

# Nanobiotechnologia – zastosowanie w przemyśle spożywczym

## Cz. 2. Mikro- i nanodiagnostyka w biotechnologii

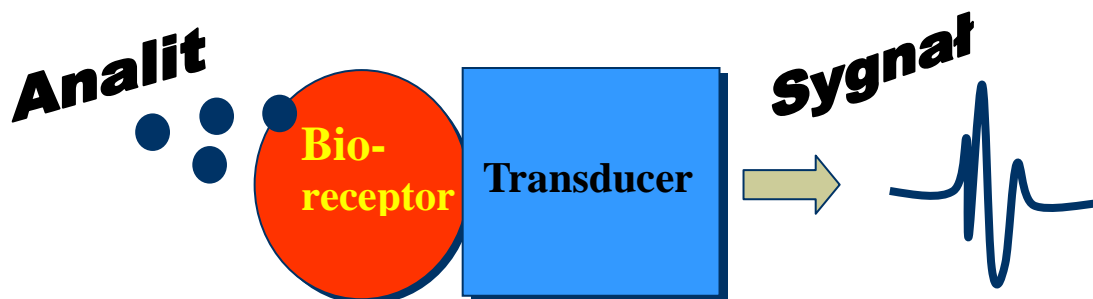
Dr. hab. Anna Sałek

International Bio-Consulting, Germany

### 1. Biosensory i biomarkery w analizie i diagnostyce żywności

Odnosnie kontroli i monitorowania jakości żywności w aspekcie nanotechnik, mówi się przede wszystkim o zastosowaniu miniaturowych biosensorów, które współdziałając z odpowiednimi markerami lub biomarkerami służą identyfikacji obcego DNA, białek, pewnych metabolitów i skażeń chemicznych oraz biologicznych, skracając czas pomiaru z dni do minut lub sekund [1b, 3].

Biosensory są dużą podgrupą sensorów optycznych, mechanicznych i elektrochemicznych, których idea działania opiera się na biologicznych elementach, zw. bioreceptorami, efektywnie rozpoznającymi analizowany składnik (Rys. 1).

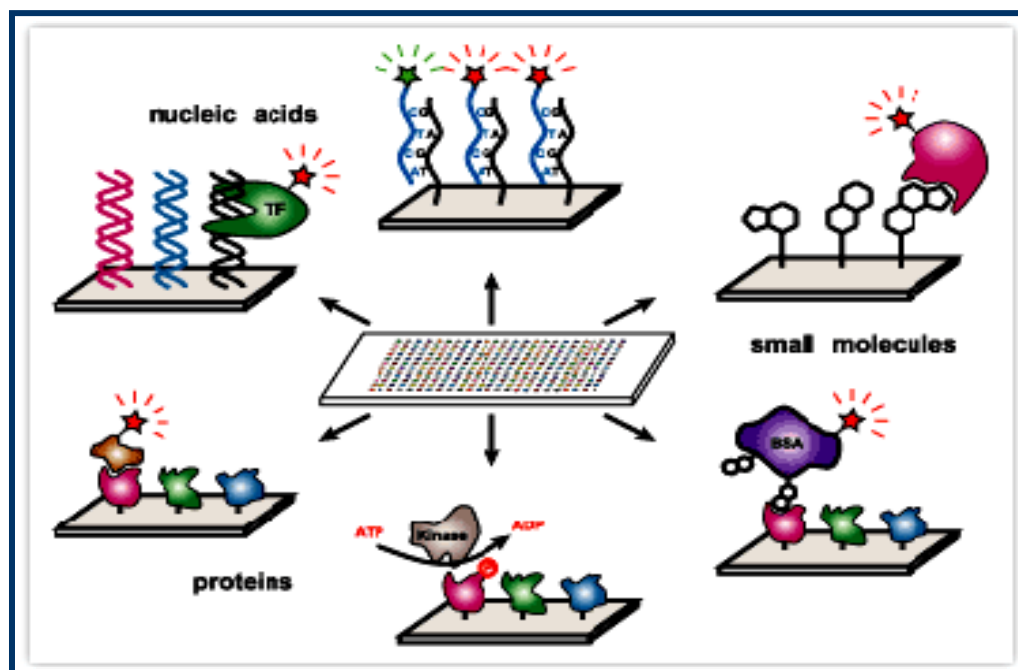


Rys. 1. Konstrukcja biosensora, pracującego w skali mikro i nano.

Spośród kilku typów biosensorów należy wymienić te, których bioreceptory są enzymami, antyciałami, białkami z różnego rodzaju receptorami, oligonukleotydami (głównie cDNA lub natywne *single-strand* DNA), a nawet całymi komórkami połączonymi z chemicznymi lub fizycznymi przenośnikami (transducerami).

Biosensory z uwagi na ich bioreceptor, uzależniony od identyfikowanego biomarkera, dzieli się na (Rys. 2):

- immunosensory (użycie antyciał), hybrydosensory, bazujące na cDNA /RNA kompatybilnym do DNA próbki, znakowane złotem (i dających fluorescencję),
- biosensory enzymatyczne (białkowe) - immobilizowane struktury,
- biosensory zawierające membrany z receptorami naśladującymi naturalne biologiczne receptory,
- biosensory (mikrosensory), zawierające całe, żywe komórki, immobilizowane w szeregach (*array, cell biochip*) z systemem do fluorescencyjnej detekcji,
- jak również biosensory tkankowe (także mikrobiosensory), zawierające struktury komórkowe, bazujące na pomiarach stosunku procesów katalitycznych i oddechowych komórki, w odniesieniu do nanoskali.



Rys. 2. Grupy biosensorów, np. bazujących na DNA, białkach i innych małych cząsteczkach, których działanie polega na pomiarze wydzielanego fotonu świetlnego podczas identyfikacji poszukiwanego składnika [3, 5].

Odbiór sygnałów z bioreceptora odbywa się poprzez, tzw. transducery (patrz Rys. 1), tj. przez pewnego rodzaju przekaźniki, mierzące zmiany powstałe w wyniku połączenia się sensora z analizowaną jednostką (analitem, tj. składnikiem, będącym np. poszukiwanym biomarkerem), przekształcające w ten sposób jedną formę energii w drugą. Czułość systemu pomiarowego jest zdeterminowana typem zastosowanego transducera, np. amperometrycznego, przewodnikowego, potencjometrycznego, cieplnego, czy optycznego. Stąd, mówimy o pomiarach:

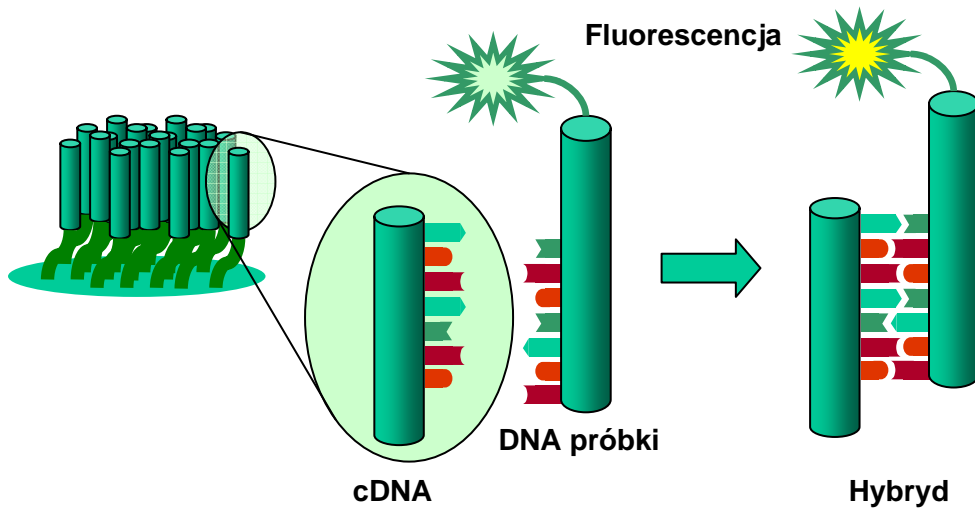
- elektroaktywnych (amperometrycznych) przy użyciu odpowiednich elektrod (np. nanoelektrod węglowych, ze złota, cyny oksydowanej), bardzo czułych,
- zmiany pH rejestrowane przez półprzewodniki (*semiconductors*),
- o pomiarach mikrokalorymetrycznych przez *thermistory*,
- o pomiarach piezoelektrycznych, wskazujących najczęściej na zmiany masy, np. mikroorganizmów,
- i o całym systemie pomiarów świetlnych w aparatach optycznych, jak np. w spektrofotometrach, fluorometrach, luminometrach, czy fotometrach.

Membrany są jednym z najważniejszych komponentów biosensorów, bowiem ochraniają system pomiarowy przed zanieczyszczeniem, eliminują interferencje oraz kontrolują status operacyjny biosensora. Powierzchnie biosensorów są odpowiedzialne za funkcjonalną bioselektywność układu pomiarowego dzięki powinowactwu do pewnych substancji lub na skutek zjawiska odpychania, będącego wynikiem fizyko-chemicznych właściwości membrany. Efekty te są podstawowym narzędziem pomiarowym w nanobiotechnologii, np. detektory i biosensory do monitoringu różnego rodzaju skażeń chemicznych i biologicznych [5].

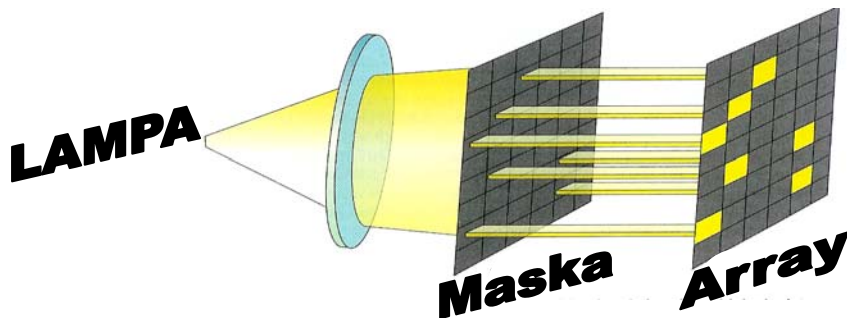
Reasumując, biosensory mogą być użyte do identyfikacji różnych analitów, tj. badanych składników (w tym biomarkerów), jak mikroorganizmów patogennych (metodą fluorescencyjną, chemiluminescencyjną lub piezoelektryczną w połączeniu z immunologiczną), pestycydów, czy różnego rodzaju toksyn (w tym polipeptydowych, czy białkowych mykotoksyn), antybiotyków, obcego DNA, np. GMO lub innych szkodliwych związków. Wyżej wymienione substancje występują, poza środowiskiem naturalnym, w produktach żywnościowych, m.in. w napojach fermentowanych (np. piwo, wino), stąd istnieje konieczność szybkiej i precyzyjnej ich identyfikacji, a te wymagania są w zasięgu możliwości nanobiotechnologii.

## **2. Technika macierzy ( array ) w skali nano (Lab – on – a - chip)**

Miniaturyzacja i automatyzacja metod analitycznych pozwala na wykorzystanie technik genetycznych (genomiki), wyników badań białek (proteomiki) oraz pewnych metabolitów (metabolomiki) w systemach macierzy (mikro- i nanoarray) (Rys. 3, 4 i 5) oraz w systemach NEMS (*Nano-Electromechanical-System*, Rys. 6).

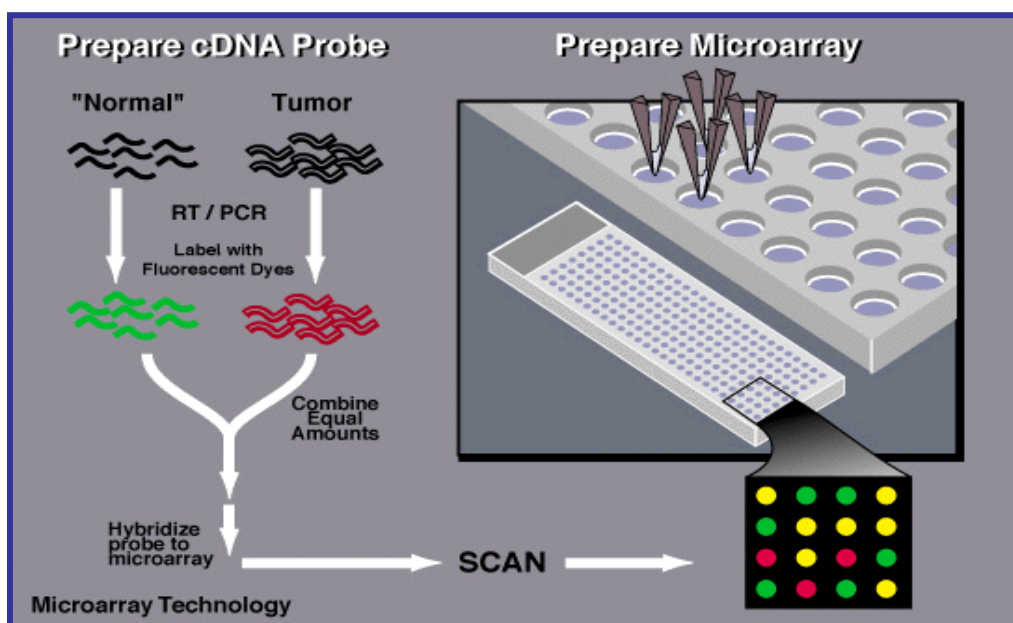


Rys. 3. Hybrydyzacja cDNA na „chipie” (array). Pomiar fluorescencyjny DNA po hybrydyzacji [wg firmy GeneScan, Freiburg-Germany].



Rys. 4. Biosensor bazujący na technice macierzy (microarray).

W przeciwieństwie do technologii mikro- i nanomacierzy, które pozwalają jedynie na przeprowadzanie pojedynczych oznaczeń na jednym elemencie, podstawą idei sensora *lab-on – a –chip* (LOC) jest oparcie całego, tzw. mini laboratorium na małym elemencie nośnym, pomiędzy dwiema elektrodami, w wyniku czego, np. procesy izolacji DNA, mieszania, separacji magnetycznej, detekcji, ew. sekwencjonowania genów oraz analizy danych poddane są ogromnej kumulacji na pojedynczej „platformie”, tj. na bardzo małej powierzchni „chipu”.

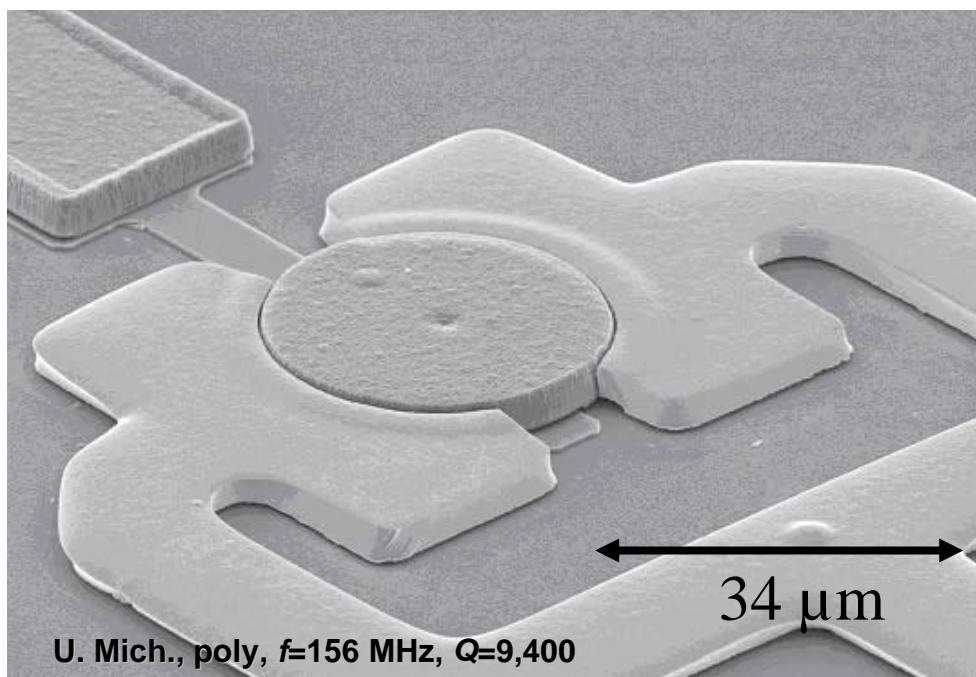


Rys. 5. Technologia macierzy (micro- i nanoarray) z wykorzystaniem genomiki. Zasada funkcjonowania [5].

Tzw. *high-density* DNA biochipy dają możliwość analizy do 10 000 genów równocześnie, inne natomiast, dzięki specyficznej budowie nanobiosensora pozwalają na identyfikację pewnej liczby biomarkerów jednocześnie [1c, 2, 3, 5, 8].

Stąd systemy LOC z tytułu ich miniaturyzacji i różnorodności w konstrukcyjnych rozwiązaniach, mogą służyć jednocześnie kilku niezależnym etapom pomiarowym, np. zanieczyszczeń wody pitnej. Poza tym dzięki mikro- i nanoelektronice oraz mikrofluidyzacji można zrealizować *in real-time* kompletny eksperyment, zużywając minimalne ilości materiałów, rzędu pikomoli.

Konstrukcja systemów NEMS bazuje obecnie na trzech głównych rozwiązaniach technicznych z zakresu nanobiotechnologii, tj. na tworzeniu nanowłókien (*nanotubes*), nano-porów (*channels*) i bioaktywnych powierzchni o grubości nanometrów (nm) (Rys. 6). Rozwiązania te mogą być instrumentem badawczym i mieć określone zastosowanie w monitoringu bezpieczeństwa w zakresie całej tzw. białej biotechnologii, tj. technologii żywności (w tym rolnictwa) oraz ochrony środowiska.



Rys. 6. MEMS/NEMS (Mikro-Elektro-Mechaniczny-System/ Nano-Elektro-Mechaniczny-System). Rezonatory [1d, 5].

### 3. Funkcjonalne nanomateriały dla nanobiotechnologii

Ogromną rolę w nanotechnologii odegrało użycie techniki „*bottom up*” i zsyntetyzowanie, tzw. sztucznych, inteligentnych materiałów (np. typu polipeptydów, protein, silikonów, czy wielu innych nieorganicznych komponentów, jak metale szlachetne, węgiel i inne), metodą „atom-po-atomie” lub „cząsteczka-po-cząsteczce”, tworzących warstwę w postaci nano-filmu (powłoki o grubości nm), perfekcyjnie integrującego się z biologiczną komórką, lub jej wewnętrznymi organami oraz z niektórymi genetycznymi strukturami [5].

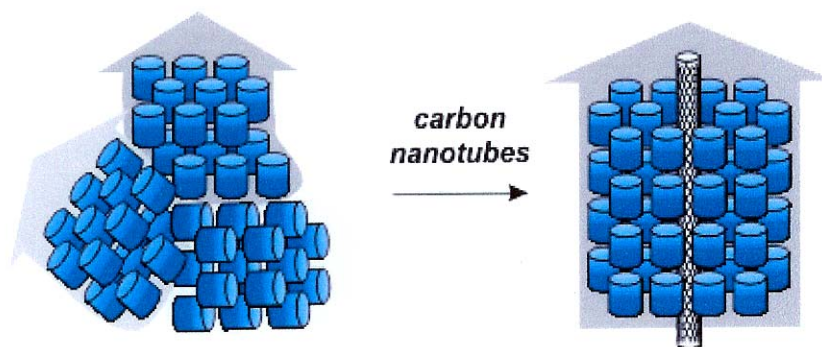
Jednym ze sposobów otrzymywania „inteligentnych” materiałów jest tzw. samoporzadkowanie (*self-assembly*), kiedy atomy, bądź cząsteczki organizują się w struktury zgodnie z ich naturalnymi właściwościami, np. w przypadku tworzenia kryształów dla półprzewodników. Inna metodą jest użycie odpowiednich technik, celem usunięcia ze struktury materiału, pojedynczo, w sposób kontrolowany, atomów lub cząsteczek (*positional assembly*) [5].

Przewiduje się, że w najbliższych latach produkcja nanomateriałów obejmie otrzymywanie:



- związków silikonowych, przeznaczanych do budowy podzespołów elektronicznych, baterii, mikromaszyn w sensorach,
- bądź struktur węglowych (włókien, *carbon nanotubes*), o średnicy od kilku nm i długości kilku cm, powstałych po wielowarstwowym zrolowaniu cienkich powłok węglowych,
- kryształów magnetycznych w postaci nanoziaren,
- nanomembran do efektywniejszego oczyszczania wody.

W produkcji bioreceptorów dla chemicznych i biochemicznych sensorów ważną rolę odgrywają precyzyjnie napyłane/immobilizowane metale, sproszkowany diament lub węgiel (grafit) w postaci cienkiego „filmu”, immobilizowane półprzewodnikowe włókna/cylindry węglowe (*carbon tubes*) [4], które pracują jako element pomiarów elektrochemicznych (przy oznaczaniu metali ciężkich, czy substancji organicznych) (rys. 7) [9].

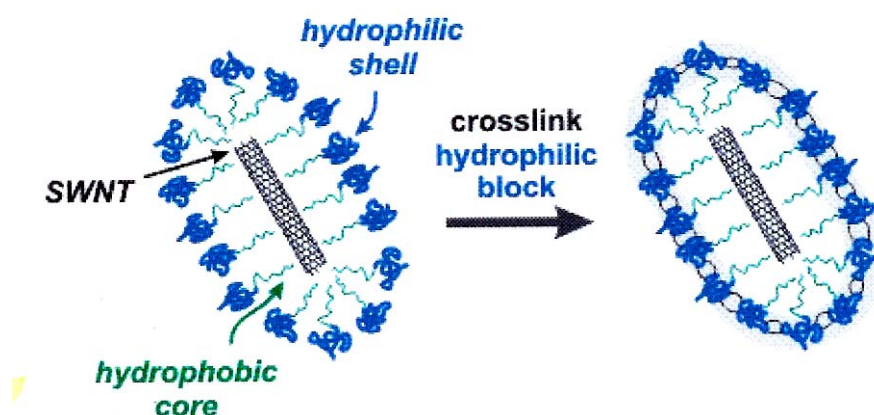


Rys. 7. Schemat orientacji przestrzennej nanomateriału składającego się z węglowych nanowłókien (nanocylindrów) [4, 5, 8, 9].

Ponadto, metalowe i półprzewodnikowe nano-cząsteczki są obecnie użyte jako markery (w postaci *tag*) do organelli komórkowych lub całych komórek oraz jako markery w diagnostyce DNA, jak również podczas identyfikacji przepływu dozowanych leków w strukturze organizmu (tzw. *drug delivery*). Podczas znakowania pewnymi metalami materiału biologicznego, wykorzystano, np. właściwości fluorescencyjne tych metali (złoto), o różnych, nawet nano stężeniach, co czyni, że pomiary są prostsze i bardziej selektywne.

W wyniku prac z dziedziny inżynierii tkankowej stworzono bioaktywne powierzchnie (homologiczne do autentycznych, naturalnych struktur), wykorzystywane do konstrukcji biosensorów, z możliwością do tzw. samoporzędkowania (*self-organisation, self-assambly*) lub hybrydizacji struktur bioreceptora w biosensorze z poszukiwanym materiałem próbki [5].

W pracy nad syntezą nanomateriałów dla biosensorów istotnym był fakt opracowania metody stabilizacji i zwiększenia przyczepności analizowanych biologicznych cząsteczek (analitów), nadając nanostrukturze bioreceptora, np. postać powłoki koloidalnej, w której dzięki usieciowanym, hydrofilnym polimerom mogły być skutecznie upakowane bioreceptory, składające się z nanostruktur, jak np. włókien węglowych, metali szlachetnych, półprzewodników i magnetycznych nanocząsteczek (Rys. 8) [9].



Rys. 8. Schemat stabilizacji nanostruktur (np. włókien/cylindrów węglowych) przez usieciowane, hydrofilne bloki powłok kopolimerowych (SWNT – *Single-Walled carbon Nanotubes*) [4, 8, 9].

Powyższe badania są wybitnie interdyscyplinarne, wymagające np. udziału specjalistów z zakresu syntezy chemii organicznej i polimerów.

Do ochrony przed zakłóceniami sygnałów, odbieranych przez transducer, stosuje się kompozycje dielektryków. Tego samego typu materiały służą do kapsułkowania różnych substancji, które są następnie transportowane do wnętrza komórek. Innego rodzaju materiały wykorzystywane są do tworzenia transducerów piezoelektrycznych, półprzewodnikowych, czy optycznych. Generalnie nanomateriały produkowane są w trzech wersjach, tj.:

- pod postacią jednowymiarowych układów, np. warstwy powlekające o grubości nm,



- pod postacią dwuwymiarowych układów, np. nanowłókna, nanocylindry,
- trójwymiarowych struktur, jakimi są nanocząsteczki.

Praca nad nanomateriałami i ich użyciem niesie jednak w przypadku braku zachowania ostrożności (i regulacji prawnych) pewne ryzyko zagrożenia zdrowia ludzkiego [6, 7]. Szczególnie odnosi się to do nanocząsteczek, które wdychane w sposób niekontrolowany przez człowieka, dzięki szybkiej penetracji, mogą powodować toksykację organizmu. Wynika to z faktu kumulacji i dużej chemicznej reaktywności nanocząsteczek o większej powierzchni w stosunku do mikrocząsteczek.

Stąd dąży się do opracowywania nanomateriałów o niskiej rozpuszczalności i o małej reaktywności powierzchniowej. Poza tym zaleca się, by:

- proces fabrykacji składników w formie nanocząsteczek, jak również posługiwanie się związkami chemicznymi, wchodzącymi w skład nanocząsteczek powinien przebiegać pod ścisłą kontrolą, w całkowicie bezpiecznych dla zdrowia warunkach,
- produkty zawierające nanocząsteczki muszą być oznakowane w celach informacyjnych dla konsumenta.

#### **4. Systemy mikrofluidyzacji dla nanobiotechnologii**

Istnieje wiele dowodów na to, że zintegrowane systemy mikrofluidyzacyjne dla nanobiotechnologii spełniają bardzo praktyczną rolę. Umożliwiają bowiem skonstruowanie „nanbiobotów” (nano/mikrofluidyzacyjnych chipów), działających w stosunku do konwencjonalnych metod analitycznych szybciej, precyzyjniej i sprawniej, jak również w sposób bardziej czuły oraz w tzw. *real-time* i w odniesieniu do minimalnej ilości próbek, rzędu nanolitra, a nawet pikolitra [1a, 1e, 5].

Istnieje w tym przypadku tzw. sprzężenie zwrotne pomiędzy osiągnięciami techniki mikrofluidyzacji a genomiką, czy proteomiką. W przyszłości będzie to podstawą wielu konstrukcji bioNEMS (bio-nano elektromechanicznych systemów).

Tak daleko posunięta miniaturyzacja sprawia, że procesy badania próbek biologicznych można całkowicie zautomatyzować.

## LITERATURA

- [1] *Advantage Magazine February, 2004:*
- a. Quick, inexpensive method to prototype microchips.  
[www.azonano.com/details.asp?ArticleID=424](http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=424)
  - b. Nanotechnology to play important and prominent role in food safety.  
[www.azonano.com/details.asp?ArticleID=858](http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=858)
  - c. Lab-on-a-chip and the impact of nanotechnology.  
[www.azonano.com/details.asp?ArticleID=866](http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=866)
  - d. Biotechnology systems incorporating nanotechnology.  
[www.azonano.com/details.asp?ArticleID=959](http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=959)
  - e. Biochip and the use of Nanotechnology in imaging.  
[www.azonano.com/details.asp?ArticleID=969](http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=969)
- [2] Freitas Jr. R. A.: The future of nanofabrication and molecular scale devices in nanomedicine. *Studies in Health Technology and Informatics*, **80**, (2002), 45-59.
- [3] Goodsell D.S.: Bionanotechnology: Lessons from Nature. *Wiley-Liss*, (2004).
- [4] Kang Y., Taton T.A.: Micelle-encapsulated carbon nanotubes: A general Route to nanotube composites. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, (2003), 5650-5651.
- [5] Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives. *Edited by Niemayer C.M., Mirkin C.A., Wiley-VCH*, (2004).
- [6] Report: Down on the Farm. The impact of nano-scale technologies on food and agriculture. *ETC Group*, November 2004, [www.etcgroup.org](http://www.etcgroup.org)
- [7] Report: Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties. *The Royal Society & The Royal Academy of Engineering*, (July 2004),
- [8] Taton T.A.: Bio-Nanotechnology: Two-Way traffic. *Nature Mater.*, **2**, (2003), 73-74.
- [9] Taton Group, University of Minnesota, Dept. Of Chemistry: Nanobiotechnology: Hybrid materials from nanoscale objects and biomolecules (Research Projects), (2005),  
[www.chem.umn.edu/groups/taton/researchcontent.htm](http://www.chem.umn.edu/groups/taton/researchcontent.htm)

## NANOBIOTECHNOLOGY – APPLICATION IN FOOD TECHNOLOGY

### Abstract

Nanotechnology is engineering and manufacturing at the molecular or nanometer length scale. The application of nanotechnology to biotechnology is called nanobiotechnology, which may be realized in many ways and it is going to have broad, sweeping applications that have the potential to significantly improve the quality and safety of food. It will be the first step and will play a prominent role. Nanotechnology is expected to revolutionize biotechnology.

The more exciting applications of nanobiotechnology is the development of nanobiosensors (with nanofluidic chips) that can be placed in food production and food distribution facilities – and, longer term, in the packaging itself – to detect rapidly and sensitively the presence of everything from biological cells, GMO and foreign protein, microorganisms. Also, a new generation of “intelligent” nanomaterials and “smart” products, can selectively attach themselves, i.e. to any number of food pathogens.

On the one side, further breakthroughs in crop DNA decoding and analysis enable the industries to predict, control and improve the agricultural production. On the other side, with nanobiotechnology of manipulating the molecules and the atoms of food, the future food industry has a powerful method to design food with much more capability and precision, lower costs and sustainability. Functional food will benefit firstly from the new technologies, followed by standard food, nutraceuticals and others. The future belongs to new products and processes with the goal to customize the products.

The speed and simplicity of nanotechnology methods gives researchers the flexibility to experiment with the conception and construction of nano-chips, i.e. DNA-chips, protein-chips or *lab-on-a-chip*, nanobots that can test any number of ideas.

All developed nanomachines and nanobots can be used to analysis of food, i.e. for yeasts and bacteria with industrial character, for identification of their genome, proteome and metabolome. These practical aspects of nanobiotechnology have a big application in food processing and food safety in near future.