

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.10 – МКР. 1998«С» 01.11.2023. 019.ПЗ

ШКАРБАН ПОЛІНА ОЛЕКСАНДРІВНА

2024

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 602. 1:53.082. 9:577. 121

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету

захисту рослин, біотехнологій та екології

_____ Коломієць Ю.В.

« ____ » _____ 2024 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувача кафедри

екобіотехнології та біорізноманіття

_____ Кваско О. Ю.

« ____ » _____ 2024 р.

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

на тему «Дослідження біосенсорного детектування мікотоксинів у різних матрицях»

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Біотехнологія та біоінженерія»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Керівник бакалаврської роботи

К. б. н., с.н.с

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

Таран О.П.

(ПІБ)

Виконав

(підпис)

Шкарбан П.О.

(ПІБ студента)

КИЇВ-2024

Національний університет біоресурсів

і природокористування України

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології
Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття
Освітній ступінь «Магістер»
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
_____ р.

З А В Д А Н Н Я **НА ВИПУСКНУ** **МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ**

Шкарбан Поліна Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Дослідження біосенсорного детектування мікотоксинів у різних матрицях.»

керівник роботи к.б.н. с.н.с Таран Оксана Петрівна,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

2. Строк подання студентом роботи 10 листопада 2024 року _____

3. Вихідні дані до роботи

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):

4.1. Провести аналіз літературних даних про мікотоксини, їх види та вплив на здоров'я.

4.2. Провести аналіз літературних даних про принцип роботи методу поверхневого плазмонного резонансу.

4.3. Провести аналіз літературних даних про особливості підготовки матриць для аналізу на поверхневого плазмонного резонансу.

4.4. Провести аналіз літературних даних про виявлення мікотоксинів у різних продуктах.

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	Таран О.П		
2	Таран О.П		
3	Таран О.П.В.		

6. Дата видачі завдання 1 вересня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів випускної бакалаврської роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Провести аналіз літературних даних про мікотоксини, їх види та вплив на здоров'я.	Листопад-грудень	
2	Провести аналіз літературних даних про принцип роботи методу поверхневого плазмонного резонансу.	Лютий-березень	
3	Провести аналіз літературних даних про особливості підготовки матриць для аналізу на поверхневого плазмонного резонансу.	Червень-липень	
4	Провести аналіз літературних даних про виявлення мікотоксинів у різних продуктах.	Вересень-жовтень	

Студент

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

Реферат

Робота виконана на 37 сторінок, містить 5 розділи, 7 рисунків, 10 використаних джерел.

Актуальність роботи:

Різні поширені типи цвілевих грибів виробляють і виділяють мікотоксини. Сьогодні відомо від 300 до 400 різних мікотоксинів, але не всі вони присутні у високих концентраціях або мають значний вплив на здоров'я чи економіку, тому їх необхідно визначати в різних матрицях. Цвіль та їх метаболіти присутні скрізь у навколишньому середовищі, що передбачає широкий вибір зразків, які можуть містити мікотоксини та потребують аналізу. Через шкідливий вплив мікотоксинів на здоров'я їх рівні суворо регулюються, особливо в зразках харчових продуктів і кормів.

Сенсори – це пристрої, що складаються з двох елементів: молекули (зазвичай біологічної), яка вибірково реагує зі сполукою, що цікавить дослідника (елемент розпізнавання), і знаходиться в контакті з перетворюючим елементом, передаючи зміну фізичної змінної, спричинену реакцією, на вимірюваний сигнал. У цьому відношенні біосенсори – це прилади, що використовують біологічні молекули як елементи розпізнавання: антитіла, ферменти, бактерії, рецептори, ДНК.

Потреба в швидких, економних, чутливих і простих методах аналізу величезна. Однією з найскладніших цілей у розробці сенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу є виготовлення поверхонь, здатних до високоселективної та специфічної взаємодії з аналітом у складній рідині, такій як гетерогенні харчові матриці. Проблеми, що виникають при розробці поверхні біосенсора охоплюють різні напрямки: допоміжні матеріали, пробопідготовка відповідно до досліджуваної матриці, захист поверхні від нецільових молекул тощо. Допоміжні матеріали широко застосовуються в спробі зберегти третинну структуру лігандів, які використовуються для іммобілізації, що має сприяти стабільності та реактивності міжмолекулярних взаємодій на поверхні біосенсора.

Об'єкт досліджень: провести дослідження біосенсорного детектування мікотоксинів на матриці: зернові культури, корми для тварин, харчові продукти, для виявлення окремих мікотоксинів.

Предмет дослідження: виявлення окремих мікотоксинів у різних матрицях.

Методи дослідження: метод поверхневого плазмонного резонансу.

Мета роботи: є розробка методу підготовки поверхні біосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу для виявлення окремих мікотоксинів у різних матрицях.

Завдання: розробити та оптимізувати метод для різних матриць (зерно, харчові продукти, корми); порівняти результати з іншими методами.

Зміст

Вступ	8
Розділ 1. Огляд літератури	10
1.1. Мікотоксини: види та вплив на здоров'я.....	10
1.2. Методи виявлення мікотоксинів.....	17
1.2.1. Традиційні методи: хроматографія (HPLC), ELISA, мас- Спектрометрія.	17
1.2.2. Переваги та недоліки класичних методів у порівнянні зі СПР.	23
1.3. Принцип роботи методу поверхневого плазмонного резонансу	24
Розділ 2. Матеріали і методи дослідження	27
2.1. Об'єкти дослідження	27
2.2. Методи ізоляції та підготовки зразків.....	28
2.3. Метод поверхневого плазмонного резонансу для дослідження мікотоксинів	30
Розділ 3: Результати та обговорення	32
3.1. Аналіз чутливості СПР у різних матрицях	32
3.2. Порівняння результатів СПР з іншими методами.....	32
3.3. Можливі фактори впливу на точність результатів.....	33
Розділ 4: Висновки та рекомендації	35
4.1. Основні висновки дослідження	35
4.2. Практичні рекомендації.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	36
ДОДАТОК.....	37

Вступ

Мікотоксини – це токсичні речовини, що виробляються пліснявими грибами, які можуть забруднювати різні продукти харчування та корми для тварин. Вони є серйозною загрозою для здоров'я людей і тварин, оскільки можуть викликати токсичні, карциногенні, мутагенні та інші небажані ефекти. Забруднення мікотоксинами є глобальною проблемою, що вимагає ефективних заходів для їх виявлення та контролю.

Через широке поширення мікотоксинів в агропродовольчому ланцюгу важливо розробляти й впроваджувати швидкі, чутливі й точні методи для їх виявлення. Це дозволяє оперативно виявляти забруднення і запобігати потраплянню токсичних сполук у харчову продукцію, що сприяє підвищенню безпеки харчових продуктів і кормів.

Метод поверхневого плазмонного резонансу (СПР) є перспективним інструментом для детекції токсичних речовин, оскільки він забезпечує високу чутливість і специфічність. СПР дозволяє здійснювати реальний моніторинг у реальному часі без необхідності додаткових міток, що робить цей метод зручним для аналізу мікотоксинів у складних матрицях.

Інноваційність дослідження полягає в застосуванні методу поверхневого плазмонного резонансу (СПР) для виявлення мікотоксинів у харчових продуктах і кормах, що дозволяє розширити застосування цього методу для детекції токсичних речовин у складних біологічних матрицях. СПР є безконтактним, чутливим і специфічним методом, здатним аналізувати навіть мінімальні концентрації токсичних речовин. Це дозволяє дослідити нові підходи до контролю забруднення мікотоксинами на різних етапах виробництва харчових продуктів.

Розробка методів швидкого, точного і чутливого виявлення мікотоксинів за допомогою СПР має важливе практичне значення для забезпечення безпеки харчових продуктів і кормів. Впровадження таких методів дозволить значно підвищити ефективність системи контролю якості на всіх етапах виробництва та переробки продукції, зокрема при виявленні мікотоксинів на ранніх стадіях, до того, як забруднена продукція потрапить до споживачів.

Це сприятиме зниженню ризику харчових отруєнь, покращенню здоров'я населення, а також підвищенню довіри споживачів до харчової продукції. Зокрема, методи, засновані на СПР, можуть стати основою для

розробки нових стандартів моніторингу безпеки харчових продуктів, що відповідатимуть сучасним вимогам безпеки та якості.

Розділ 1. Огляд літератури

1.1. Мікотоксини: види та вплив на здоров'я

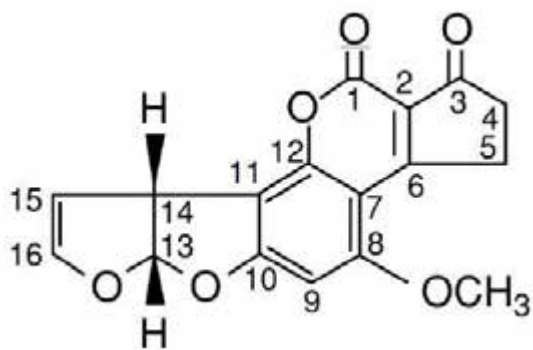
Мікотоксини – це токсичні метаболіти, що виробляються грибами, особливо сапрофітними цвілевими грибами, що ростуть на харчових продуктах або кормах для тварин. Усі мікотоксини є низькомолекулярними природними продуктами, які утворюються як вторинні метаболіти нитчастими грибами.

Афлатоксини впливають на імунну систему, пригнічуючи функцію імунних клітин (наприклад, Т-лімфоцитів), через це знижується здатність організму боротися з інфекціями. Для людей і тварин з ослабленим здоров'ям, такий вплив патогенну є найбільш небезпечним, оскільки в результаті зниження імунної відповіді можуть виникати серйозні бактеріальні інфекції. Через негативний вплив на загальний стан здоров'я, може знизитись продуктивності тварин. Це особливо важливо в тваринництві, оскільки навіть незначне зниження продуктивності може призвести до великих економічних збитків. Наприклад, у сільськогосподарських тварин може знизитися рівень молока, зменшитися приріст маси тіла, погіршитися репродуктивні функції.

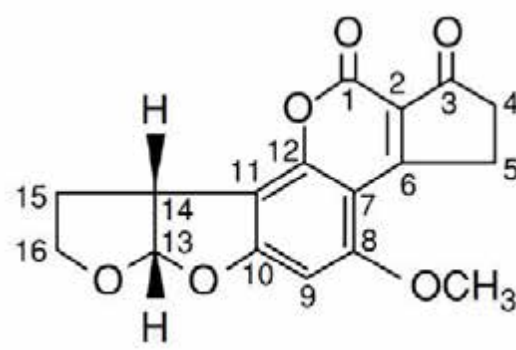
Афлатоксини здатні проникати через плацентарний бар'єр, що робить їх токсичними для ембріонів під час розвитку. Вони здатні викликає порушення в розвитку ембріона, включаючи затримку розвитку, аномалії будови органів або навіть загибель плода. Це є серйозною загрозою для здоров'я майбутніх поколінь не тільки ссавців, но і людей.

У 1962 році, поблизу Лондона, загинуло близько 100 000 індичат. Причиною цієї хвороби була арахісова їжа, заражена вторинними метаболітами *Aspergillus flavus* (афлатоксини), саме тоді був введений термін «мікотоксин». В період між 1960 і 1975 роками багато вчених приєдналися до пошуку цих токсигенів.

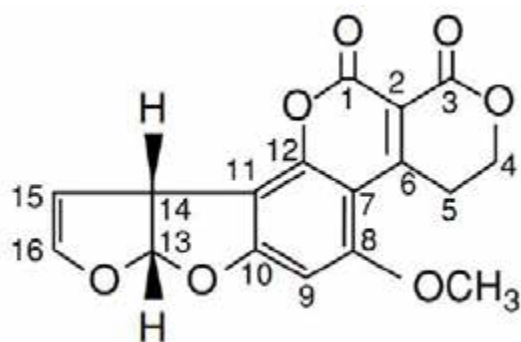
Афлатоксини – це вторинні метаболіти, які виробляють гриби виду *Aspergillus*, такими як *Aspergillus flavus* і *Aspergillus parasiticus*. Афлатоксини, виявлені в запліснявілих харчових продуктах і кормах, причетні до різних ускладнень здоров'я у людей і тварин. Існує чотири основні афлатоксини B₁, B₂, G₁ і G₂ та два додаткових афлатоксини M₁ і M₂.



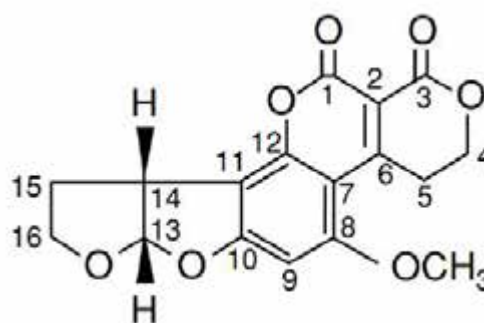
Афлотоксин В₁



Афлотоксин В₂



Афлотоксин G₁



Афлотоксин G₂

Рис. 1.1. Формула основних афлотоксинів

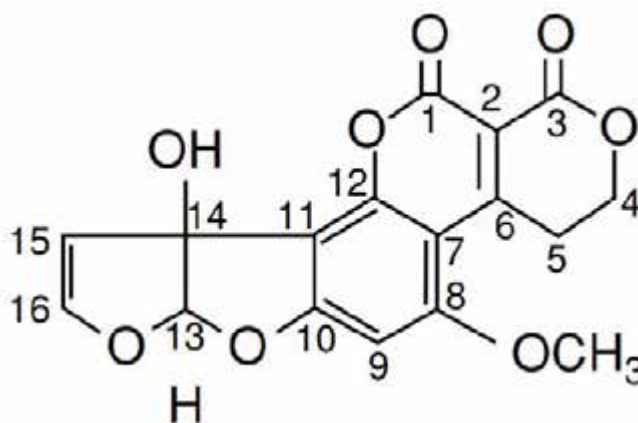


Рис. 1.2. Формула афлотоксину М₁

М-токсини були виділені із молока. Лактуючих тварин годували забрудненими афлотоксин матеріалом. Вони є небезпечний для людей, оскільки є канцерогеном. Дослідження показали, при регулярному споживанні молока, забрудненого цими токсинами, афлатоксин М₁ має здатність спричиняти рак печінки, а також може погіршувати імунну систему, підвищуючи ризик інфекцій та інших хвороб.

Охратоксини – це мікотоксини, що продукуються грибами роду *Aspergillus* (*Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus melleus* і *Aspergillus niger*) і роду *Penicillium* (*Penicillium verrucosum*). Він здатен викликати пошкодження нирок у щурів, собак і свиней. Був причетний до хвороби свиней у Данії, відомої як свиняча нефропатія, яка була пов'язана з годуванням цих тварин пліснявим ячменем. У високих дозах охратоксин може спричинити пошкодження печінки, кишковий некроз і крововилив. Через розкладання в рубці, жуйні тварни більш стійкі до впливу патогену, на відмінну від свинів, які більш сприйнятливі до дії охратоксину.

Був виявлений у 1965 році під час великого дослідження грибкових метаболітів, розробленого спеціально для знаходження нових мікотоксинів. Після цього його було виділено з комерційного зразка кукурудзи в Сполучених Штатах.

Основний токсин у цій групі, гепатотоксичний, тератогенний, для мишей, щурів і курячих ембріонів, та імуносупресивний – охратоксин А. Хімічно він містить ізокумариновий фрагмент, пов'язаний пептидним зв'язком з фенілаланіном. Важко виводиться і накопичується в організмі тварин, через свою жиророзчинність.

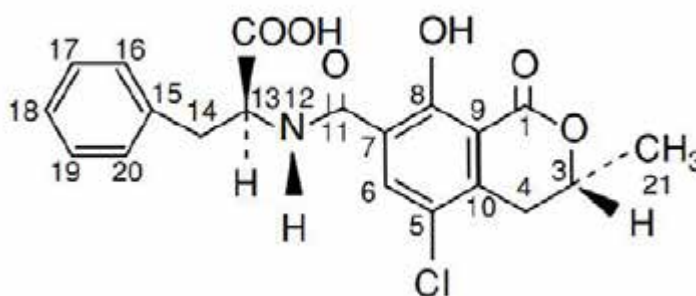


Рис. 1.3. Формула охратоксина А

Його виявили в ячмені, вівсі, житі, пшениці, кавових зернах та інших рослинних продуктах, причому ячмінь має особливо високу періодичність ймовірності зараження. Крім цього він також може бути присутнім у певних винах. Таке припущення допускаються через виноград, заражений *Aspergillus carbonarius*.

Процес всмоктування проходить або в передшлунку, як, наприклад, у птахів або шлунку, у ссавців. Це відбувається через розчинність патогену у ліпідах, його неіонізовану форму та його кислотні властивості. Він також,

бере участь у кишково-печінковій циркуляції. Головним чином охратоксин А уражає нирки. Крім цього він пригнічувачем імунітету та порушує клітинну фізіологію.

Це відбувається через те що первинні ефекти пов'язані з ферментами, залученими в метаболізм фенілаланіну, головним чином шляхом інгібування ферменту, який бере участь у синтезі комплексу фенілаланін-тРНК. Крім того, він пригнічує мітохондріальне виробництво АТФ і стимулює перекисне окислення ліпідів.

Дія охратоксина А на людей наразі невідома. Вважалось що він був причиною ендемічної балканської нефропатії. Ендемічна балканська нефропатія – це хронічне захворювання нирок, яке спостерігається в деяких районах Балканського півострова, зокрема в Албанії, Болгарії, Румунії, Греції, Сербії та Північній Македонії. Це захворювання, яке призводить до розвитку хронічної ниркової недостатності, а іноді може призвести до трансплантації нирки.

Патулін – це мікотоксин, що виробляється цвілевими грибами родів *Penicillium*, *Aspergillus* і *Byssoschlamys*. Ці роди здатні розвиватись та зростати на всіляких харчових продуктах. Наприклад: фрукти, злаки та сир. Головни видом, який здатен виробляти цей токсин, це цвіль, яка називається – *Penicillium expansum*. Як правило, вона розташована в ґрунті і являється основним джерелом патогену в фруктах.

З хімічної точки зору, патулін є полікетид-лактоном, що складається з досить маленької молекули. При виділенні у мас вигляд безбарвних або білих кристалів. Він має високу розчинність. Здатен розводитись у воді, метанолі, етанолі, ацетоні та етил- або амілацетаті, але у діетиловому ефірі та бензолі має меншу розчинність. Він стабільний у кислих розчинах, але розкладається при варінні в сірчаній кислоті.

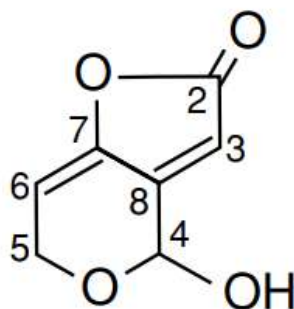


Рис. 1.4. Формула патуліну

Патулін, 4-гідрокси-4Н-фуоро[3,2с]піран-2(6Н)-он, є одним із мікотоксинів із найбільшою кількістю синонімів, а саме: кларформін, клавацин, клаватин, клавіформін, експансин, гігантин, лейкопін, мікоїн, мікоїн, мікоїн, патулін, пеніцидин, пенантин і теринін.

Найпоширеніший збудник зараження – це блакитна пліснява, *Penicillium expansum*. Це захворювання спричиняє м'яку гниль яблук, груш, вишень та інших фруктів.

Зеараленон – це мікотоксин, який є потужним естрогенним метаболітом, що виробляється родами *Fusarium* і *Gibberella*.

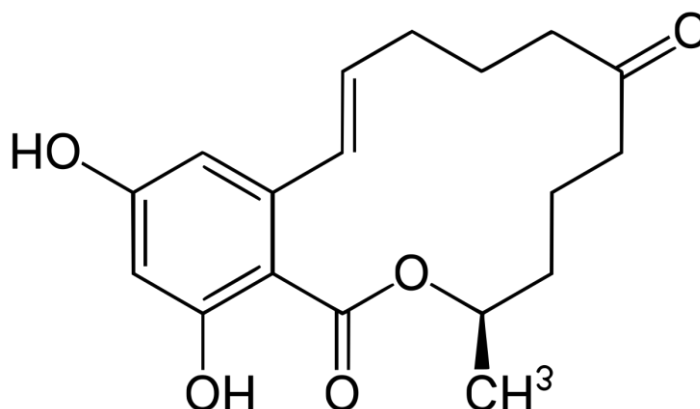


Рис. 1.5. Формула зеараленону

Потрапляючи в організм, зеараленон зазнає метаболічних перетворень, відновлюючи кетоніві групи в молекулі до вторинних спиртів. Цей процес призводить до утворення двох діастереоізомерних метаболітів - α -зеараленолу та β -зеараленолу. Діастереоізомери (α і β) відрізняються за своєю дією на рецептор естрогену через незначні зміни в їхній структурі. α -зеараленол є більш естрогенно активним, ніж β -зеараленол, що може призвести до гормональних порушень і впливу цього токсину через забруднені корми та продукти харчування, а також тварин і людей. Він є більш небезпечним для здоров'я людини.

α -Зеараленол є основним активним метаболітом. Він має високу естрогенну активність. Наприклад, у свиней α -зеараленол найбільш інтенсивно виробляється в мікросомах печінки. Це підвищує чутливість свиней до естрогенної дії зеараленону. Крім того, цей метаболіт з високою спорідненістю зв'язується з рецептором естрогену і може викликати репродуктивні розлади, такі як безпліддя, захворювання репродуктивних органів і порушення циклу.

На відміну від свиней, у курей утворюється метаболіт β -зеараленол. β -зеараленол має значно нижчу естрогенну активність, ніж α -зеараленол. β -зеараленол слабше впливає на естрогенні рецептори, що пояснює відносно низьку чутливість птахів до токсичної дії зеараленолу. Можливо, саме тому знижена активність β -зеараленолу сприяє менш вираженим клінічним ефектам у птахів.

α -зеараленол та β -зеараленол можуть безпосередньо взаємодіяти з цитоплазматичними рецепторами естрогену. Ці рецептори зв'язуються з 17β -естрадіолом, основним естрогенним гормоном в організмі. Коли зеараленон або його метаболіти зв'язуються з естрогеновим рецептором, їх розташування змінюється і активується процес, за допомогою якого рецептор переміщується в ядро клітини. Як тільки рецептор потрапляє в ядро клітини, активується механізм транскрипції генів і синтезуються різні білки, в тому числі ті, які зазвичай відповідають за естрогенну дію, наприклад, білки, що регулюють ріст і розвиток репродуктивних органів. Це стимулює естрогенну дію, що призводить до клінічних проявів естрогенії, включаючи нерегулярні менструації, безпліддя, гінекомастію у чоловіків та зміни статевих органів.

Окрім прямого впливу на естрогенні рецептори, естрогени також взаємодіють з центральною нервовою системою, зокрема з регуляторними механізмами гіпоталамо-гіпофізарної осі. Це важливий ендокринний шлях, який регулює багато фізіологічних процесів, включаючи регуляцію репродукції, росту, метаболізму та імунітету. Впливаючи на цей шлях, патогени можуть порушувати нормальну функцію гіпоталамуса і гіпофіза та впливати на секрецію гонадотропних гормонів, таких як лютеїнізуючий гормон і фолікулостимулюючий гормон, що потенційно може спричинити репродуктивну дисфункцію.

Зеараленол швидко всмоктується зі шлунково-кишкового тракту після перорального прийому. Його ліпофільна природа дозволяє йому легко проникати в клітини і накопичуватися в різних тканинах організму, особливо в репродуктивних органах (яєчниках і матці у жінок, яєчках у чоловіків), жировій тканині та інтерстиціальних клітинах яєчок.

Зеараленон і його метаболіти можуть проникати в печінку, де деякі з них піддаються більшому метаболізму. Однак значна частина токсину реабсорбується в кишечнику, потрапляє в кров і підтримує високий рівень метаболітів в організмі через механізм кишково-печінкового кола.

У більшості тварин зеараленол утворюється з калом, оскільки він ліпофільний і виводиться переважно через травний тракт. Однак у деяких видів, таких як кролики, токсини виводяться переважно з сечею. Він вказує на специфічний характер обміну речовин і виведення мікотоксинів.

Зеараленол не накопичується в м'язовій тканині, але метаболіти можуть відкладатися в інших тканинах, наприклад, у яєчному жовтку. Це особливо важливо для тварин, які використовуються у виробництві продуктів харчування (наприклад, птиці), оскільки метаболіти можуть потрапити в харчовий ланцюжок через яйця. Концентрація зеараленону в яєчному жовтку є важливим показником для оцінки потенційного ризику для здоров'я споживачів.

Естрогенізм у свиней вперше були зафіксовані в середині 1920-х років на Середньому Заході США. Значно пізніше, в середині століття, відкриття мікотоксину *Fusarium zearelenone* було пов'язано з надлишком естрогену. Типовими клінічними проявами гіперестрогенії у тварин є набряк вульви, збільшення розміру матки та виділень, гіперплазія та секреція молочних залоз, зтяжний еструс, аноеструс, збільшення частоти псевдовагітності, безпліддя та зниження лібідо, з вторинними ускладненнями, включаючи випадіння прямої кишки та піхви, мертвонародження та малий приплід. Свині передпубертатного віку є найбільш сприйнятливими.

Залишається занепокоєння щодо залишків зеараленону та його метаболітів у продуктах харчування, зокрема в молоці, яйцях та м'ясних продуктах, та їх потенційного впливу на здоров'я, наприклад, ранній розвиток статевих ознак у молодих дівчат. Однак, як ви зазначаєте, чіткого зв'язку між наявністю цих мікотоксинів у харчових продуктах і впливом на здоров'я людини ще не встановлено, але певні побоювання залишаються.

Передача через молоко: високі дози зеараленону можуть потрапляти в молоко овець, великої рогатої худоби та свиней, а токсин і його активні метаболіти, α -зеараленол і β -зеараленол, можуть передаватися в молоко. Однак дослідження показують, що перехід зеараленону в молоко зазвичай незначний і триває лише короткий час після впливу високих доз зеараленону. Було встановлено, що цей мікотоксин спричиняє естрогенізм (надлишкову естрогенну активність) у молодих тварин, таких як ягнята та поросята, які харчувалися молоком матерів, що споживали забруднений корм, проте ці ефекти не завжди відтворювані в експериментальних умовах з використанням природного забруднення корму.

Гостра токсичність і концентрація: гостра токсичність зеараленону відносно низька для більшості видів тварин, але тривале забруднення кормів або високі концентрації можуть спричинити серйозні наслідки. У природних умовах концентрація зеараленону в кормах зазвичай становить менше ніж 20 мг/кг (ppm), а у звичайних концентратах цей рівень ще нижчий - менше ніж 5 мг/кг. У таких умовах частота викиднів та інших серйозних проблем невелика, хоча в польових умовах було зафіксовано випадки викиднів, пов'язані із зараженням корму бактеріями *Fusarium*, що продукують зеараленон. Ці випадки не були відтворені в експериментальних умовах і можуть вказувати на інші чинники, що впливають на розвиток токсичних ефектів.

Нормативні стандарти: Європейський союз встановив максимальні рівні залишків зеараленону в кормах для тварин, які важливі для управління потенційними ризиками для здоров'я тварин і людини. Однак FDA не встановило спеціальних норм для зеараленону в кормах. Ймовірно, це пов'язано з відсутністю чітких доказів необхідності таких норм у США, незважаючи на стурбованість потенційним впливом мікотоксинів на здоров'я людини, що зберігається.

Потенційний ризик для людини: немає чітких доказів того, що залишковий зеараленон і його метаболіти впливають на розвиток статевих ознак у дітей, але є побоювання, що вони присутні в молоці та яйцях тварин, які споживає людина. Тому важливо враховувати всі можливі шляхи надходження цих токсинів з їжею, хоча низькі концентрації, ймовірно, становлять мінімальний ризик для людини.

1.2. Методи виявлення мікотоксинів

1.2.1. Традиційні методи: хроматографія (HPLC), ELISA, мас-Спектрометрія.

Хроматографія (HPLC), тобто високоефективна рідинна хроматографія, являє собою один з основних методів виявлення та кількісного визначення мікотоксинів. У цьому методі використовуються спеціальні хроматографічні колонки для ефективного розділення компонентів зразка, що забезпечує точність і високу чутливість. Після розділення токсини можуть бути ідентифіковані та кількісно визначені за допомогою детектора (зазвичай ультрафіолетового або флуоресцентного) для отримання точних результатів за концентрацією. Цей метод є дуже важливим для ідентифікації та кількісного визначення мікотоксинів у харчових продуктах, кормах та інших матеріалах, допомагаючи забезпечити безпеку та якість продукції.

Під час підготовки зразків із сировини, такої як корми, зерно, харчові продукти або біологічні рідини, зразки заздалегіть очищаються, щоб видалити батьківські компоненти, які можуть завадити аналізу. Цей процес включає в себе фільтрацію, екстракцію та очищення для зменшення впливу матриці та підвищення прецизійності результатів.

Для вилучення мікотоксинів зі зразків застосовують органічні розчинники, такі як метанол або ацетонітрил, а також спеціальні буфери. Ця процедура важлива для забезпечення точності аналізу, так як дає змогу розділити та зберегти мікотоксини, не змінюючи їхніх хімічних властивостей.

Щоб підвищити чутливість HPLC, мікотоксини можна попередньо дериватизувати. У цьому випадку мікотоксини з'єднують з іншими сполуками, щоб покращити їхні флуоресцентні та оптичні властивості. Це особливо важливо для аналізу токсинів, які не мають природної флуоресценції.

Наприклад, для аналізу фумонізину використовується дериватизація орто-фталальдегідом. Цей реагент зв'язується з фумонізинами і підсилює їхні флуоресцентні властивості, що полегшує виявлення. Дериватизація - метод, що дозволяє підвищити чутливість HPLC і забезпечити точність результатів аналізу мікотоксинів.

Після пробопідготовки і дериватизації отриманий розчин вводять у хроматографічну колонку. У колонці компоненти проби поділяються відповідно до їхніх хімічних властивостей, таких як молекулярна маса, полярність та інші фізико-хімічні властивості.

Для аналізу мікотоксинів найчастіше використовують УФ-детектори або детектори флуоресценції. УФ-детектори використовуються для вимірювання поглинання УФ-світла компонентами зразка, а флуоресцентні детектори вимірюють флуоресценцію компонентів після УФ-опромінення.

Для деяких мікотоксинів, таких як фумонізину і трихотецени, флуоресценція є важливим методом виявлення. Ці токсини або мають природну флуоресценцію, або, як уже зазначалося, їхня флуоресценція може бути посилена дериватизацією. Флуоресцентні детектори дають точніші та чутливіші результати при аналізі мікотоксинів порівняно з УФ-детекторами.

Для оптимального розділення мікотоксинів у хроматографії використовується змішана рухома фаза, що складається з води, органічного

розчинника (наприклад, метанолу, ацетонітрилу) і буферного розчину. Цей складний розчин дозволяє використовувати різні властивості компонентів рухомої фази для оптимізації умов розділення.

Частка органічних розчинників у рухомій фазі залежить від хімічної природи аналізованого мікотоксину. Наприклад, у разі високополярних фумонізинів можна використовувати рухому фазу з високою часткою метанолу і дигідрогенфосфатного буфера натрію. Така рухома фаза може використовуватися для ефективного відокремлення фумонізинів від інших мікотоксинів, присутніх у зразку.

Змішані рухомі фази є корисними інструментами, що покращують поділ мікотоксинів і дають змогу отримувати точніші та чутливіші результати, що підвищує точність і ефективність процедур виявлення та кількісного визначення мікотоксинів у різних речовинах.

Флуоресцентний детектор визначає час утримування компонентів у колонці, що дає змогу ідентифікувати мікотоксини. Цей час утримування (час розділення) є унікальною характеристикою кожної сполуки і дає змогу порівнювати мікотоксини з еталонними стандартами.

Кількість токсину визначається за площею піку, що утворюється на хроматограмі. Піки утворюються внаслідок інтерференції світла, що проходить через колонку, і зміни інтенсивності світла на детекторі. Площа піка пропорційна кількості мікотоксину в зразку.

Для визначення кількості мікотоксинів також використовується калібрувальна крива. Калібрувальні криві складаються на основі аналізу стандартних робочих розчинів з відомими концентраціями мікотоксинів. Ці калібрувальні криві дають змогу

Калібрувальні криві складаються на основі аналізу стандартного робочого розчину з відомою концентрацією мікотоксинів. Використання стандартів і калібрувальних кривих є важливим етапом у точному визначенні концентрації мікотоксинів у зразку, що забезпечує отримання корисних і надійних результатів аналізу.

Переваги HPLC, які роблять його популярним методом для аналізу мікотоксинів:

Мікотоксини можуть бути точно визначені навіть за дуже низьких концентрацій - від мкг до нг/мл. Така точність забезпечує надійні результати і дає змогу виявляти мікотоксини у зразках за дуже низьких концентрацій.

Підходить для аналізу різних мікотоксинів, таких як афлатоксин, фумонізин і зеараленон. Може використовуватися для аналізу різних зразків, включно з кормами, продуктами харчування та сільськогосподарською продукцією.

Один зразок може бути проаналізований на наявність декількох мікотоксинів одночасно. Це вигідно, оскільки економить час і ресурси, а також дає змогу отримати повний огляд мікотоксинів у зразку, що важливо для безпеки харчових продуктів і харчування.

Недоліки HPLC:

Порівняно з іншими методами, аналіз одного зразка займає більше часу. Залежно від кількості аналізованих зразків цей час варіюється від декількох хвилин до декількох годин. Наприклад, аналіз кількох мікотоксинів у складному зразку може потребувати значного часу на розділення та виявлення.

Зразок, що аналізується, має бути промитий і підготовлений до аналізу, щоб уникнути втручання інших компонентів матриці. Цей процес може включати фільтрацію, центрифугування, екстракцію та інші операції, що вимагають додаткового часу і ресурсів. Наприклад, якщо зразок містить велику кількість попелиці або інших компонентів, які можуть перешкодити аналізу, для отримання точних результатів може знадобитися додаткове очищення.

Ферментний імуносорбентний аналіз (ІФА) – це швидкий і чутливий метод визначення мікотоксинів. Заснований на використанні антитіл, які специфічно взаємодіють з мікотоксинами, ІФА підходить для швидкої діагностики, оскільки результати отримують за короткий час і за меншої кількості зразків.

Спочатку відібрані зразки готуються до аналізу шляхом вилучення мікотоксинів із матриці. Для цього використовуються органічні розчинники, такі як метанол або ацетонітрил. Також зазвичай використовується екстракційний буфер для полегшення видалення токсинів зі зразка. Процес екстракції залежить від типу зразка (наприклад, зерно, корм, сировина) і конкретного мікотоксину, який необхідно виявити.

Після екстракції зразок фільтрують і наносять на мікропланшет, вкритий антитілом, яке специфічно взаємодіє з мікотоксином. Після нанесення проби зразок інкубується на планшеті, щоб антитіло зв'язалося з мікотоксином (якщо він присутній у зразку).

Після інкубації на пластину додають друге антитіло, мічене ферментом (наприклад, пероксидазою). Це антитіло зв'язується з мікотоксинами, якщо вони присутні в зразку. Потім додається субстрат, який реагує з ферментом, що призводить до зміни кольору. Інтенсивність кольору пропорційна концентрації мікотоксину в зразку.

Інтенсивність забарвлення вимірюється за допомогою спеціального спектрофотометра, який вимірює оптичну щільність за певної довжини хвилі. Для визначення кількості мікотоксину в зразку можна використовувати калібрувальну криву, побудовану на основі стандартних розчинів з відомою концентрацією мікотоксину.

Переваги методу ELISA:

Швидкість: ІФА корисний для швидкого скринінгу, оскільки результати можуть бути отримані протягом від кількох годин до одного дня.

Чутливість: метод досить чутливий для виявлення мікотоксинів навіть у низьких концентраціях, що робить його корисним для аналізу слідів токсинів у різних зразках.

Простота: метод ІФА - відносно простий метод, який не потребує складного обладнання, такого як ВЕРХ або мас-спектрометрія, що знижує витрати на аналіз і робить його придатним для широкого спектра застосувань.

Масове тестування Однією з головних переваг ІФА є можливість одночасної обробки великої кількості зразків на одному планшеті, що робить його економічно ефективним методом скринінгу, особливо в лабораторіях, де необхідно обробляти велику кількість зразків.

Недоліки методу ELISA:

ELISA є чутливим методом, його результати можуть бути лише напівкількісними, що означає, що для точного визначення концентрації мікотоксину необхідно використовувати додаткові методи, такі як HPLC або мас-спектрометрія.

Перехресна реакція: Існує можливість перехресної реакції з іншими сполуками в зразку, що може вплинути на точність результатів. Проте сучасні тести ELISA мають високу специфічність до мікотоксинів, що зменшує цей ризик, але все ж таки може бути корисним в деяких випадках перевірити результати іншими методами.

Мас-спектрометрія – це високоточний метод виявлення та кількісного визначення мікотоксинів, заснований на вимірюванні молекулярної маси. Він дозволяє виявляти токсини в дуже низьких концентраціях з високою специфічністю. Метод дуже чутливий і може визначати складні суміші мікотоксинів, але є дороговартісним і потребує високої кваліфікації персоналу для проведення аналізу.

Мікотоксини зазвичай екстрагують зі зразків (наприклад, продуктів харчування, кормів, біологічних рідин) за допомогою таких розчинників, як метанол або ацетонітрил. Цей етап важливий для відділення мікотоксинів від матриці зразка. Після екстракції зразок піддається очищенню, наприклад, фільтрації або твердофазній екстракції (ТФЕ), для видалення речовин, які можуть перешкодити аналізу.

Зразок іонізується, утворюючи заряджені частинки (іони), які можуть бути проаналізовані за допомогою мас-спектрометра. Іонізація може здійснюватися різними способами, включно з:

Електророзпилювальна іонізація (ESI): метод, що використовується для полярних сполук і рідких зразків. Під час електророзпилювальної іонізації зразок розпорошується в електричному полі, утворюючи мікроскопічні краплі, з яких випаровується розчинник, вивільняючи заряджені молекули. ESI підходить для аналізу біомолекул і сполук з малими молекулами, таких як білки і пептиди.

Іонізація за допомогою лазерної десорбції/матричної іонізації (MALDI): цей метод зазвичай використовується для аналізу великих біомолекул, таких як білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди та складні матриці зразків. У MALDI лазерний імпульс використовується для десорбції молекул в матриці (зазвичай органічній) та іонізації, що дає змогу утворювати заряджені іони для подальшого аналізу.

Хімічна іонізація за атмосферного тиску (APCI): м'який метод іонізації, придатний для нелетких і термостійких сполук; APCI зазвичай використовується для аналізу органічних сполук, таких як фармацевтичні

препарати, пестициди та інші нелеткі речовини. У цьому процесі зразок газифікується і взаємодіє з активованими в атмосфері іонами, утворюючи іони на молекулах зразка.

Іонізовані мікотоксини вводяться в мас-спектрометр і розділяються за співвідношенням маси і заряду (m/z). Це дає змогу ідентифікувати окремі компоненти в складних сумішах. Після поділу іони детектуються і реєструються, утворюючи мас-спектр, який являє собою графік залежності інтенсивності іонів від m/z . Положення піків на спектрі дає інформацію про молекулярну масу мікотоксину. Кількісне визначення проводиться шляхом порівняння інтенсивності піку в зразку з піком стандарту відомої концентрації. Площа під піком корелює з концентрацією аналізованої сполуки. Фрагментація: мікотоксини часто фрагментуються в мас-спектрометрі для отримання додаткової структурної інформації. Цей процес, званий тандемною мас-спектрометриєю (MS/MS), допомагає підтвердити ідентичність мікотоксинів завдяки характерній картині фрагментації.

Мас-спектрометрія - один із найсучасніших і найточніших методів виявлення мікотоксинів. Він забезпечує детальну молекулярну інформацію, високу чутливість і здатність аналізувати складні зразки, що робить його незамінним інструментом для забезпечення безпеки харчових продуктів, екологічного моніторингу та клінічної діагностики. Однак він пов'язаний з високими витратами і складними технічними вимогами.

1.2.2. Переваги та недоліки класичних методів у порівнянні зі СПР.

Класичні методи точні та чутливі (особливо мас-спектрометрія та ВЕРХ). Ці методи дають змогу отримати детальну кількісну інформацію навіть за дуже низьких концентрацій мікотоксинів.

Мас-спектрометрія та високоефективна рідинна хроматографія дуже точні для ідентифікації та кількісного визначення мікотоксинів у складних зразках, таких як харчові продукти та корми. Однак вони вимагають складного обладнання та кваліфікованих фахівців.

Методи СПР є менш точними і не такими точними та чутливими, як мас-спектрометрія та ВЕРХ, особливо за низьких концентрацій. Точність методу залежить від правильного калібрування і специфічності антитіл, що використовуються. Проте, СПР може досягти високої чутливості при кількісному аналізі, особливо для біологічних зразків.

Витрати часу – такі методи, як ВЕРХ і мас-спектрометрія, вимагають значного часу на підготовку й аналіз зразків, оскільки для досягнення необхідної чутливості та точності потрібно кілька етапів очищення, екстракції та калібрування. Наприклад, ВЕРХ-аналіз одного зразка може зайняти кілька годин.

СПР набагато швидший метод аналізу проб, оскільки він не потребує складної пробопідготовки і виконується безпосередньо на спеціальних сенсорах. Тому результати можна отримати протягом декількох хвилин, що значно скорочує час аналізу порівняно з традиційними методами.

1.3. Принцип роботи методу поверхневого плазмонного резонансу

Поверхневий плазмонний резонанс (СПР) - це метод виявлення патогенних мікроорганізмів без використання міток. Він дозволяє проводити високочутливе вимірювання взаємодії в режимі реального часу без необхідності нанесення міток на аналізовані молекули. СПР базується на зміні резонансного кута поверхневого плазмону, що відбувається при взаємодії молекул на поверхні сенсора, і є корисним для виявлення зв'язування біомолекул, таких як білки, нуклеїнові кислоти і мікотоксини. Він корисний для виявлення зв'язування біомолекул, таких як білки, нуклеїнові кислоти та мікотоксини.

Поверхневий плазмонний резонанс (СПР) виникає, коли падаючі фотони світла потрапляють на металеву поверхню, зазвичай на поверхню золота. Під певним кутом падіння частина світлової енергії передається через металеве покриття електронам у поверхневому шарі металу, які збуджуються і починають рухатися. Ці рухи електронів називаються плазмонами і поширюються паралельно поверхні металу. Коливання плазмонів створюють електричне поле, що простягається на сотні нанометрів від межі розділу між поверхнею металу і досліджуваним розчином.

У комерційно доступних конфігураціях біосенсорів СПР падаюче світло вловлюється за допомогою високовідбиваючої скляної призми в геометрії Кречмана (метод ослабленого повного відбиття). Кут СПР, при якому відбувається резонанс, залежить від показника заломлення матеріалу поблизу поверхні металу, за умови, що довжина хвилі джерела світла постійна, а поверхня металу тонка. Незначні зміни показника заломлення чутливого середовища (наприклад, адгезія біомолекул) перешкоджають утворенню плазмонів і змінюють кут резонансу.

Виявлення відбувається шляхом вимірювання зміни відбитого світла, що реєструється детектором. Для кількісного визначення поверхневої концентрації аналізованої молекули контролюють інтенсивність відбитого світла або резонансний кут. Біосенсори СПР зазвичай мають межу виявлення близько 10 пг/мл і є дуже чутливими для виявлення низьких концентрацій молекул у розчині.

СПР є дуже чутливим, оскільки може виявляти молекули в дуже низьких концентраціях (від наномолярних до пікомольних). Така висока чутливість дозволяє СПР виявляти навіть слідові кількості мікотоксинів у продуктах харчування та кормах, що є важливим для контролю безпеки харчових продуктів та якості продукції. Цей метод дозволяє здійснювати ефективний моніторинг мікотоксинів навіть у дуже низьких концентраціях і є важливим для своєчасного виявлення забруднення та запобігання потенційним ризикам для здоров'я людей і тварин.

Методи СПР дозволяють спостерігати за молекулярними взаємодіями в режимі реального часу, що є однією з їхніх головних переваг. Це дає змогу швидко отримувати результати і безперервно контролювати процеси зв'язування та дисоціації молекул. Така можливість моніторингу, яка не потребує попереднього аналізу або додаткових етапів обробки зразків, робить СПР надзвичайно ефективним і зручним для вивчення динаміки біомолекулярних взаємодій. Крім того, він надає дуже точні дані про кінетику зв'язування і дисоціації, що важливо для механістичних досліджень біохімічних процесів, розробки ліків, діагностики та контролю якості в біомедичній і харчовій промисловості.

Цей метод не вимагає використання етикеток або маркерів, таких як флуоресцентні або радіоактивні мітки. Це значно спрощує аналітичний процес, усуваючи трудомісткі та ресурсомісткі етапи маркування та підготовки зразків. Відсутність маркування також знижує вартість реагентів та обладнання, необхідних для маркування молекул, що робить метод більш економічно ефективним. Крім того, відсутність мічення знижує ризик помилок, пов'язаних з використанням мічення, оскільки немає необхідності враховувати втрату активності мітки або її вплив на молекулярні взаємодії, що призводить до отримання більш точних і надійних результатів.

СПР виконує аналіз без фізичного контакту зі зразком, що є ще однією важливою перевагою цього методу. Ця особливість зводить до мінімуму ризик забруднення та зміни зразка.

СПР виконує аналіз без фізичного контакту зі зразком. Оскільки зразок не вступає в прямий контакт з детектором або іншими компонентами приладу, ця особливість зводить до мінімуму ризик забруднення або зміни зразка під час тестування. Це особливо важливо в дослідженнях, де важливо зберегти природний стан молекул і чутливих біологічних компонентів. Відсутність фізичного контакту дозволяє отримувати більш точні і надійні дані, зберігаючи цілісність зразка, що робить СПР ідеальним для аналізу біомолекул, мікотоксинів та інших чутливих речовин.

СПР не тільки виявляє наявність токсинів, але й дозволяє вивчати взаємодію між молекулами в реальному часі. Це дає можливість аналізувати кінетичні властивості взаємодії, такі як швидкість зв'язування (коефіцієнт асоціації) та швидкість дисоціації (коефіцієнт дисоціації).

Завдяки здатності реєструвати точні зміни оптичних властивостей поверхні сенсора, метод СПР забезпечує високу точність і стабільність результатів, навіть протягом декількох циклів вимірювання. Ця властивість є важливою, оскільки вимірювання можна повторювати без шкоди для властивостей і якості сенсора. Висока точність вимірювання дозволяє точно відстежувати навіть невеликі зміни молекулярної концентрації, що дає змогу виявляти низькі рівні токсинів, білків та інших біомолекул, які є важливими для аналізу біологічних процесів і контролю якості продукції.

Крім того, результати залишаються стабільними навіть після декількох циклів вимірювання, що дозволяє легко відтворювати експерименти і перевіряти точність, а також отримувати відтворювані дані без шкоди для чутливості або точності, підвищуючи таким чином надійність методу СПР. Таким чином, СПР є ідеальним методом для застосувань, де важлива безперервна і точна документація молекулярних взаємодій, таких як токсикологія, біомедичні дослідження і безпека харчових продуктів.

Розділ 2. Матеріали і методи дослідження

2.1. Об'єкти дослідження.

Охратоксин А міститься в багатьох продуктах, таких як злаки, зернові та бобові культури, іноді може потрапити навіть в какао та спеції. Він є потужним токсином, що вражає нирки та викликає гострі та хронічні ураження. Хімічно містить ізокумариновий фрагмент, пов'язаний пептидним зв'язком з фенілаланіном.

Вважалося, що він є збудником балканської ендемічної нефропатії, це захворювання нирок, через яке загинуло багато людей в районах Болгарії, Югославії та Румунії, але нещодавні дослідження показали, що охратоксин А присутній у крові більшості європейців, але наслідки для здоров'я людини залишаються невизначеними. Жоден людський синдром не був однозначно пов'язаний з охратоксином А.

Зерно має важливе стратегічне значення в сільському господарстві. Воно забезпечує продовольчу безпеку, є основою для кормів і біоенергетики, має економічну цінність і сприяє розвитку сільськогосподарської інфраструктури. Це один з найбільш важливих ресурсів, що визначає добробут і розвиток багатьох країн і регіонів світу.

Вівсо є цінним джерелом складних вуглеводів, білка, клітковини та корисних жирів. Овес багатий на бета-глюкан, який сприяє зниженню рівня холестерину в крові. Він є основою для виробництва таких продуктів як вівсяні пластівці, мюслі, а також використовується для приготування каш, борошна, випічки тощо. Його часто використовують в якості корму для худоби, зокрема для коней, великої рогатої худоби та птиці. Зерно вівса добре засвоюється тваринами, що робить його важливим компонентом комбікормів. Крім цього він здатний збагачувати ґрунт азотом завдяки своїм кореневим системам, що робить його корисним у сівозмінах, особливо як попередник для інших культур. Це допомагає зберегти родючість ґрунтів, забезпечуючи їх не тільки органічними речовинами, але й покращує структуру ґрунту, що є корисним для сільськогосподарських угідь.

Кукурудза є важливим джерелом вуглеводів, що забезпечує енергією організм людини. Вона використовується для виробництва борошна, крупи, попкорну, а також у вигляді консервів і соку. Крім цього являється основною сировиною для виробництва кукурудзяного сиропу, що використовується як підсолоджувач у харчовій промисловості. Її використовують, як компонент комбікормів для великої рогатої худоби, свиней, птиці та інших тварин,

оскільки вона має високу енергетичну цінність. Вона також активно задіяна в біоенергетиці для виробництва етанолу, що є альтернативним джерелом енергії. Кукурудзяний етанол є важливим компонентом паливної промисловості, особливо в країнах, таких як США, Бразилія. З кукурудзи виробляються численні продукти, зокрема кукурудзяна олія, крохмаль (який використовують у харчовій, текстильній та фармацевтичній промисловості) та інші продукти, що застосовуються в різних сферах економіки. Вона є стійкою до різних ґрунтових умов. Завдяки своїй високій врожайності та здатності до швидкого росту, кукурудза є важливою культурою для забезпечення продовольчої безпеки.

2. 2. Методи ізоляції та підготовки зразків

Метод поверхневого плазмонного резонансу (СПР) є високочутливим і специфічним для виявлення молекул, таких як мікотоксини, в різних зразках, зокрема в харчових продуктах і сировині. Для виділення та кількісного визначення охратоксину А за допомогою СПР застосовують специфічні антитіла або молекулярні конструкції, які можуть зв'язувати охратоксин А на сенсорній поверхні.

Для детекції охратоксину А на поверхні СПР сенсора створюється самозбірний моношар, що складається з молекул, здатних зв'язувати охратоксин А. Для цього використовуються антитіла або кон'югати, такі як антитіло проти охратоксину А або кон'югат охратоксину А з полімерами або білками. На сенсори наносяться функціоналізовані молекули, які утворюють активні місця для специфічної взаємодії з охратоксином А.

Для приготування кон'югату потрібен ОТА-активований похідний (ОТА-PEG-CO₂H). Для синтезу ОТА-PEG-CO₂H потрібно змішати:

- Охратоксин А (1) (25 мг, 0,06 ммоль),
- N-(t-бутоксикарбоніл)-триоксатридеканедіамін (25 мг, 0,08 ммоль),
- DCC (1,3-дикарбонілциклогексилкарбодіімід) (16 мг, 0,08 ммоль),
- Триетиламін (1 мл),
- У дихлорметані (15 мл).

Змішування потрібно проводити при кімнатній температурі під атмосферою азоту протягом 20 годин. Після реакції розчин фільтрували та концентрували під вакуумом при температурі 40°C. Одержаний залишок було очищено методом флаш-хроматографії на силікагелі (5 г),

використовуючи суміш дихлорметану та метанолу (9:1), що призвело до отримання ОТА-PEG-NH₂ (42 мг, 96%).

Після цього ОТА-PEG-NH₂ потрібно розчинити в дихлорметані (DCM) (2 мл), до неї додається мурашина кислота (2 мл). Суміш потрібно перемішують при кімнатній температурі під азотом протягом 8 годин. Після реакції розчинники випаровуються під азотним потоком, утворюючи ОТА-PEG-NH₂ (35 мг).

Далі йде реакція з сукцинангідридом: коли ОТА-PEG-NH₂ (35 мг) розчиняється в диметилформаміді (DMF) (15 мл). При постійному перемішуванні розчину, потрібно додати триетиламін (0,1 мл), а після нього сукцинангідрид (6 мг) у диметилформаміді (3 мл) додається краплинно протягом 20 хвилин. Суміш перемішують при кімнатній температурі під азотом протягом 22 годин. Після реакції розчинники випаровуються під азотним потоком, а залишок піддається флеш-хроматографії на силікагелі (10 г) з елюентом дихлорметан–метанол–оцтова кислота (85:10:5), що дає продукт ОТА-PEG-CO₂H (5) (35 мг, 85% вихід).

Наприкінці кон'югат (2,5 мл) додатково очищають, пропускаючи через колону PD-10, використовуючи PBS/T як елюент, і очищений кон'югат (3,5 мл) збирають. Концентрацію білка в ОТА-PEG-OVA визначають за допомогою біціхінонатного кислотного тесту.

Для приготування зразків ОТА, потрібно розвести стандартний розчин (1 мг/мл). Проміжні стандартні розчини концентрацією 100, 10 і 1 мкг/мл були приготовані шляхом розведення основного стандартного розчину в метанолі. Ці розчини зберігалися при – 20 °С. Робочі стандартні розчини готувалися шляхом подальшого розведення проміжних розчинів у буфері HBS-EP.

Для дослідження з додаванням (спайку) ОТА в злаки було підготовлено кілька зразків по 0,5 г кожного з молотих зерен кукурудзи. Розчини (0,5 мл) ОТА, розведені в метанолі до різних концентрацій, додавали в окремі зразки (0,5 г) кожного злаку, після чого дозволяли розчиннику випаруватися протягом ночі в витяжній шафі. Спайковані зразки змішували з 2 мл метанол/вода (50:50, v/v) і екстрагували протягом 30 хвилин в ультразвуковій ванні. Потім суміш центрифугували при 5000 об/хв при 4 °С протягом 10 хвилин. Збірки прозорих надосадових рідин забирали, розбавляли буфером HBS-EP і використовували без додаткового очищення для аналізу.

Наступним кроком потрібно іммобілізувати ОТА-PEG-OVA та ОТА-BSA на поверхні mSAM. Для цього поверхня mSAM була сформована шляхом депонування суміші 11-MUOH та 16-MHA (10 мМ, 9:1) на голому золотому чіпі. Потім, кон'югати ОТА-BSA або ОТА-PEG-OVA з концентрацією білка 0,5 мг/мл в буфері 10 мМ натрієвої ацетатної кислоти, рН 4,0, були іммобілізовані на поверхні за допомогою комплекту для амінокислотної взаємодії, наданого виробником. Для обох лігандів було досягнуто подібний рівень іммобілізації — 2500 RU. Як референсну потікову клітку побудовано зразок шляхом іммобілізації хлорамфенікол-PEG-OVA.

2.3. Метод поверхневого плазмонного резонансу для дослідження мікотоксинів

Метод СПР базується на явищі, коли поверхневий плазмонний резонанс (коливання електронів на поверхні металу) змінюється у відповідь на зміну індексу заломлення на поверхні. Зазвичай, при використанні СПР, на металеву поверхню (наприклад, золото) фіксують антитіла або інші біологічні молекули, що специфічно зв'язуються з цільовою речовиною (наприклад, мікотоксином).

При взаємодії мікотоксину з антитілом або іншим біосенсором на поверхні металу відбувається зміна індексу заломлення, що реєструється сенсором. Цей сигнал дозволяє виміряти концентрацію токсину в зразку, що аналізується.

Визначення ОТА в буфері та різних зразках проводилося за допомогою формату конкурентного інгібування. Аналізи виконувалися шляхом змішування mAb (0,5 мкг/мл) з серією стандартних розчинів ОТА в буфері HBS-EP або екстрактах зразків у діапазоні від 0 до 1 мкг/мл у співвідношенні 1:1 (v/v). Після інкубації суміші інжектували на поверхню (75 мкл, 25 мкл/хв), після чого одразу інжектували IgG/нанозолото (40 нм, 40 мкл, 25 мкл/хв), а потім проводили регенерацію для наступного циклу зв'язування.

Для цього комерційний кон'югат ОТА-BSA був ковалентно іммобілізований на поверхні змішаного SAM, що складається з 10% 16-MHA та 90% 11-MUOH за допомогою комплекту для амінокислотної взаємодії, досягнувши рівня іммобілізації 2500 RU. Це відповідає 2,5 нг ОТА-BSA на мм² поверхні сенсора, розраховано за співвідношенням 1 RU, що відповідає зміні концентрації білка на поверхні 1 пг на мм². Оптимальні умови для Віасоре були визначені як концентрація антитіла 20 мкг/мл, змішана з стандартами ОТА в співвідношенні 1:1, швидкість потоку 25 мкл/хв, час

контакту 3 хвилини, після чого проводили 1-хвилинний імпульс розчину регенерації (50 мМ гуанідину в 50 мМ гліцині, рН 2.0).

Зразки зерна, спіковані різними концентраціями ОТА, екстрагували за допомогою 50% метанолу у воді (v/v). Потім екстракти були розведені буфером HBS-EP для отримання розчину ОТА з остаточною концентрацією 10% метанолу. Після змішування розчину ОТА з моноклональним антитілом (МАБ) у співвідношенні 1:1, зразок пропускали через поверхню, де знаходився ОТА, після чого на поверхню інжектували наночастинки золота (Au) для підвищення чутливості СПР імуноаналізів..

Розділ 3: Результати та обговорення

3.1. Аналіз чутливості СПР у різних матрицях

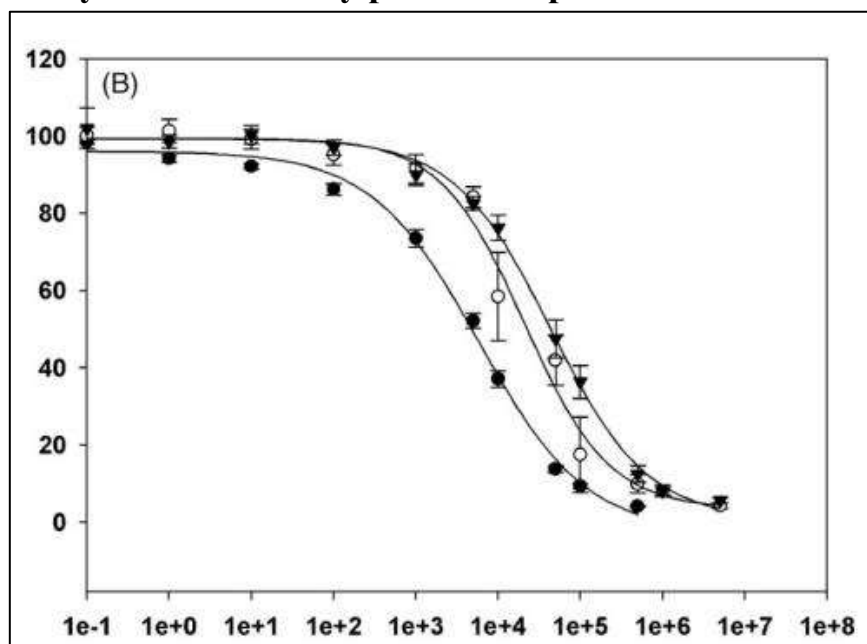


Рис. 3.1.1. Стандартні криві для ОТА в екстрактах з вівса та кукурудзи.

Порівняння трьох стандартних кривих вимірювання ОТА в буфері HBS-EP (●), а також для зразків, заражених овсом (○) або кукурудзою (▼). Стрілки помилки показують стандартну помилку середнього значення при $n = 5$.

Порівняно з кривою для ОТА в розчині HBS-EP/метанолу (10%), криві для вівса та кукурудзи злегка зсунулися до вищих концентрацій, що свідчить про певне гальмування зв'язування, спричинене самою зерновою матрицею. Однак межі виявлення для ОТА, спікованого у вівсі або кукурудзі, були виміряні як 0.33 ± 0.034 та 0.5 ± 0.022 нг/мл відповідно. Ці значення є нижчими, ніж ті, що отримані за допомогою інших методів біосенсора, і схожими на значення, отримані за допомогою ELISA/HPLC, але досягнуті набагато швидше та простіше.

3.2. Порівняння результатів СПР з іншими методами

Для порівняння використаємо метод ELISA це швидкий і чутливий метод визначення мікотоксинів. Заснований на використанні антитіл, які специфічно взаємодіють з мікотоксинами,

Три зразки, заражені охратоксином А були протестовані за допомогою методу ELISA. Відносні крос-реактивності антитіл до вівсі та кукурудзі були обчислені як 26.98% та 137.23% відповідно.

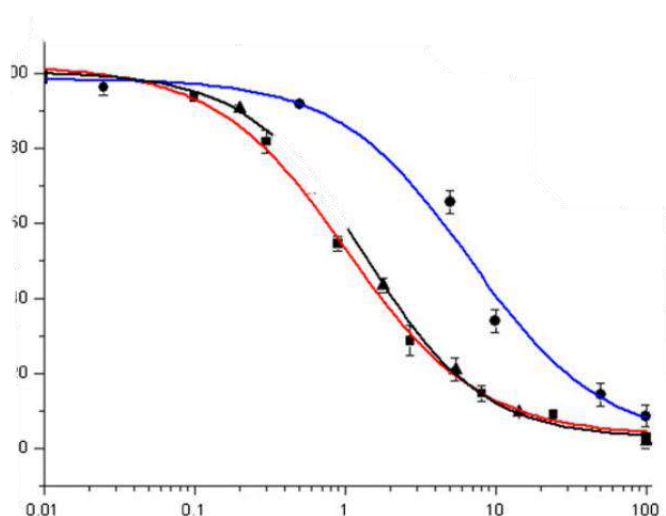


Рис. 3.2.1. Стандартні криві для ОТА в екстрактах з вівса та кукурудзи.

Порівняння трьох стандартних кривих вимірювання вільне (●), а також для зразків, заражених овсом (○) або кукурудзою (▼). Стрілки помилки показують стандартну помилку середнього значення при $n = 5$.

3. 3. Можливі фактори впливу на точність результатів

Температура є важливим фактором, що впливає на швидкість хімічних реакцій і взаємодії між антитілами та аналітами. Висока температура може спричинити денатурацію білків, що призведе до втрати специфічності антитіла або його здатності зв'язуватися з аналітом. З іншого боку, низька температура може уповільнити кінетичні процеси зв'язування і дисоціації, що може спотворити результати, зокрема, збільшити час, необхідний для досягнення рівноваги в реакціях. Для аналізу на СПР рекомендується проводити вимірювання при кімнатній температурі або в діапазоні 20-25°C, щоб уникнути збоїв у процесах зв'язування та розриву зв'язків.

pH середовища сильно впливає на заряд молекул (як антитіл, так і аналізованих молекул), а отже — на їх здатність до взаємодії. Зміни pH можуть викликати зміну структури та зарядової конфігурації білків, що може знизити ефективність їх взаємодії або спричинити блокування зв'язування через стеричні ефекти. Для більшості антитіл оптимальний pH знаходиться в межах від 7,0 до 8,0. Для інших молекул, як-от мала молекула ОТА, може

знадобитися корекція рН до значень близько 7,4, щоб забезпечити стабільність як антигену, так і антитіла.

Для мінімізації впливу матричних ефектів використовують додаткові кроки очищення або розведення зразків перед аналізом, а також додають добавки, такі як полівінілпіролідон (PVP), що знижують неспецифічне зв'язування. Інші методи, такі як блокування або використання фіксованих проб, також можуть бути застосовані для зменшення інтерференцій.

Необхідно провести оптимізацію часу, за який антитіло та аналіт досягають рівноваги. Оскільки СПР є кінетичним методом, зазвичай застосовуються часи від кількох хвилин до десятків хвилин для забезпечення належного зв'язування.

Розділ 4: Висновки та рекомендації

4.1. Основні висновки дослідження

Мікотоксини можуть бути швидко і легко виявлені в польових умовах за допомогою простого одноетапного процесу екстракції зразків зерна водним метанолом або попередньої обробки рідких зразків полівінілпірролідом для усунення перешкод, викликаних поліфенолами, і регулюванням рН. Межа виявлення ОТА у зернових та напоях становила менше 0,5 нг/мл, а загальний час аналізу зразка — менше 10 хвилин (після екстракції). Це порівнянno або навіть краще, ніж ІФА та інші аналітичні методи, що використовуються в даний час для аналізу харчових продуктів. Крім того, у нашій методиці використовуються недорогі реагенти (IgG/нанозолото), що значно знижує необхідну концентрацію дорогих mAb-реагентів, що застосовуються в аналізі. Окрім того, метод оснований на високостабільній поверхні сенсора, яка може виконувати більше 600 циклів зв'язування/відновлення на одному чипі.

4.2. Практичні рекомендації

ОТА може сильно зв'язуватися з плазмовими білками, такими як BSA. Це неспецифічне зв'язування може серйозно вплинути на ефективність аналізу, оскільки вільний ОТА, що знаходиться в розчині, може адсорбуватися на поверхневому BSA. Збільшення концентрації солі в буфері для аналізу може знизити неспецифічне зв'язування, тому необхідно було додати 0,3 М NaCl до робочих розчинів ОТА.

Використання Au-наночасток для підсилення чутливості СПР імуноаналізу, що дозволяє підвищити ефективність аналізу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- 1) «Методи відбору та підготовки проб для визначення мікотоксинів у харчових матрицях», Лаура Карбонелл-Розас, Хесус Марін-Саес, Марта Варгас-Перес, 2018 рік.
- 2) «Афлатоксин: глобальна проблема охорони здоров'я», Дж. Д. Группман, Г. Н. Воган, 2002 рік.
- 3) «Управління безпечністю харчових продуктів», Пабло А. Карріон, Ларрі Дж. Томпсон, 2009 рік.
- 4) «Оливки та оливкова олія для здоров'я та профілактики захворювань», К'яра Кавальєре, Патриція Фолья, Роберто Сампері, Альдо Лагана, 2015 рік.
- 5) «Енциклопедія харчової мікробіології (друге видання)», А. Б'янкіні, Л. Б. Буллерман, 2014 рік.
- 6) «Енциклопедія харчування людини (третє видання)», Дж. Д. Группман, Т. В. Кенслер, Ф. Ву, 2013 рік.
- 7) «Досягнення в дослідженні продуктів харчування та харчування», Єлка Плеадин, Ядранка Фресе, Ксенія Маркова, 2019 рік.
- 8) «Енциклопедія харчової хімії», Йорг Строка, Карлос Гонсалвес, 2019 рік.
- 9) «Енциклопедія їжі та здоров'я», М. Мостром, 2016 рік.
- 10) «Енциклопедія харчової алергії», Сесіль Фруж'є, Філіп Бегін, 2024 рік.

ДОДАТОК

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ МАГІСТЕРСЬКОЇ РОБОТИ

«Дослідження біосенсорного детектування мікотоксинів в різних матрицях.», Шкарбан П.О., Таран О.П. Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції здобувачів вищої освіти, присвяченій 126-річчю НУБіП України (23 квітня 2024 р.) – Київ. – 2024. – с. 264.

УДК 579.2:614.31 «ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСЕНСОРНОГО ДЕТЕКТУВАННЯ МІКОТОКСИНІВ В РІЗНИХ МАТРИЦЯХ», Шкарбан П.О., студентка 1 курсу магістратури, факультету захисту рослин, біотехнологій та екології, Таран О.П., кандидат біологічних наук, старший викладач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття. Національний університет біоресурсів і природокористування України. X МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ, (24-25 квітня 2024 р.) – Київ. – 2024. – с. 300.

УДК 579.2:614.31 Шкарбан П.О., Таран О.П. «ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСЕНСОРНОГО ДЕТЕКТУВАННЯ МІКОТОКСИНІВ В РІЗНИХ МАТРИЦЯХ», Національний університет біоресурсів і природокористування України. X ВСЕУКРАЇНСЬКА НАУКОВОПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ ТА МОЛОДИХ ВЧЕНИХ «БІОТЕХНОЛОГІЯ: ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ» (2-3 травня 2024 р.) – Київ. – 2024. – с. 78.