định bằng các phương pháp sắc ký như sắc ký khí, sắc ký lỏng [1,2] với các đầu dò khối phổ [3], huỳnh quang [4]. Các phương pháp này có độ nhạy và độ chon lọc cao nhưng lại tốn

kém và đòi hỏi tính chuyên môn hóa cao của người phân tích. Công nghệ cảm biến sinh học trong trường hợp này rất hữu ích trong sự phát hiện các độc tố nấm mốc nhờ khả năng đo lường nhanh, độ nhạy cao và sử dụng thuận lợi hơn so với các phương pháp truyền thống khác. Một số cảm biến sinh học khác nhau đã được sử dụng để phân tích các độc tố mấm mốc [5,6] tuy nhiên việc phát triển các cảm biến sinh học để xác định PAT hiện nay đang còn hạn chế [7].

Rất nhiều loại vật liệu đã được nghiên cứu và ứng dụng để sử dụng làm tác nhân gắn kết trong cảm biến sinh học, trong đó vật liệu nano carbon với nhiều tính chất đáng chú ý như khả năng dẫn điện cao, nhóm chức –COOH tạo ra khi biến tính làm tăng các tương tác hóa sinh, rất có triển vọng để tạo ra một thiết bị cảm biến sinh học với mục đích cải thiện hiệu suất phân tích, làm tăng độ nhạy của bề mặt điện cực trên các loại phân tử khác nhau [8]

Trong báo cáo này chúng tôi chúng tôi đưa ra cảm biến sinh học dòng điện (amperometric biosensor) sử dụng đầu thu là enzyme alkaline phosphatase (ALP) được cố định trên bề mặt điện cực in lưới Pt (screen-printed electrode) đã được biến tính bằng nano carbon để xác định PAT. Nguyên lý làm việc của cảm biến sinh học điện rất đơn giản. Thành phần xác định được khuếch tán qua một màng bán thấm vào một lớp mỏng của vật liệu sinh học được gắn trên bề mặt điện cực, phản ứng enzyme hoá được diễn ra trên bề mặt điện cực. Dựa trên sự thay đổi dòng điện để xác định hàm lượng chất cần xác định [9].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

2.1.1 Hoá chất

1- naphthyl phosphate (Russia), alkaline phosphatase (Sigma), chitosan (Sigma).
Dung dich 1% glutaraldehyde (GA) của hãng ICN và albumin huyết thanh bò (BSA) 5% của hãng Rianal (Hungari), nano carbon đa lớp MWNT có đường kính 2 – 6 nm đến 10 - 15 nm (Sigma).

2.1.2 Thiết bị

Hệ điện cực được chế tạo từ kỹ thuật in lưới là cơ sở cho cảm biến sinh học bao gồm: điện cực làm việc, điện cực phụ trợ và điện cực so sánh (BVT technologies, Brno, cộng hoà Sec). Điện cực làm việc là platin bột nhão. Điện cực phụ trợ là platin và điện cực so sánh làm bằng bạc. Thể tích ống điện hoá làm việc là 200 µl.

Tất cả các phép đo được thực hiện trên thiết bị đo điện hoá đa năng MEB kết nối với máy tính.



Hình 1. Thiết bị đo điện hoá đa năng "MEB" và điện cực kết hợp

2.2. Biến tính điện cực bằng vật liệu nano carbon

MWNT được rung siêu âm trong hỗn hợp dung dịch axit đậm đặc HNO₃: H₂SO₄ (1:3) để tiến hành chức năng hóa trong 2 - 4 giờ. Dung dịch thu được đem rửa sạch bằng nước cất nhiều lần cho đến khi đạt pH = 7 và rửa sạch lần cuối bằng etanol, sau đó đem sấy khô ở 50⁰C- 60° C đến khối lượng không đổi và hòa tan trong chitosan (0,5% trong CH₃-COOH) để thu được dung dịch MWNTs 1

mg/ml [10]. Dung dịch này có chứa các nhóm -OH và các nhóm -NH- làm tăng độ phân tán của chúng trong nước đồng thời giúp cho các thành phần sinh học như các enzyme xâm nhập cố định tốt hơn trên bề mặt ống hay trong ruột ống. Gắn một thể tích xác định (0,5 μ l) dung dịch MWNTs 1mg/l lên bề mặt điện cực làm việc, để khô và cho vào tủ lạnh bảo quản ở 4⁰C.





2.3. Chuẩn bị cảm biến sinh học

Để có được đầu thu sinh học là enzyme ALP, trên bề mặt điện cực chúng tôi tiến hành cố định chế phẩm có chứa enzyme bằng phương pháp liên kết đồng hóa trị với

Chitosan (CTS)

MWNTs

tác nhân gắn kết là GA. Nguyên lý của nó dựa trên phản ứng giữa các phân tử enzyme với hai nhóm carbonyl của GA tạo thành các đại phân tử không tan. Lớp enzyme cố định này làm tăng độ ổn định của tín hiệu.



Chế phẩm được chuẩn bị bao gồm dung dịch enzyme, dung dịch BSA, dung dịch

đệm phosphate (pH = 7,0), dung dich GA 1% và nước cất (GA được cho vào cuối cùng). Lấy 1 µl hỗn hợp thu được đem gắn trên bề măt điên cực làm việc. Điên cực đã được chuẩn bị xong để khô, đem bảo quản trong hôp petri môt đêm ở nhiệt đô 4°C. Sau đó đem ra rửa nhẹ bằng nước, để khô ngoài không khí và bảo quản trong tủ lanh trước khi đem sử dụng. Các cảm biến sinh học thu được có thể sử dung trong vòng 6 tuần với sai số phép đo không vượt quá 5%. Điện cực enzyme được chế tạo dưới dạng 1 màng mà 1 mặt tiếp xúc với môi trường cơ chất còn mặt kia tiếp xúc với vùng đo. Phản ứng giữa cơ chất – enzyme xảy ra trên lớp màng. Kết quả sự thay đổi năng lượng tư do được điên cực thu nhân rồi truyền qua hệ thống đo dưới dạng đo dòng điện hoặc đo điên thế.

Phản ứng enzyme hóa với tác nhân phản ứng là 1- naphthyl phosphate :





3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sự hình thành tín hiệu phân tích của cảm biến sinh học.

Tiến hành đo điện cực ALP với cơ chất là 1- naphthyl phosphate 10^{-3} M ở điều kiện pH tối ưu đã được khảo sát (pH =7,6) trên nền đệm tris-HCl. Kết quả thu được được mô tả trên hình 2.



Hình 2: Đường von - ampe của dung dịch 1- naphthyl phosphate $10^{3}M$ trên nền đệm tris - HCl (pH = 7,6) điện cực ALP.

Cường độ dòng cao nhất được đo ở điện áp +0,6V vì vậy trong các nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sử dụng điện áp này cho cảm biến sinh học ALP.

Nghiên cứu ảnh hưởng của PAT đến enzyme cố định của cảm biến sinh học dòng điện cho thấy: với sự có mặt của PAT thì cường độ dòng của cảm biến sinh học ALP giảm xuống. Điều này chứng tỏ PAT là chất kìm hãm hoạt tính enzyme của cảm biến sinh ALP và có thể sử dụng các cảm biến sinh học này để định lượng PAT. Sử dụng các cảm biến sinh học đã được biến tính điện cực bằng MWNTs cho thấy có sự tăng tín hiệu phân tích so với các điện cực không được biến tính. Điều này có thể được giải thích bởi sự gia tăng bề mặt điện cực, làm tăng khả năng bám dính của các

enzyme vào màng điện cực cũng như làm tăng độ dẫn điện của chúng.



Hình 3: Ảnh SEM bề mặt điện cực Pt trước và sau khi gắn enzyme (a), (b) và điện cực đã được biến tính bằng MWNTs trước và sau khi gắn enzyme (c), (d).

3.2. Xác định một số thông số động học ALP

Lập hệ phương trình Michaelis – Menten tính toán cho thấy với cơ chất 1- naphthyl phosphate khi không có mặt chất kìm hãm enzyme là PAT có $K_m = (18,7\pm0,4).10^{-5}$ M, $V_{max} = (0,74\pm0,05).10^{-6}$ mol/l.s. Khi có mặt chất kìm hãm PAT 10^{-7} M thì $K_m =$ $(2,1\pm0,1).10^{-5}$ M; $V_{max} = (0,31\pm0,02).10^{-6}$ mol/l.s, điều này cho thấy PAT là chất kìm hãm phi cạnh tranh.

3.3. Xây dựng phương trình đường chuẩn

Tiến hành đo cường độ dòng điện của các điện cực ALP đã được biến tính và chưa

biến tính bằng MWNTs với cơ chất 1naphthyl phosphate 10^{-3} M trước và sau khi thêm vào các nồng độ khác nhau của PAT. Xây dựng đồ thị mối liên hệ phụ thuộc giữa logarit nồng độ PAT với tỷ lệ ức chế I (% ức chế I = [(I_o-I_p)/I_o]×100 - I_o, I_p – giá trị cường độ dòng khi không có và có PAT). Kết quả thu được cho bảng 1 cho thấy việc sử dụng vật liệu carbon nano để biến tính điện cực làm tăng khoảng tuyến tính nồng độ PAT, đồng thời làm giảm giới hạn định lượng LOQ và tăng độ nhạy của phương pháp.

Cåm biến sinh học	Khoảng nồng độ tuyến tính (mol/l)	Phương trình đường chuẩn I= $(a \pm \delta)$ + $(b \pm \delta)$ ×(-lg c), r			LOQ,	Mức độ
		a±δ	b± δ	R^2	Mol/l	hãm %
ALP	1×10 ⁻⁶ -1×10 ⁻⁹	69±3	-4.8±0.4	0.9870	4×10 ⁻¹⁰	76±1
ALP – MWNTs	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-10}$	78±5	-6.9 ± 0.5	0.9942	5×10 ⁻¹¹	90±2

Bảng 1. Các đặc trưng phân tích của các cảm biến để xác định PAT (n = 5, P = 0.95).

Để đánh giá độ đúng của phương pháp chúng tôi tiến hành phân tích các mẫu nhân tạo với các nồng độ khác nhau của PAT, kết quả thu được được biểu diễn ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định PAT trong mẫu giả bằng các cảm biến sinh học ALP –

MWNTs (n=5, P=0.95)

Nồng độ thật (Mol/l)	Nồng độ xác định (Mol/l)	RSD
5×10 ⁻⁷	$(5,1\pm0,2)\times10^{-7}$	0,039
4×10 ⁻⁸	(3,9±0,2)×10 ⁻⁸	0,049

Từ các kết quả thu được có thể nhận xét rằng có thể sử dụng cảm biến sinh học dòng điện đầu thu ALP để xác đinh PAT trong lương thực, thực phẩm.

3.4. Định lượng PAT trong một số mẫu thực phẩm.

Để tiến hành định lượng PAT trong một số loại nước táo và táo nhập khẩu trên thị trường, mẫu phân tích được đem chiết hai lần với ethyl axetat, dịch chiết thu được cho thêm 2ml dung dịch Na_2CO_3 (14g/l) và 5 giọt axit axetic, lắc kỹ sau đó đem cất quay chân không. Cặn thu được đem hòa tan trong 1ml nước và đem đi phân tích. Hiệu suất thu hồi của phương pháp đạt 85 – 90%.

Mẫu	Hàm lượng Mol/l	RSD
Nước táo trẻ em "Сады Придонья" (Nga)	$(2.4\pm0.1) \times 10^{-10}$	0.042
Nước ép táo-đào "Красная цена" (Nga)	$(8.0\pm0.3)\times10^{-9}$	0.038
Quả táo (Balan)	$(4.4\pm0.2)\times10^{-7}$	0.045

4. KẾT LUẬN

1. Đã phát triển cảm biến sinh học dòng điện sử dụng đầu thu enzyme alkaline phosphatase với điện cực Pt biến tính MWNTs để xác định patulin.

2. Đã xác định một số thông số động học ALP sử dụng cơ chất là 1- naphthyl phosphate cho thấy PAT là chất kìm hãm phi cạnh tranh của phản ứng enzyme hóa.

3. Đã xây dựng được phương trình đường chuẩn của phương pháp xác định PAT bằng điện cực biến tính và chưa biến tính bằng MWNTs

4. Đã tiến hành định lượng patulin trong một số mẫu táo và nước táo nhập khẩu trên thị trường với hiệu suất thu hồi của phương pháp đạt 85-90 %.

Bằng phương pháp cảm biến sinh học dòng điện sử dụng đầu thu ALP cố định trên bề mặt điện cực in lưới Pt đã được biến tính bằng nano carbon có thể xác định độc tố patulin trong lương thực, thực phẩm, cho phép kiểm soát chất lượng thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Athanasios M., Vasiliki P., Panagiota M. (2008) Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. Food Chem. 109-860-867.

 Maria J.B., Paula C.A., Cristina M.M. (2010) Almeida. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. Food Chem. 121-653-658

3. Michael R., Florian K., Volker S., Florian L. (2004) Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach. Food and Chem. Toxicol. 42-729–735.

4. De Champdoré M., Bazzicalupo P., De Napoli L., Montesarchio D., Di Fabio G., Cocozza I., Parracino A., Rossi M., D'Auria S. (2007) A new competitive fluorescence assay for the detection of patulin toxin. Anal. Chem. 79 (2) 751-757.

5. Shephard G.S., Berthiller F., Burdaspal P.A., Crews C., Jonker M.A., Krska R., MacDonald S., Malone R.J., Maragos C., Sabino M., Solfrizzo M., Van Egmond H.P., Whitaker T.B. (2012) Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010-2011, World Myco. J. 5 - 3–30.

6. Asunción Alonso-Lomillo M., Domínguez-Renedo O., del Torno-de Roman L., Arcos-Martínez M. J.- Horseradish (2011) peroxidase-screen printed biosensors for dectermination of Ochratoxin A, Analyt. Chim. Acta. 688-49–53.

7. Starodub N.F., Pilipenko I.V., Pilipenko L.N., Katsev A.M. (2010) Express Control of Toxicity and Content of Patulin by Optical Biosensors. NSTI-Nanotech, 3 - 137–140.

8. Mai Thi Thanh H., Medyantseva E.P., Varlamova R.M., Sahapova G.R., Nikolaeva O.V. (2012) The determination of zearalenone by amperometric biosensors based on modified with carbon nanotubes electrode. Journal "Vestnik of Kazan State Agrarian University" 5 - 149–153.

9. Budnikov G.K, Maystrenko V.N., Vyaselev M.R. (2003) Fundamentals of modern electrochemical analysis, World, Bean LZ, Moscow, P. 592.

10. Ajeet K., Solanki P.R., Pandey M.K., Kaneto K., Ahmad S., Bansi M.D. (2010) Carbon nanotubes — chitosan nanobiocomposite for immunosensor. Thin Solid Films. 519 - 1160-1166.

11. Yoshida. K. (1998) Electrooxidation in Organic Chemistry: The Role of Cation Radicals as Synthetic Intermediates: New York : Wiley, P.324.