

ТЪКАНЕН БИОСЕНЗОР ЗА ИЗМЕРВАНЕ НА ФЕНОЛ НА ПРИНЦИПА НА ИНХИБИРАНЕ

Антония Панделова¹⁾

¹⁾ ТУ-София, бул. "Кл. Охридски" 8, e-mail: apandelova@tu-sofia.bg

Резюме: Разработени са тъканни биосензори за измерване на концентрация на фенол на принципа на инхибиране. Използвана е тъкан от зелена тиквичка *Cucurbita pepo*, източник на ензима аскорбат оксидаза. Изследвано е влиянието на температурата на съхранение на тъканния материал върху изходния сигнал. Биосензорите показват добра линейност и висока чувствителност по отношение на измервания инхибитор. В табличен вид са дадени основните характеристики като *pH* на изследваната среда, линеен измервателен обхват, стойност на корелационния коефициент R^2 , време на реакция. Доказа е възможността на тъканния биосензор да измерва инхибитори на ензима аскорбат оксидаза.

Ключови думи: тъканен биосензор, *Cucurbita pepo*, фенол, инхибиране

1. Въведение

Фенолът е един от опасните замърсители на околната среда. Особено вредно влияние оказва на водата, тъй като попаднал веднъж в нея намалява съдържанието на кислород. Той е суровина за производството на фенолформалдехидни смоли, като по този начин попада в отпадните води на такива производства и сериозно замърсява различните водоеми.

Основни методи за измерване на фенол са хроматографски [1] и спектрофотометрични [2]. Тези методи изискват предварителна обработка на изследваната проба, като например екстракция, почистване, разреждане на пробите, както и включване на допълнителни химикали.

В настоящата работа са разработени два биосензора за количествено измерване на фенол, разработени с тъкан от зелена тиквичка (*Cucurbita pepo*), която съдържа ензима аскорбат оксидаза. Измерванията са извършени в установен режим по метода на последователните добавки. Принципатът им на действие се основава на измерване на концентрацията на разтворения кислород, която се променя вследствие на намаляване на консумацията на кислород, причинено от инхибиторната концентрация.

2. Използвани апаратура и материали

За реализация на биосензорната система се използва електрохимичен електрод тип Кларк, измерващ съдържанието на разтворения кислород в измервателната клетка. Електродът е свързан към оксиметър HANNA INSTRUMENTS 9146-04, на чийто дисплей се визуализират резултатите от измерването. Цифров *pH* метър на фирмата

HANNA INSTRUMENTS, модел HI 251, служи за контролиране на *pH* в средата. Цифрова пипета PL100 се използва за поставяне на субстрат и инхибитор в измервателната клетка. Използват се още аналитична везна Cole Parmer RZ 11700-42 и електромагнитна бъркалка BOECO MSH 300.

При провеждане на експериментите са използвани химически чисти вещества – аскорбинова киселина, фосфати, фенол, закупени от Merck, както и тъкан от зелена тиквичка *Cucurbita pepo*, закупена от търговската мрежа.

3. Конструкция на биосензорния преобразувател и принцип на действие

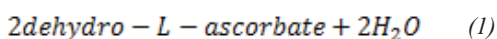
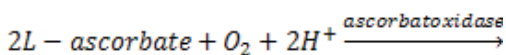
Биосензорната измервателна система се състои от биоматериал на качеството на първичен биосензорен преобразувател, междинен преобразувател и цифров оксиметър [3]. Като биологичен материал се използва тъкан от зелена тиквичка *Cucurbita pepo*, източник на ензима аскорбат оксидаза. Необходимото количество растителна тъкан, 30 mg, се претегля на аналитична везна и се стрива върху предметно стъкло до получаване на хомогенна каша. Хомогенатът се поставя внимателно върху тефлоновата мембрана на кислородния електрод, така че да покрие плътно катода, след което се затваря с диализна мембрана. Диализната мембрана е с дебелина 25 μm , служи за захващане на тъканната активна мембрана върху кислородната тефлонова мембрана. Освен това разделя биоматериала от изследваната среда. Конструкцията на биосензорния и междинния преобразувател е показана на фиг. 1.

Биосензорният преобразувател и *pH*-електродът на *pH* метъра са потопени в измервателната

клетка, която е поставена върху електромагнитна бъркалка.

Разработеният тъканен биосензор се използва за измерване на концентрация на фенол. Измерванията се извършват в установен режим по метода на последователните добавки. Принципът на действие се основава на протичане на реакция между анализираното вещество и ензима, което е свързано с промяна на кислородното съдържание в реакционния обем.

При потапяне на тъкания биосензор в измервателната клетка и при наличие на аскорбинова киселина в активната мембрана на биосензора протича ензимно-катализирана реакция с консумация на кислород:



Фенолът се явява конкурентен инхибитор на аскорбиновата киселина за активният център на ензима аскорбат оксидаза. Наличието на фенол води до забавяне на скоростта на реакцията между аскорбиновата киселина и аскорбат оксидазата, което от своя страна води до по-бавно усвояване на молекулярния кислород, намиращ се в измервателната клетка. Инхибирането на ензимната реакция от фенола води до увеличаване на кислородната концентрация. Промяната на количеството разтворен кислород е пропорционална на концентрацията на фенол в реакционната среда.

4. Експериментални изследвания

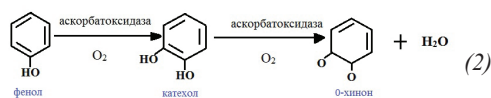
За провеждане на експерименталните изследвания се използва цифров оксиметър, който трябва подлежи на калибровка. Уредът се калибрира автоматично при поставяне на кислородната сонда във въздушна среда и натискане на съответния бутон от предния панел. Процесът отнема няколко секунди. Препоръчително е калиброването да се извършва преди всяко конструиране на нов биосензор. След калиброване на кислородния сензор се конструира биосензорния преобразувател.

Измервателната клетка с обем 20 ml се поставя върху електромагнитна бъркалка, с която се осигурява непрекъснато разбъркване на изследвания разтвор с постоянна скорост 500 rev/min. Избрано е оптимално рН 7 на буферния разтвор по отношение на активността на ензима [4, 5] и измерването на фенол [6].

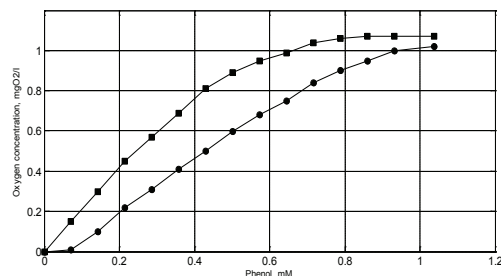
Процесът на първоначалното сработване на биосензорният преобразувател продължава 50-60

min. Това време осигурява максимално насищане на активната мембрана с кислород, което се отчита от установено показание на оксиметъра.

След установяване на изходния сигнал, отговарящ на наситена концентрация на кислород, в измервателната клетка се поставя определено количество аскорбинова киселина с известна концентрация. Вследствие на протичане на реакция (1) кислородът в реакционния обем се изчерпва. След достигане на ново равновесно състояние, което се отчита от дисплея на оксиметъра, започват последователно да се добавят количества фенол с фиксиран обем. Протича реакция (2), по време на която се възстановява кислородното съдържание. Концентрацията на фенол се определя косвено по концентрацията на кислород в измервателната клетка.



За целите на изследването са разработени два тъканни биосензора: БС1 с тъкан от тиквичка, престояла 12 часа при температура 20°C; БС2 с тъкан от тиквичка, престояла 12 часа при температура 30°C. Получените функции на преобразуване за двата биосензора са дадени на фиг. 1.



Фигура 1. Функция на преобразуване на тъканен биосензор за фенол; ● – БС1, ■ – БС2.

От фиг. 1 се вижда, че БС1 притежава по-широка линейна зона, функцията по-плавно навлиза в зоната на насищане. БС2 от своя страна се характеризира с по-висока чувствителност за сметка на по-късия линеен участък.

В таблици 1 и 2 са дадени основните характеристики на двата биосензора.

Таблица 1. Основни параметри за БС1

Параметър	Стойност
Температура	20°C
pH	7
Линеен обхват	800-950 μM
Максимално инхибиране	1.02 mM
Бързодействие	10-15 min
Уравнение в линейната зона	$1,6x+0.071$
R^2	0.9809
Праг на откриваемост	23.9 μM

Таблица 2. Основни параметри за БС2

Параметър	Стойност
Температура	20°C
pH	7
Линеен обхват	до 500 μM
Максимално инхибиране	800 μM
Бързодействие	10-15 min
Уравнение в линейната зона	$1,6x+0.071$
R^2	0.9897
Праг на откриваемост	8.7 μM

5. Изводи

В представената работа са разработени два биосензора за измерване на концентрация на фенол на принципа на инхибиране. За направата на биосензорите е използвана тъкан от зелена тиквичка *Cucurbita pepo* като биологичен раз-

познавателен елемент. Проведени са експериментални изследвания за снемане на функцията на преобразуване. Изследвано е влиянието на температурата на съхранение на тъканния материал върху чувствителността и линейната зона на двата биосензора. Проведените експерименти доказват възможността на тъканния биосензор да измерва инхибитори на ензима аскорбат оксидаза.

6. Литература

- [1] **A. Khoddami, M. A. Wilkes, T. H. Roberts.** *Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds.* Molecules 2013, 18, p. 2328-2375
- [2] **M S. Stanković.** *Total phenolic content, flavonoid concentration and Antioxidant activity of Marrubium peregrinum L. Extracts.* Kragujevac J. Sci. 33, 2011, p. 63-72
- [3] **А. Панделова, Н. Стоянов.** *Влияние на pH върху изходен сигнал на тъканен биосензор за аскорбинова киселина.* Годишник на ТУ-София, 63, 2013, с. 235-240
- [4] **A. PISOCHI, G. P. Negulescu.** *Ascorbic acid determination by an amperometric ascorbate oxidase-based biosensor.* Rev. Chim, 61, 4, 2010. p. 339-344
- [5] **Rekha K., Gouda M. D., Thakur M. S., Karanth N. G.** *Ascorbate oxidase based amperometric biosensor for organophosphorous pesticide monitoring.* Biosensors and Bioelectronics, 15, 2000, p. 499-502.
- [6] **Н. Стоянов.** *Изследване на аналитичните характеристики на биосензорна система за измерване на фенол.* ЕИООС, 1, 2012, с. 44-49.

Данни за авторите:

Антония Любенова Панделова, маг. инж., специалност „Автоматика и системотехника“ (2000 г.), Доктор (2011 г.) Главен асистент (2011 г.), катедра „Електроизмервателна техника“, факултет Автоматика, ТУ-София. Научни интереси: екологичен мониторинг.

TISSUE BASED BIOSENSOR FOR PHENOL DETERMINATION USING THE PRINCIPLE OF INHIBITION

*Antonia Pandelova*¹⁾

¹⁾ TU-Sofia, Kl. Ohridsky Blv. 8, e-mail: apandelova@tu-sofia.bg

Abstract: Tissue biosensors for measuring concentration of phenol using principle of inhibition were developed. Zucchini tissue *Cucurbita pepo* is used as source of the enzyme ascorbate oxidase. The influence of the storage temperature of the tissue material on the output signal was investigated. Biosensors show good linearity and high sensitivity to the measured inhibitor. In tabular form shows the basic characteristics such as pH of the analysis medium, the linear measurement range, a value of the correlation coefficient R^2 , reaction time. It proved the possibility of tissue biosensor to measure inhibitors of the enzyme ascorbate oxidase.

Key-Words: tissue biosensor, *Cucurbita pepo*, phenol, inhibition

References

[1] A. Khoddami, M. A. Wilkes, T. H. Roberts. *Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds*. Molecules 2013, 18, p. 2328-2375

[2] M S. Stanković. *Total phenolic content, flavonoid concentration and Antioxidant activity of Marrubium peregrinum L. Extracts*. Kragujevac J. Sci. 33, 2011, p. 63-72

[3] A. Pandelova, N. Stoyanov. *Vlianie na pN varhu izhoden signal na takanen biosensor za askorbinova kiselina*. Godishnik na TU-Sofia, 63, 2013, c. 222-227

[4] A. Pisochi, G. P. Negulescu. *Ascorbic acid determination by an amperometric ascorbate oxidase-based biosensor*. Rev. Chim, 61, 4, 2010. p. 339-344

[5] Rekha K., Gouda M. D., Thakur M. S., Karanth N. G. *Ascorbate oxidase based amperometric biosensor for organophosphorous pesticide monitoring*. Biosensors and Bioelectronics, 15, 2000, p. 499-502.

[6] N. Stoyanov. *Izledvane na analitichnite harakteristiki na biosenzorna sistema za izmervane na fenol*. EIOOC, 1, 2012, c. 44-49.

ТКАНЕВОЙ БИОСЕНСОР ИЗМЕРЕНИЕ ФЕНОЛА СПОСОБОМ ИНГИБИРОВАНИЯ

*Антония Панделова*¹⁾

¹⁾ ТУ-София, бул. "Кл. Охридски" 8, e-mail: apandelova@tu-sofia.bg

Резюме: В докладе описываются разработанные тканевые биосенсоры измерения концентрации фенола с использованием принципа ингибирования. Тыквенная ткань *Cucurbita pepo* используется в качестве источника фермента аскорбата оксидазы. Исследовано влияние температуры сохранения тканевого материала на выходной сигнал. Биосенсоры показывают хорошую линейность и высокую чувствительность к измеряемому ингибитору. В табличной форме приведены основные характеристики, такие как pH среды, линейный диапазон измерения, значение коэффициента корреляции R^2 , время реакции. Доказана возможность тканевого биосенсора для измерения ингибиторов фермента оксидазы аскорбата.

Ключовые слова: тканевой биосенсор, *Cucurbita pepo*, фенол, ингибирование.