

طراحی حسگر زیستی بر پایه نانوذره طلا و DNA به منظور تشخیص اکریل آمید در همبرگر

مریم اثنی عشری^{۱*}، رضا فرهمندفر^۲

^{۱*} استادیار بخش تحقیقات فراوری تولیدات دامی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

^۲ استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

تاریخ ارسال: ۱۴۰۲/۰۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۳

چکیده

اکریل آمید ماده ای سرطان زا و خطرناک است که حین فراوری مواد غذایی در دمای بالا طی واکنش مایلارد تولید می شود. روش های اندازه گیری کمی و کیفی اکریل آمید در مواد غذایی اغلب نیازمند نیروی متخصص و هزینه زیادی است، از این رو سعی شده است روشی نوین برای آنالیز اکریل آمید در همبرگر ابداع شود. در این مقاله، حسگر زیستی بر پایه نانوذرات طلا و DNA دو رشته FAM دار (FAM-dsDNA) برای تشخیص اکریل آمید طراحی شد. در حضور اکریل آمید، ssDNA با اکریل آمید پیوند می دهد و سبب ایجاد کمپلکس ssDNA- اکریل آمید می شود و رشته مکمل FAM دار آزاد (FAM-csDNA) بر سطح نانوذرات طلا جذب و خاموش می گردد. آنالیز نانوذره طلا سنتز شده با SEM و DLS نشان داد که نانوذرات طلا به خوبی توزیع شده اند و قطر متوسط آن ها ۱۳ تا ۱۷ نانومتر است. در شرایط بهینه (اتصال DNA و اکریل آمید پس از ۸۰ دقیقه، بیشترین میزان هیبریدیزاسیون بین ssDNA و FAM-csDNA پس از ۲۰ دقیقه، بیشترین میزان هم یوگی (کانجوگیشن) FAM-csDNA و ۱۵ نانومولار نانوذره طلا)، این روش آنالیتیکی فلونوروسانسی، حساسیت بالایی را نسبت به اکریل آمید در همبرگر از خود نشان داد و دارای پاسخ خطی بی نظیر (۰/۱ تا 10^{-8} مولار) و حد تشخیص کم ($10^{-9} \times 3/34$ مولار) بود. از این رو می توان گفت که حسگر زیستی طراحی شده، در مقایسه با روش رایج، نه تنها به نیروی کار متخصص و صرف وقت و هزینه زیاد نیاز ندارد، بلکه جایگزین خوبی است برای روش های کروماتوگرافی در تشخیص اکریل آمید در محصولات غذایی.

واژه های کلیدی: اکریل آمید، حسگر زیستی، حد تشخیص، همبرگر، فلونوروسانس

مقدمه

پلی اکریل آمید کاربرد گسترده ای دارد. در محصولات غذایی، این ترکیب به سبب واکنش قندهای احیاکننده و اسید آمینه آسپارژین در دمای بالا به دست می آید (Krishnakumar & Visvanathan, 2014). اکریل آمید در بدن تجزیه می شود و گلاسید آمید تولید می کند که منجر به موتاسیون و بروز سرطان در مصرف کننده می گردد. به دلیل وزن مولکولی پایین اکریل آمید، این ماده به سرعت در خون جریان می یابد و با هموگلوبین خون واکنش می دهد و در کبد، تیموس، مغز

یکی از ترکیبات مخاطره آمیز که طی فراوری مواد غذایی حاصل می شود، اکریل آمید است که اولین بار توسط پژوهشگران دانشگاه استکهلم و انجمن غذایی سوئد، در محصولات غذایی سرخ شده در دمای بالا مشاهده شد (Bethke & Bussan, 2013). اکریل آمید در صنایع شیمیایی و نساجی، صنایع تولید کننده رنگ، کاغذ، چسب، مواد پلاستیکی و صنایع آرایشی و بهداشتی به صورت

قندی صورت می‌گیرد. در حالی که تشکیل اکریل‌آمید از کارنوسین در گوشت قرمز نیازی به مواد قندی ندارد. براساس تحقیقات، میزان اکریل‌آمید در گوشت قرمز سرخ شده ۱۰۰ تا ۲۰۰ مرتبه کمتر از مقدار آن در سیب زمینی سرخ شده است، زیرا اکریل‌آمید با کارنتین ماهیچه واکنش می‌دهد و به N-متیل اکریل‌آمید تبدیل می‌شود (Yaylayan *et al.*, 2004). فراورده‌های گوشتی از نظر مصرف راحت‌اند و معمولاً بدون نیاز به پخت، که در مورد گوشت کارآسانی نیست، مصرف می‌گردند و مقدار لازم مواد پروتئینی را که حاوی اسیدهای آمینه ضروری و لازم‌اند در اختیار مصرف‌کنندگان با سلیقه‌های مختلف قرار می‌دهند. از آنجا که روز به روز بر مصرف فراورده‌های گوشتی افزوده می‌شود لازم است برای تأمین بهداشت، کیفیت و کمیت مطلوب این فراورده‌ها، کنترل کمی و کیفی این صنایع به طور جدی‌تر و با دامنه‌ی بیشتری دنبال شود.

یکی از فراورده‌های گوشتی متداول دنیای امروز همبرگر است که از مخلوطی ناهمگن از گوشت، سبزی‌هایی مانند پیاز و سیر، ادویه، نمک و بعضاً روغن، سویا و آرد سوخاری تشکیل شده است. آرد سوخاری که گاهی در تهیه همبرگر استفاده می‌شود می‌تواند در تشدید تولید اکریل‌آمید نقش بسزایی داشته باشد (Ghasemian *et al.*, 2014). سعیدیان و همکاران (Saeedian *et al.*, 2019) با بررسی اثر نوع و درصد گوشت (سه سطح ۳۰، ۶۰ و ۹۰ درصد) و پودر شیرخشک بر ویژگی‌های شیمیایی و میزان اکریل‌آمید در برگرهای گوساله و مرغ کباب شده (حاوی ۶۰ درصد گوشت) نتیجه گرفتند که میزان اکریل‌آمید در برگرهای مرغ به طور معنی‌داری کمتر از برگرهای گوساله است. بیشترین و کمترین میزان اکریل‌آمید تشکیل‌شده به ترتیب در برگر گوشت ۶۰ درصد (۶۶/۰۳ میکروگرم بر کیلوگرم) و برگر مرغ ۹۰ درصد (۲۶/۵۴ میکروگرم بر کیلوگرم) دیده شد. افزایش درصد گوشت گوساله و مرغ از ۳۰ به ۶۰ درصد سبب افزایش اکریل‌آمید و افزایش درصد گوشت از ۶۰ به ۹۰ درصد سبب

و قلب تجمع می‌یابد. اکریل‌آمید سبب ایجاد جهش نقطه‌ای می‌شود و اثر آن بر سیستم عصبی در مقادیر بالای ۰/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن در هر روز گزارش شده است. این ترکیب با تضعیف سیستم ایمنی بدن، ابتلا به بیماری‌های عفونی و سرطان را افزایش می‌دهد و عوارض سمی آن باعث اختلال در هوشیاری، ضعف، تحریک پذیری و تغییرات رفتاری می‌شود. تحریک و قرمزی پوست، عفونت چشمی و اختلالات باروری و سقط، از دیگر عوارض اکریل‌آمید در مواد غذایی است (Mojska *et al.*, 2016). مطالعات اولیه انجمن صنایع غذایی سوئد روی بیش از ۱۰۰ نوع ماده غذایی بیانگر آن است که حرارت‌دهی مواد غذایی مختلف مثل محصولات فراوری شده سیب زمینی، نان، برنج، ماهی، گوشت قرمز، بیسکویت، سوسیس، کالباس، همبرگر، قهوه، غلات صبحانه، و غذاهای آماده طبخ مثل پیتزا باعث تولید اکریل‌آمید می‌شود. مطالعات روی مواد غذایی گوناگون از جمله چیپس سیب زمینی، سیب زمینی سرخ شده و نان نشان داده است که میزان اکریل‌آمید از ۱۰ تا بیش از ۲۰۰۰ پی‌پی‌بی متغیر است. اما مقدار آن بسته به شرایط حرارت‌دهی، ماهیت ماده غذایی و افزودنی‌های مختلف مانند اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و دیگر ترکیبات متغیر است (Garabagiu & Mihailescu, 2011). کلایز و همکاران (Claeys *et al.*, 2005) با بررسی تاثیر نوع اسید آمینه بر تولید اکریل‌آمید و سینتیک کاهش میزان آن با مدل اسپارژین-گلکز (۰/۱ مولار، پی‌اچ ۶) در محدوده دمایی ۱۴۰ تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد نشان دادند که افزودن سیستئین یا لیزین به مدل، تولید اکریل‌آمید را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد در حالی که افزودن گلوتامین سبب افزایش تولید آن می‌شود و آلانین تقریباً اثری بر تولید اکریل‌آمید ندارد.

در مقایسه با سیب زمینی، زمان تشکیل اکریل‌آمید در گوشت قرمز در دمای بالا بسیار سریع‌تر است. تبدیل اسید آمینه اسپارژین به اکریل‌آمید در سیب زمینی در حضور مواد

که توام با اکریل آمید تولید می‌شوند، اندازه‌گیری آن را بیش از پیش دشوار می‌سازد. اخیراً از حسگرهای زیستی برای تشخیص میزان اکریل آمید استفاده می‌شود. حسگرهای زیستی اپتیکیال ارزان هستند و به راحتی تولید و استفاده می‌شوند (Oracz *et al.*, 2011). مطالعات متعددی بر طراحی سنسور برای تشخیص سریع اکریل آمید انجام شده است. خوشبین و همکاران (Khoshbin *et al.*, 2023) آپتاسنسور ساده در میکروپیپت طراحی کردند. این سنسور، به پایه تشکیل سوئیچ مولکولی مارپیچ سه گانه^۲ رشته‌های DNA و نانوذره طلا بود. این آپتاسنسور به سادگی می‌تواند با تصویربرداری با گوشی هوشمند، میزان اکریل آمید را در محدوده غلظت ۰/۰۵ تا ۲۰۰ نانومول بر لیتر تعیین کند و حتی در غلظت‌های کمتر تا ۰/۰۳۸ نانومول بر لیتر نیز گرینش‌پذیری قابل توجهی دارد. این آپتاسنسور در نمونه‌های چپیس، قهوه و نان با بازیابی از ۹۲ تا ۱۰۲ درصد توانست به خوبی عمل کند. هو و همکاران (Hu *et al.*, 2013) با مبنای روش فلئوروسانس بر پایه کوانتوم دات^۳ CdSe/ZnS موفق به تشخیص سریع اکریل آمید در مواد غذایی شدند. در این روش، ابتدا کوانتوم دات به N-اکریل اکسی سوکسینیمید^۴ متصل می‌شود و با محلول اکریل آمید مخلوط و در حضور آغازگر نوری^۵ تحت تابش UV پلیمریزه می‌شود. افزایش غلظت اکریل آمید موجب افزایش واکنش بین کوانتوم دات و افزایش شدت فلئوروسانس شد. این سنسور با ناحیه خطی^۷ 5×10^{-7} تا 1×10^{-2} مول بر لیتر و حد تشخیص^۷ 5×10^{-7} مول بر لیتر حساسیت و گرینش‌پذیری بالایی در مقایسه با روش LC-MS/MS دارد. این پژوهشگران از این سنسور برای تشخیص مقدار اکریل آمید در چپیس سیب زمینی استفاده کردند. نتایج تحقیق نشان داد که محدوده خطی سنسور از ۳/۵ تا $3/5 \times 10^{-5}$ گرم بر لیتر و حد تشخیص^۵ $3/5 \times 10^{-5}$ گرم بر لیتر دارد. این روش

کاهش میزان اکریل آمید شد. میزان قند کل برگرهای حاوی گوشت مرغ به طور معنی‌داری بالاتر از میزان قند کل برگرهای حاوی گوشت گوساله و میزان پروتئین آن‌ها پایین‌تر بود. نتایج تحقیق حاکی از این بود که افزایش جایگزینی پودر شیر خشک منجر به افزایش میزان اکریل آمید تشکیل‌شده در نمونه‌های برگر می‌شود. بیشترین و کمترین میزان اکریل آمید در مرحله دوم به ترتیب مربوط بود به برگر گوشت گوساله حاوی ۱۶ درصد پودر شیر خشک (۶۹/۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم) و برگر مرغ حاوی ۸ درصد پودر شیر خشک (۴۰/۳۵ میکروگرم بر کیلوگرم). به نظر می‌رسد که کمترین مقدار اکریل آمید در برگرهای ۹۰ درصد مرغ و بدون شیر خشک تشکیل شود. قاسمیان و همکاران (Ghasemian *et al.*, 2014) شرایط مختلف تهیه برگر را در میزان تولید اکریل آمید بررسی کردند. بدین منظور برگر را در سه دمای مختلف (۱۷۰، ۱۹۰ و ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان سرخ شدن (۵، ۶ و ۷ دقیقه) میزان گوشت (۳۰، ۶۰ و ۸۵ درصد) و سه نوع روغن (روغن ذرت، کانولا و آفتابگردان) تهیه کردند و نشان دادند که دما و میزان گوشت بر میزان تولید اکریل آمید تاثیر بسزایی دارد. در حالی که نوع روغن تاثیر معنی داری بر میزان تولید اکریل آمید نشان نداد.

اکریل آمید به روش‌های مختلفی استخراج می‌شود که از آن جمله می‌توان به استخراج با دستگاه سوسکله، استخراج مایع-مایع و استخراج فاز جامد^۱ اشاره کرد. این روش‌ها با مشکلاتی چون مدت طولانی استخراج، نیاز به حجم زیاد حلال و هزینه زیاد همراه است. کروماتوگرافی گازی، روشی دیگر برای اندازه‌گیری اکریل آمید در مواد غذایی است که با بروم کردن یا بدون آن، همچون روش LC و HPLC-MS استفاده می‌شود (Elbashir *et al.*, 2014). اما این روش‌ها اغلب گران و دشوار هستند و با توجه به پیچیدگی‌های ماتریکس‌های غذایی و محصولات واسطه‌ای

^۴ N-acryloxysuccinimide (NAS)

^۵ Photo-initiator

^۱ Solid phase Extraction (SPE)

^۲ Triple-helix molecular switch (THMS)

^۳ Quantum dots

مواد و روش‌ها**مواد لازم برای طراحی حسگر زیستی**

DNA تک رشته‌ای (ssDNA) با توالی ACG-5' GCA ACA TGC CGA AGG AAC TAC CGG AAA 3'- نشان‌دار شده با FAM (FAM-csDNA) با توالی CGA GGA-5' TTT GCC GTT TCC GGT AGT TCC TTC GGC 3'- از شرکت بایونیر، کره جنوبی خریداری شد. اکریل‌آمید با خلوص ۹۹ درصد و همه حلال‌ها و مواد شیمیایی با درجه آنالیتیکال خریداری شد. همه محلول‌های آبی با آب دیونیزه با هدایت الکتریکی ۱۸ MΩ (شرکت میلی پور، امریکا) تهیه شد.

روش‌های مورد آنالیز در طراحی حسگر زیستی بر پایه dsDNA و نانوذره طلا

اندازه گیری فلئوروسانس در پلیت سیاه ۹۶ خانه‌ای توسط دستگاه میکروپلیت ریدر Synergy H4 microplate (BioTeK, USA) reader بررسی گردید. تمام آزمون‌ها در سه تکرار دنبال شد. برای بررسی مورفولوژی، سایز و پتانسیل زتتا^۶ نانو ذرات طلا از میکروسکوپ الکترونی روبشی^۷ (SEM) مدل TESCAN MIRA3 ساخت جمهوری چک و تفرق دینامیکی نور^۸ (DLS) مدل مالورن^۹ ساخت کشور انگلستان استفاده شد.

سنتز نانوذره طلا

نانو ذره طلا براساس روش کاهش سیتراتی کلروآریک اسید HAuCl₄ تهیه شد. این روش را استارف و همکاران (Storhoff *et al.*, 1998) مطرح کردند. پس از تهیه نانو ذره طلا، محلول حاصل با شتاب ثقل ۱۵۰۰۰ جی در مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. فاز رویی آن حذف و نانوذره طلا مجددا در آب خالص حل شد. غلظت نانوذره طلا حاصل براساس Extinction coefficient تعیین شد

با LC-MS/MS قابل مقایسه نیست اما قیمت کمتر و سرعت بیشتر این روش، در مقایسه با روش کروماتوگرافی مایع، امکان استفاده از این سنسور را در آنالیزکردن آنلاین اکریل‌آمید محقق می‌کند. هوانگ و همکاران (Huang *et al.*, 2016) نیز به طراحی سنسوری با الکتروود طلا بر مبنای DNA تک رشته‌ای به منظور تشخیص اکریل‌آمید پرداختند و نشان دادند که تحت شرایط بهینه، این الکتروود در محدوده ۴-۲۰۰/ میکرومولار رفتار خطی دارد و پایین‌ترین حد تشخیص آن ۸/۱ نانومولار است. این سنسور، از تجدیدپذیری خوب و پایداری بالایی برخوردار است و در آب آشامیدنی و چپس سیب زمینی با موفقیت مقدار اکریل‌آمید را نشان می‌دهد

در طراحی حسگر زیستی می‌توان از یک عنصر زیستی مانند DNA استفاده کرد که گزینش پذیری بالایی برای تشخیص اکریل‌آمید دارد. مولکول اکریل‌آمید توانایی اتصال به باز گوانین در ساختار DNA را دارد که برهمکنش آنالیت و DNA می‌تواند منجر به تغییر در خواص نوری مانند شدت یا فرکانس جذب و نشر، فرکانس رزونانس الکترون‌های سطحی، زاویه شکست و ... گردد. در حقیقت، فلئوروسانس یکی از انواع فوتولومینسانس است که در آن اتم‌ها یا مولکول‌ها امواج الکترومغناطیس (یا همان انرژی فوتون‌ها) را جذب می‌کنند، برانگیخته می‌شوند و در بازگشت به حالت پایه نیز انرژی اضافی خود را در قالب فوتون از دست می‌دهند (Liu *et al.*, 2014). در حقیقت، موفقیت حسگرهای زیستی تا حد زیادی تابع چگونگی طراحی و تثبیت DNA به اکریل‌آمید است. در این مقاله، سعی بر طراحی و بهینه سازی حسگر زیستی بر پایه الیگونوکلوئوتیدها و نانوذرات طلا داریم. پس از طراحی سیستم بهینه، میزان اکریل‌آمید در عصاره آبی حاصل از همبرگر تعیین می‌شود.

^۸ Dynamic light scattering (DLS)^۹ Malvern^۶ Zeta potential^۷ Scanning electron microscope (SEM)

مخصوص بود؛ آنالیز ترکیبات شیمیایی آن به شرح جدول ۱ است. نمونه ها در دستگاه کباب پز سرخ گردید. روغن مورد استفاده در این آزمایش، روغن سرخ کردنی (شامل روغن آفتابگردان تصفیه شده، روغن کانولا تصفیه شده، روغن ذرت، آنتی اکسیدان TBHQ حداکثر ۰/۰۰۷۵ درصد و اسید سیتریک حداکثر ۰/۰۱ درصد) پس از طی زمان سرخ شدن (۵ دقیقه) در دمای ۱۷۰ درجه سانتی گراد، همبرگرها در دمای محیط روی سینی مشبک حدود ۳۰ دقیقه قرار گرفتند تا سرد شوند و سپس با آسیاب پودر شدند. پودرها تا قبل از آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Ghasemian et al., 2014).

استخراج اکریل آمید از همبرگر

همبرگر سرخ شده (۴۰ گرم) پس از خرد کردن با ۴۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه به حالت سکون نگاه داشته شد. نمونه به مدت یک ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در شیکر به هم زده شد و پس از سانتریفوژ شدن به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ اربی ام، محلول رویی حاصل از سانتریفوژ با هگزان چربی زدایی گردید. محلول آبی حاصل از فیلتراسیون به کمک ۱۰ میلی لیتر از محلول کارز یک و دو تخلیص شد. مجدداً محلول رویی حاصل از فیلتر با بافر PBS تا رسیدن به غلظت نهایی ۰/۱ مولار در پی اچ ۸ رقیق شد (Krajewska et al., 2008).

به طوری که $10^8 \times 2/7$ بر مولار سانتی متر مربع در طول موج ۵۲۰ نانومتر برابر با ۱۵ نانومولار از نانو ذره طلا بود.

تعیین زمان بهینه برای اتصال اکریل آمید و ssDNA

حجم مشخصی از DNA تک رشته ای (۳/۱۲ میکرومولار) و اکریل آمید (۰/۰۱ مولار) با یکدیگر ترکیب و به مدت صفر تا ۱۰۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. مکمل نشان دار شده با FAM (۳/۱۲ میکرومولار) به آن افزوده گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. نانوذره طلا (۱۵ نانومولار) به محلول حاصل افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. طیف فلوروسانس آن در طول موج تهییج ۴۹۰ نانومتر اندازه گیری شد (Huang et al., 2016).

تاثیر غلظت و زمان انکوباسیون نانوذره طلا بر عملکرد حسگر زیستی

سطوح غلظت نانوذره طلا (صفر تا ۲۰ نانومولار) به مقدار مشخص FAM-csDNA (۳/۱۲ میکرومولار) افزوده و به مدت صفر تا ۵۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. طیف فلوروسانس آن به کمک میکروپلیت ریدر ثبت شد (Huang et al., 2016).

آماده سازی نمونه های همبرگر

همبرگر از برند صنعتی تهیه شد که حاوی گوشت، پودر سویا، پودر سوخاری، پیاز، نمک، روغن نباتی و ادویه

جدول ۱- آنالیز ترکیبات شیمیایی همبرگر خام

Table 1- Chemical composition analysis of raw hamburger

همبرگر	چربی (درصد)	پروتئین (درصد)	خاکستر (درصد)	رطوبت (درصد)	pH
hamburger	Fat (%)	Protein (%)	Ash (%)	Moisture (%)	pH
	12.42 ± 0.2	14.7 ± 0.9	0.9 ± 0.05	61.86 ± 1.49	5.87

حساسیت حسگر زیستی

طوری که توالی DNA در معرض اکریل آمید در دمای محیط انکوبه شد و سپس رشته مکمل DNA نشاندار شده با FAM به نمونه اضافه شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون، نانوذره طلا به نمونه اضافه شد. در صورت اتصال DNA و اکریل آمید انتظار می‌رود، DNA نشاندار شده با FAM نتواند به رشته مکمل خود اتصال برقرار کند. از این رو، با نانو ذره طلا وارد واکنش خواهد شد و خواص فلئوروسانس آن دستخوش تغییر می‌شود. پس از تایید عمل حسگر، بهینه سازی حسگر نوری براساس نانو ذره طلا و توالی‌های مکمل DNA که یکی با FAM نشاندار شده، انجام شد و پس از طراحی سیستم بهینه، میزان اکریل آمید در عصاره آبی حاصل از همبرگر به کمک حسگر مورد نظر تعیین گردید.

حساسیت حسگر حاصل در حضور ۰/۰۱ مولار گلوکز، آسپاراژین، آسپارتیک، گلوتامیک، لیزین و لوسین بررسی شد. شدت فلئوروسانس در محلول‌های حاصل در طول موج تهییج ۴۹۰ نانومتر و طول موج نشر ۵۶۰-۵۱۰ نانومتر با حسگر طراحی شده بررسی گردید (Emrani *et al.*, 2016).

تعیین کمی اکریل آمید در حسگر زیستی براساس روش کونچینگ

سطوح مختلفی از اکریل آمید (صفر تا 10^{-10} مولار) به ssDNA (۳/۱۲ میکرومولار) افزوده و پس از گذشت ۸۰ دقیقه FAM-csDNA (۳/۱۲ میکرومولار) به محلول اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد پس از آن، ۱۵ نانو مولار نانو ذره طلا به محلول حاصل افزوده شد (حجم نهایی ۱۳۵ میکرولیتر). شدت فلئوروسانس در طول موج تهییج ۴۹۰ نانومتر و طول موج نشر ۵۶۰-۵۱۰ نانومتر ثبت شد (Emrani *et al.*, 2016).

اثبات کارایی و عملکرد حسگر زیستی برپایه dsDNA و نانوذره طلا

اثبات کارایی و عملکرد حسگر حاصل که براساس نانوذره طلا و دو رشته مکمل DNA که با FAM نشاندار شده بود، به کمک جذب فلئوروسانس در دستگاه Microplate Reader به‌انجام رسید. نتایج حاصل از فلئورومتری نشان داد بعد از افزودن اکریل آمید، شدت فلئوروسانس در حسگر زیستی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که این کاهش را می‌توان به ایجاد کمپلکس اکریل آمید و ssDNA نسبت داد. براساس نظریه تابعی چگالی (DFT)^{۱۰}، اکریل آمید نه تنها به عنوان گیرنده هیدروژنی خوب عمل می‌کند بلکه می‌تواند به عنوان دهنده خوب هیدروژن به اتم‌هایی با الکترون‌گاتیویته بالا همچون اکسیژن و نیتروژن ایفای نقش کند. بنابراین، اکریل آمید می‌تواند پیوند هیدروژنی پایداری بین باز پورین و پیریمیدین ssDNA ایجاد کند. در نتیجه، اداکت پایداری بین ssDNA و اکریل آمید حاصل می‌شود. براساس نتایج پژوهش‌های پیشین، اتصال اکریل آمید و باز گوانین به اندازه‌ای قوی است که حتی می‌تواند پیوند هیدروژنی بین باز

تشخیص اکریل آمید در عصاره آبی حاصل از همبرگر پس از استخراج عصاره آبی حاصل از همبرگر، برای اثبات کارایی حسگر در محیط واقعی سطوح غلظت‌های مختلف از اکریل آمید به درون عصاره همبرگر حاصل اضافه شد و مراحل مشابه بالا روی نمونه‌های حاصل اجرا گردید. مقدار اکریل آمید با حسگر طراحی شده تعیین شد (Krajewska *et al.*, 2008).

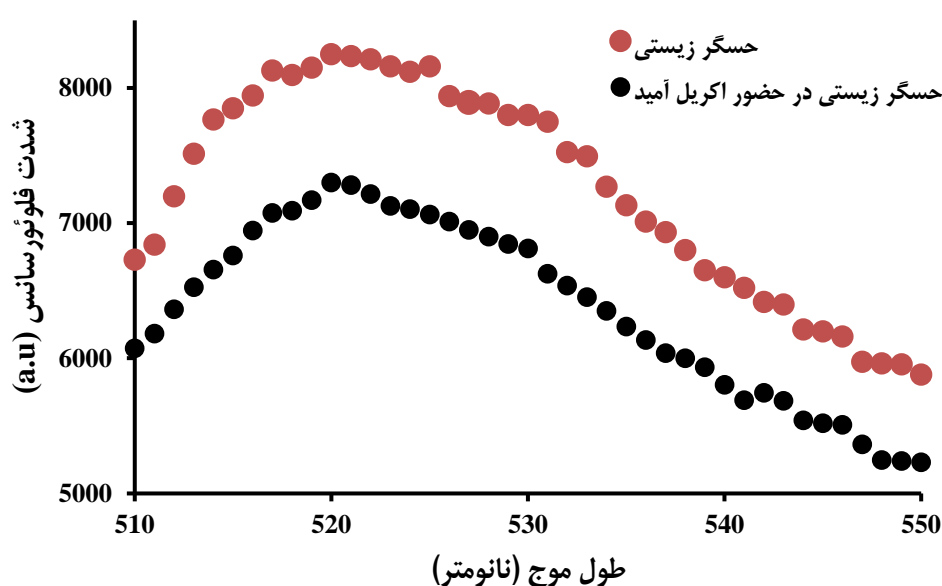
نتایج و بحث

این حسگر زیستی برپایه میل ترکیبی گوانین DNA با مولکول اکریل آمید طراحی شد. این اتصال با ایجاد ممانعت فضایی از اتصال دو رشته مکمل DNA به یکدیگر جلوگیری کرد و پس از افزودن نانو ذره طلا منجر به تغییر در خواص نوری مانند شدت یا فرکانس جذب و نشر و ... گردید. به

¹⁰ Density functional theory (DFT)

گوانین و سیتوزین را نیز بشکنند. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود، بعد از افزودن اکریل آمید، شدت فلورئورسانس در حسگر به طور معنی داری کاهش می یابد که این کاهش را می توان به ایجاد کمپلکس اکریل آمید و ssDNA نسبت داد، همچنین موجب ممانعت از اتصال ssDNA به FAM-csDNA می شود. از این رو پس از افزودن نانوذره طلا، FAM-csDNA باند نشده به سطح نانوذره طلا

با پیوند الکترواستاتیک بین بار منفی نانوذره طلا و بار مثبت csDNA به آن متصل می شود. از آنجایی که نانوذره طلا به عنوان یک کونچر^{۱۱} قوی مطرح است، جذب FAM-csDNA به سطح نانوذره طلا، سپس کونچینگ FAM از طریق انتقال انرژی سطحی^{۱۲} (SET) شد. در حالی که در غیاب اکریل آمید، نشر قوی فلورئورسانس مشاهده شد که نشان از عدم اتصال dsDNA به سطح نانوذره طلا است.



شکل ۱- اثبات پاسخ حسگر زیستی نوری بر پایه DNA و نانوذره طلا در غیاب اکریل آمید (منحنی قرمز) و در حضور اکریل آمید (منحنی مشکی)

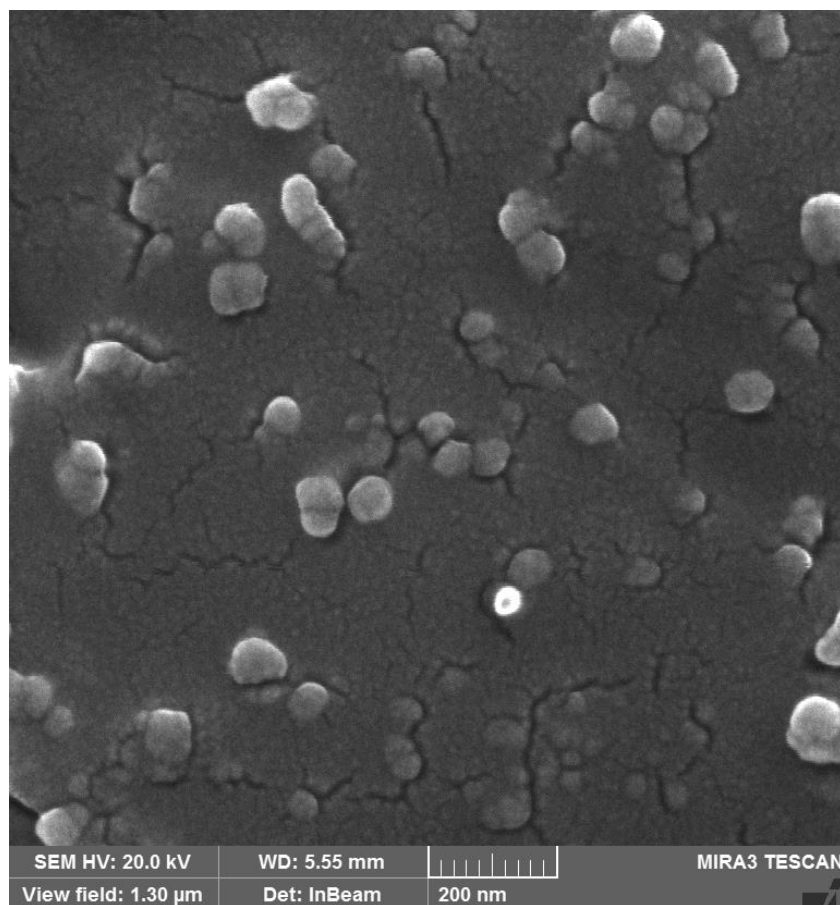
Figure 1- Proof of concept for the presented biosensing platform towards fluorescence spectra of in the absence of acrylamide (red curve) and presence of acrylamide (black curve).

تحقیقات پیشرفته فیزیک، شیمی، بلورشناسی، علم مواد و زیست شناسی شناخته شود. اندازه ذرات و پتانسیل زتا نیز با دستگاه DLS اندازه گیری شد که قطر ذرات $15/11 \pm 1/04$ نانومتر و پتانسیل زتا نانوذرات طلا، $32/05 \pm 1/76$ میلی ولت بود (شکل ۳). این نتایج با نتایج پژوهش های رضانی و همکاران (Ramezani et al., 2015) همخوانی دارد که با همین شیوه به ساخت نانوذره طلا مبادرت ورزیدند.

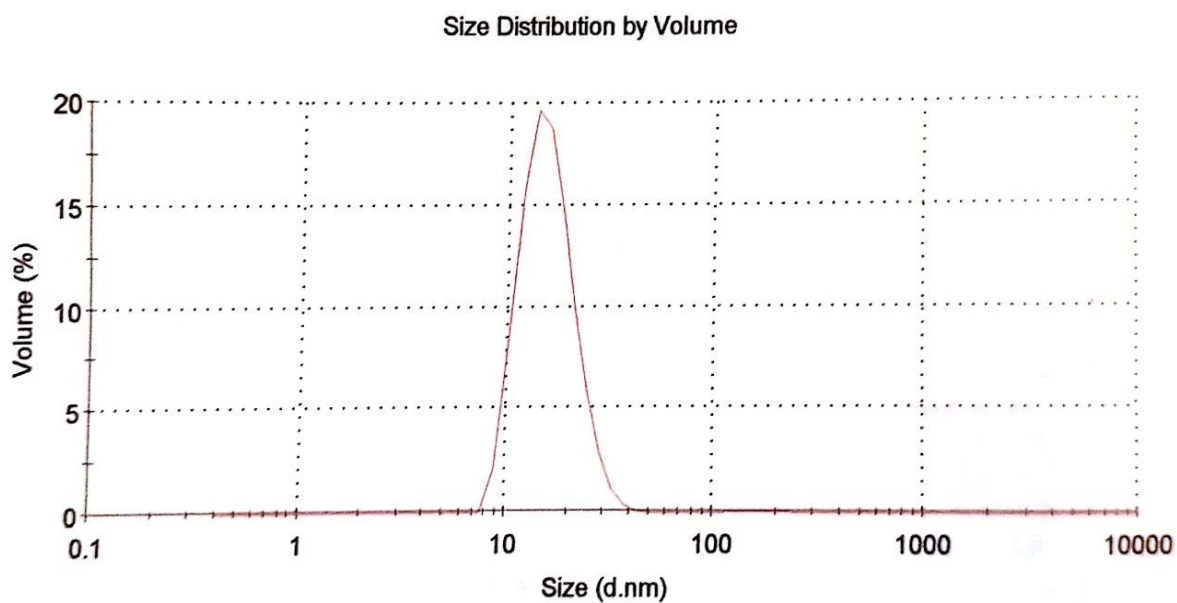
ویژگی های نانوذره طلای سنتز شده
ویژگی های نانوذره طلای سنتز شده با SEM ارزیابی و نشان داده شد که نانوذره طلا به خوبی توزیع شده است (شکل ۲). میکروسکوپ های الکترونی روبشی نیز ابزارهایی ویژه در مشخص کردن ساختار و مورفولوژی مواد محسوب می شوند که مطالعات ریزساختاری مواد با قدرت تفکیک بالا و بزرگنمایی خیلی زیاد را امکان پذیر می سازند. این موارد سبب شده است تا SEM امروزه به ابزاری بسیار مهم در بسیاری از

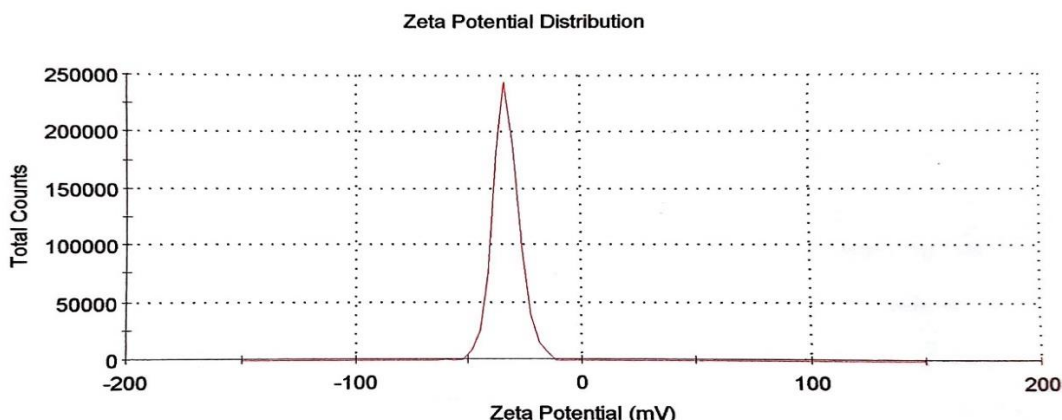
¹¹ Quencher

¹²Surface energy transfer (SET)



شکل ۲- تصویر SEM از نانوذره طلائی سنتز شده
Figure 2- SEM image of gold nanoparticles





شکل ۳- نتایج پتانسیل زتا و اندازه ذرات نانو ذره طلا حاصل از DLS

Figure 3 - The results of zeta potential and particle size of gold nanoparticles obtained from DLS

حال آنکه با افزایش زمان تا ۱۰۰ دقیقه، شدت فلورسانس با شیب ملایمی رو به افزایش می‌گذارد (شکل ۵). لذا، واضح است که اتصال DNA و اکریل آمید پس از ۸۰ دقیقه حاصل می‌شود و زمان بیشتر اثر بازدارندگی بر ایجاد اداکت DNA و اکریل آمید دارد که به تبع آن، کارایی و حساسیت حسگر نیز کاهش می‌یابد. پاتنایاک و همکاران (۲۰۲۳) به تعیین میزان اکریل آمید در اسنک‌ها با استفاده از سنسور انتقال الکترون رزونانس فلورسانس^{۱۳} از کربن کوانتوم دات و نانوذره طلا پرداختند. در این سنسور، شدت فلورسانس نقاط کوانتومی کربنی اصلاح شده با گلوکاتایون^{۱۴} با افزودن نانوذرات طلا از طریق انتقال الکترون رزونانس فلورسانس برای تشکیل کمپلکس خاموش شد. هنگامی که اکریل آمید به سنسور خاموش شده اضافه می‌گردد، واکنش قوی تیول-ان مایکل در بین گروه SH از GSHCQD و اکریل آمید رخ داد که GSHCQD را به محیط آزاد می‌کند و شدت FL در ۵۲۰ نانومتر دوباره به دست می‌آید. این سنسور میتواند میزان اکریل آمید را در pH ۷ و زمان کوتاه ۵ دقیقه تعیین کند. تحت شرایط بهینه، حد تشخیص اکریل آمید ۰.۱۲ pM، در یک محدوده خطی گسترده ۰ تا ۲۰۰ نانومتر می‌باشد (Pattnayak & Mohapatra, 2023).

بهینه‌یابی شرایط عملکرد حسگر زیستی بر پایه DNA و نانو ذره طلا

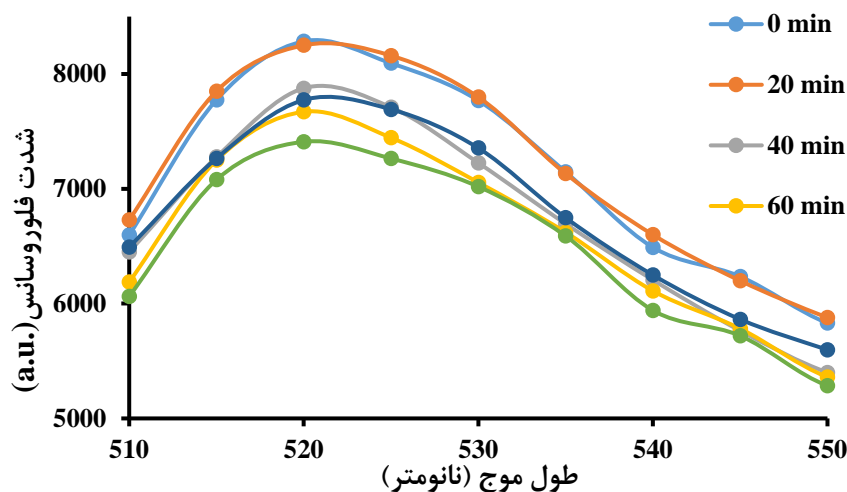
روش‌های مرسوم برای تشخیص نمونه‌های غذایی مختلف ممکن است در دسترس و قابل اجرا باشند، اما حسگرها اغلب حساس و ارزان هستند و امکان آنالیز فوری نمونه‌ها را می‌دهند. در این میان، فناوری نانو نقش مهمی در پیشرفت حسگرها دارد به طوری که محدودیت تشخیص را تا مقیاس نانو بهبود داده است. اختصاصی بودن و دیگر ویژگی‌های حسگرها با استفاده از نانومواد در ساختارشان بهبود می‌یابد. نانومواد ماتریس‌هایی هستند که حداقل یکی از ابعادشان ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشد. این مواد، نسبت سطح به حجم بالا و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی از خود نشان می‌دهند.

تاثیر زمان انکوبه شدن ssDNA و اکریل آمید بر عملکرد حسگر زیستی

برای تعیین زمان بهینه اتصال ssDNA و اکریل آمید بین باز گوانین در موقعیت ssDNA N-7، شدت فلورسانس در بازه‌های مختلف زمانی صفر تا ۱۰۰ دقیقه ثبت شد (شکل ۴). نتایج حاصل نشان داد که با گذشت زمان از صفر تا ۸۰ دقیقه، شاهد کاهش محسوسی در شدت فلورسانس هستیم.

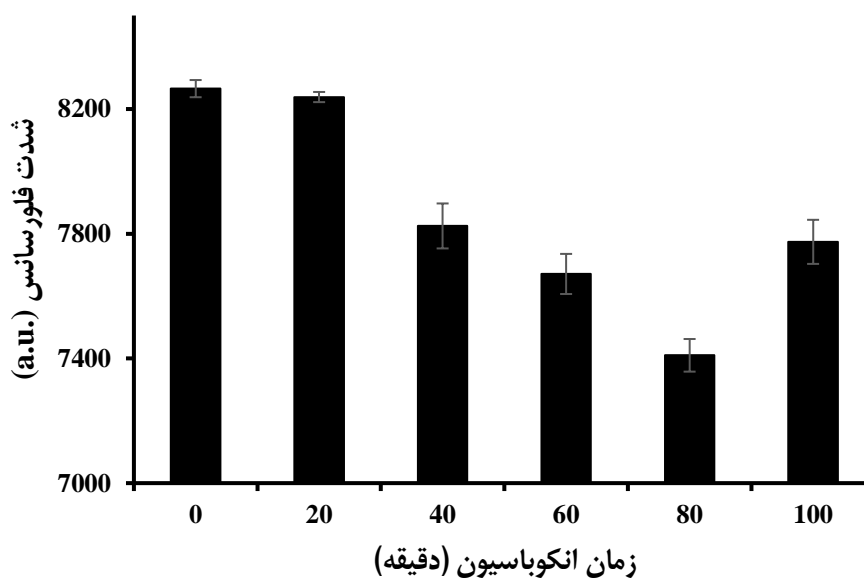
¹⁴ Glutathione-modified carbon quantum dots (GSHCQDs)

¹³ Fluorescence resonance electron transfer (FRET)



شکل ۴- بهینه سازی عملکرد حسگر طراحی شده براساس زمان انکوباسیون (صفر تا ۱۰۰ دقیقه) اکریل آمید و ssDNA برای ایجاد اداکت

Figure 4- Optimizing the designed sensor as a function of acrylamide and ssDNA incubation time for creating adduct (zero-100 min)



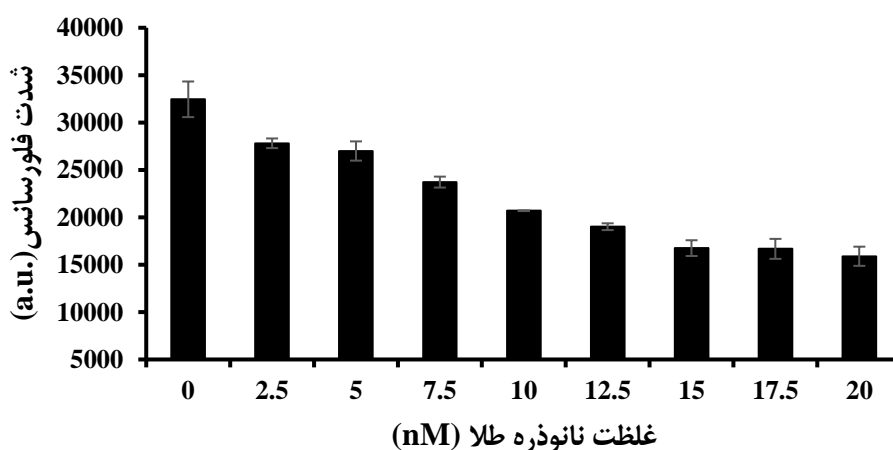
شکل ۵- پاسخ فلورسانسی حسگر در زمان‌های مختلف انکوباسیون اکریل آمید و ssDNA برای ایجاد اداکت (از صفر تا ۱۰۰ دقیقه) در ۵۲۰ نانومتر

Figure 5- The fluorescence intensity of the sensor at different incubation times (0-100 min) of acrylamide and ssDNA to create adducts at 520 nm

تأثیر غلظت انکوباسیون نانوذره طلا بر شدت فلوروسانس FAM-csDNA در سنسور فلوروسانسی سیگنال فلوروسانس به خوبی قابل تشخیص است و آشکارسازی و تعیین کمیت آن حتی در حضور مولکول‌های دیگر آسان است. به این دلایل، روش تشخیص فلوروسانس برای تعیین کمیت، از بین سایر روش‌ها ترجیح داده می‌شود. اگرچه بسیاری از بیومولکول‌ها، باندهای فلوروسانس نشری خاصی را نشان می‌دهند، اما

csDNA است. زمان انکوبه شدن برای تشکیل DNA دو رشته‌ای، براساس پژوهش‌های اثنی‌عشری و همکاران (Asnaashari *et al.*, 2018) ۳۰ دقیقه تعیین شده است. در این مطالعه، بیشترین میزان هیبریدیزاسیون بین ssDNA و FAM-csDNA پس از ۳۰ دقیقه از زمان انکوباسیون اتفاق افتاد. لی و همکاران (Li *et al.*, 2010) نیز با بررسی الکتروشیمیایی تریپتوفان با استفاده از الکتروود اصلاح شده با نانو ذره طلا در حضور سدیم دودسیل بنزن سولفونات نشان دادند که الکتروود اصلاح شده با نانو ذره طلا عملکرد خوبی در اکسایش تریپتوفان دارد و در مقایسه با الکتروود اولیه، الکتروود اصلاح شده با نانو ذره طلا باعث بهبود جذب تریپتوفان شده است. این محققان با بهینه سازی زمان رسوب، مقدار pH و شرایط انباشت به دامنه خطی $10^{-8} \times 9/0$ تا $10^{-5} \times 5/0$ مول بر لیتر و حد تشخیص $10^{-8} \times 8/0$ مول بر لیتر دست یافتند. محققان دیگر الکتروود ساده حاوی هموگلوبین و نانو ذرات طلا را برای تشخیص اکریل آمید به کار گرفتند. نتایج حاکی از عملکرد خوب و حساسیت بالای سنسور (۰/۱ میکرومولار) بود (Garabagiu & Mihailescu, 2011).

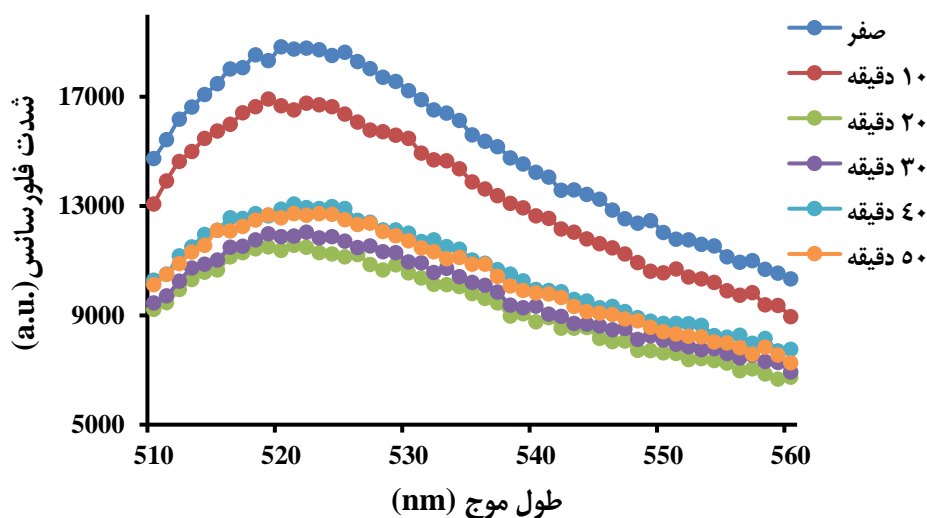
بیوانالیت‌هایی هم وجود دارند که کم فلوروسانس یا غیر فلوروسانس هستند که برای نشان‌دار کردن این بیومولکول‌ها از اسیدهای نوکلئیک، پروتئین، لیپیدها رنگ‌های فلوروسانس استفاده می‌شود. رشته مکمل DNA نشاندار شده با FAM به همین دلیل استفاده شده است. به منظور تعیین غلظت بهینه نانوذره طلا برای اتصال با FAM-csDNA، سطوح غلظتی مختلف از نانوذره طلا (صفر تا ۲۰ نانومولار) با مقدار مشخص از FAM-csDNA اضافه شد و طیف فلوروسانسی آن ثبت گردید (شکل ۶). گزارش نتایج به دست آمده نشان داد که بیشترین کاهش در شدت فلوروسانس در غلظت ۱۵ نانومولار حاصل شد که نشان از بیشترین میزان هم‌یوگی (کانجوگیشن)^{۱۵} بین FAM-csDNA و نانوذره طلا در این مقدار است. اثر زمان انکوباسیون در بازه زمانی ۵۰ دقیقه بر شدت فلوروسانس FAM-csDNA بررسی گردید (شکل ۷). نتایج به دست آمده نشان داد که شدت فلوروسانس در FAM-csDNA به طور قابل توجهی پس از گذشت ۲۰ دقیقه کاهش و پس از آن با شیب ملایمی تا ۵۰ دقیقه افزایش می‌یابد (شکل ۸). از این رو ۲۰ دقیقه زمان مناسب برای اتصال نانوذره طلا و FAM-



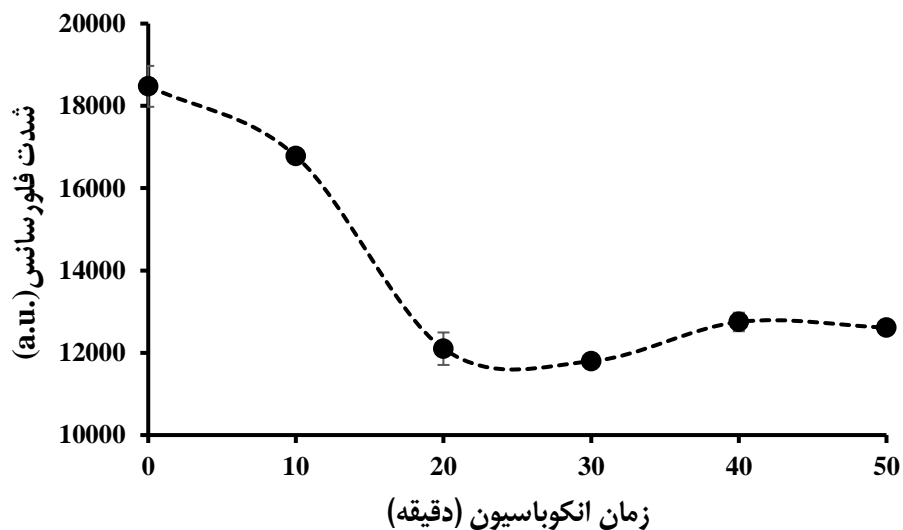
شکل ۶- پاسخ شدت فلوروسانس FAM-csDNA در حضور غلظت‌های مختلف از نانو ذره طلا در ۵۲۰ نانومتر

Figure 6- FAM-csDNA fluorescence intensity in the presence of different concentrations of gold nanoparticles at 520 nm

¹⁵ Conjugation



شکل ۷- بهینه سازی عملکرد حسگر طراحی شده در زمان‌های مختلف انکوباسیون نانو ذره طلا و FAM-csDNA (صفر تا ۵۰ دقیقه)
 Figure 7- Optimizing the function of designed sensor at FAM-csDNA and gold nanoparticles at different incubation time (zero-50 min)



شکل ۸- پاسخ فلوروسانس FAM-csDNA در در زمان‌های مختلف انکوباسیون نانو ذره طلا و FAM-csDNA در ۵۲۰ نانومتر
 Figure 8- Fluorescence intensity of FAM-csDNA at different incubation time of gold nanoparticles and FAM-csDNA at 520 nm

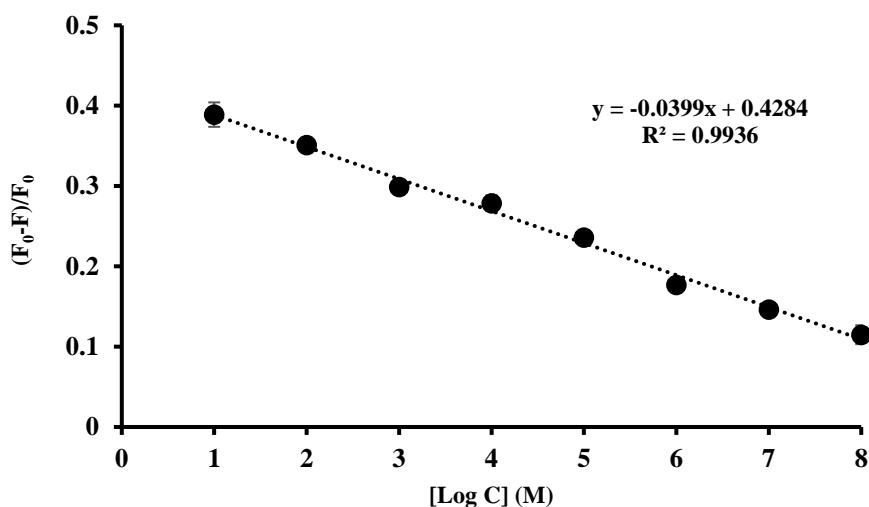
گسترده‌ای از ۰/۱ تا 10^{-8} مولار است. پایین‌ترین حد تشخیص (نسبت سیگنال به نویز برابر با ۳) اکریل‌آمید 10^{-9} مولار است که برای آنالیز اکریل‌آمید در فرآورده‌های غذایی حرارت داده شده، کارایی بالایی دارد. نتایج به‌دست آمده از این حسگر با نتایج مطالعات ونگ و همکاران (Wang et al., 2014) که به طراحی حسگر

تعیین کمی اکریل‌آمید با حسگر زیستی برای تعیین کمی اکریل‌آمید، غلظت‌های مشخصی از اکریل‌آمید تهیه شد و با حسگر مورد نظر طیف فلوروسانس آن ثبت گردید (شکل ۹). این شکل رابطه شدت نسبی فلوروسانس را در غلظت‌های مختلف اکریل‌آمید در عصاره آبی همبرگر نشان می‌دهد که حاکی از رابطه خطی خوب و

طراحی حسگر زیستی بر پایه نانوذره طلا و DNA به منظور تشخیص اکریل آمید در همبرگر

فلوئورسانسی SYBR Green I (SGI) می‌گردد. در حضور اکریل آمید، میل ترکیبی بالاتر آبتامر با رشته DNA مکمل موجب تغییر ساختار کمپلکس آبتامر/اکریل آمید می‌گردد. آبتامرهای آزاد روی نانو ذرات طلا جذب و با سانتریفیوژ کردن جدا شدند. این سنسور می‌تواند در محدوده ۰/۰۰۵ تا ۵۰ میلی گرم بر لیتر و حد تشخیص پایین ۴/۶۸ میکروگرم بر لیتر به خوبی میزان اکریل آمید را در بیسکویت تعیین کند. حسگر طراحی شده، در مقایسه با دیگر روش‌های آنالیز اکریل آمید، نیاز به دستگاه پیچیده، زمان زیادی برای آنالیز و کارشناسان‌های کارآموده ندارد و می‌تواند مقدار اکریل آمید را با دقت و حساسیت تا غلظت‌های پایین تعیین کند.

الکتروشیمیایی حاوی نانوذرات طلا، پی-آمینوتیوفنول^{۱۶} بر الکتروکد کربن با محدوده خطی $10^{-10} \times 1/0$ مول بر لیتر تا $10^{-7} \times 1/0$ مول بر لیتر با حد تشخیص $10^{-12} \times 5/0$ مول بر لیتر پرداختند، دارای محدوده خطی تشخیص وسیعتری است (Wang et al., 2014).؛ و با نتایج حاصل از مطالعات لی و همکاران (Li et al., 2014) که حسگری بر پایه اکسید گرافن و DNA برای تشخیص اکریل آمید با محدوده خطی $10^{-8} \times 5/0$ مول بر لیتر تا $10^{-3} \times 1/0$ مول بر لیتر ابداع کردند، تقریباً مشابه است. زو و همکاران (Xu et al., 2023) نیز به ابداع بیوسنسور فلوئورسنسی برای تشخیص اکریل آمید بر مبنای DNA و نانوذره طلا پرداختند. بیوسنسور فلوئورسنسی برای تشخیص اکریل آمید با استفاده از اثر جذب نانوذرات طلا با DNA دورشته‌ای موجب تغییر ویژگی‌های



شکل ۹- منحنی استاندارد اکریل آمید F₀ و F به ترتیب، شدت فلوئورسانس در ۵۲۰ نانومتر پیش از افزودن و بعد از افزودن اکریل آمید به عصاره آبی همبرگر است

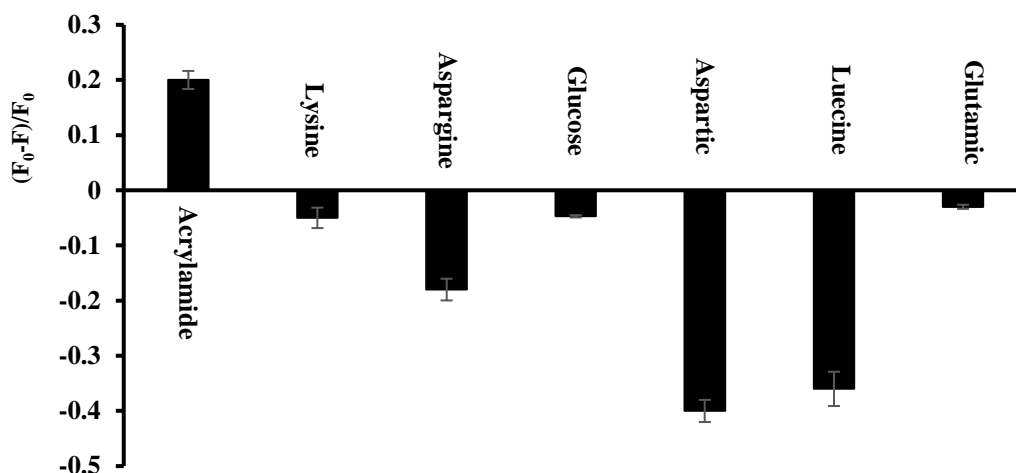
Figure 9- Acrylamide standard curve in aqueous hamburger extract. F₀ and F are the FL intensities at 520 nm before and after addition of various amounts of acrylamide, respectively.

است که امکان آنالیز سریع مواد چندگانه را در شرایط زنده نیز فراهم می‌کند. نانوحسگرها می‌توانند نقش مهمی به عنوان ابزار آنالیزی دقیق در زمینه تشخیص افزودنی‌های مواد غذایی و ترکیبات سمی و مضر، برای سنجش سریع و

حساسیت حسگر زیستی طراحی شده نسبت به اکریل آمید حساسیت و ویژگی‌های حسگرها با استفاده از نانومواد در ساختارشان بهبود یافته و استفاده از نانومواد در حسگرها باعث انقلابی در زمینه‌های آنالیز شیمیایی و زیستی شده

¹⁶ P-Aminothiophenol (P-ATP)

با هزینه پایین در صنعت و سیستم‌های نظارتی داشته باشند. آسپاراژین، نشاسته، لوسین، لیزین، گلوتامیک و اسپارتیک با به منظور تعیین حساسیت حسگر طراحی شده، چندین حسگر مورد نظر آنالیز شد. نتایج در شکل ۱۰ آمده است که ترکیب رایج در ماتریکس مواد غذایی همچون گلوکز، حاکی از حساسیت بالای حسگر نسبت به اکریل آمید است.



شکل ۱۰- کارایی حسگر زیستی در حضور ترکیبات مداخله گر مختلف (۰/۰۱ مولار) F و F₀ به ترتیب، شدت فلورئوسانس در ۵۲۰ نانومتر قبل و بعد از افزودن هر یک از عوامل مداخله گر

Figure 10- Efficiency of fluorescence in the presence of various substances (0.01M). F₀ and F are the FL intensities at 520 nm before and after addition of each interfering agents, respectively.

تعیین مقدار اکریل آمید در همبرگر با حسگر زیستی خوبی در نمونه‌های تحت آزمایش بود، که در جدول ۲ آمده است. این حسگر زیستی می‌تواند در همبرگر که از مهم‌ترین عصاره آبی همبرگر اجرا شد که حاکی از ریکاوری و RSD فرآورده‌های گوشتی حاوی اکریل آمید است به کار رود.

جدول ۲- ریکاوری و انحراف استاندارد نسبی اکریل آمید در همبرگر با حسگر زیستی

Table 1- Recovery and relative standard deviation (RSD) of acrylamide in hamburger samples analyzed by the biosensor

نمونه ها	اکریل آمید اضافه شده (میلی مولار)	اکریل آمید حاصل (میلی مولار)	ریکاوری (درصد)	انحراف استاندارد نسبی (درصد)
Samples	Added acrylamide (mM)	Found acrylamide (mM)	Recovery (%)	RSD (% , n=3)
1	0.01	0.012±0.001	120	8.33
2	0.1	0.11±0.003	110	2.72
3	10	9.42±0.05	94.2	0.53

نتیجه گیری
یکی از ترکیبات سرطان‌زا که طی فراوری مواد غذایی به دست می‌آید، اکریل آمید است که در محصولات غذایی سرخ شده در دمای بالا مشاهده می‌شود. این ماده می‌تواند در بدن تجزیه و منجر شود به موتاسیون و بروز سرطان و تجمع در اندام‌های مختلف بدن. از آنجا که روش‌های آنالیز اکریل آمید با توجه به پیچیدگی‌های ماتریکس غذایی اغلب گران و دشوار است، سعی بر طراحی و بهینه سازی حسگر

زیستی بر پایه الیگونوکلوئوتیدها و نانوذرات طلا شد. پس از طراحی سیستم بهینه برای هر حسگر، میزان اکریل‌آمید در عصاره آبی حاصل از همبرگر تعیین گردید. این حسگر بر پایه میل ترکیبی گوانین DNA با مولکول اکریل‌آمید طراحی شد. این اتصال با ایجاد ممانعت فضایی از اتصال دو رشته مکمل DNA به یکدیگر جلوگیری می‌کند و پس از افزودن نانو ذره طلا، FAM-csDNA باند نشده با پیوند الکترواستاتیک متصل و توسط آن خاموش می‌گردد و به تبع آن منجر به تغییر در خواص نوری مانند شدت یا فرکانس جذب و نشر و ... می‌گردد. این حسگر نوری برای تشخیص اکریل‌آمید محدوده خطی وسیع (۰/۱ تا 10^{-8} مولار) و حد تشخیص ($3/34 \times 10^{-9}$ مولار) دارد و از این رو این حسگر توانست به خوبی مقدار اکریل‌آمید را در سطوح پایین تشخیص دهد. آزمون ریکاوری نیز برای سه نمونه اکریل‌آمید به عصاره آبی همبرگر حاکی از ریکاوری و RSD خوبی این حسگر بود. این حسگر حساسیت بالایی در حضور عوامل مداخله گر از خود نشان داد. بدین ترتیب می‌توان گفت حسگرهای طراحی شده، در مقایسه با روش‌های مرسوم، نه تنها به نیروی کار متخصص، صرف وقت و هزینه زیاد نیاز ندارد، بلکه به خوبی می‌تواند با روش‌های کروماتوگرافی در تعیین اکریل‌آمید رقابت کند و چه بسا جایگزین روش‌های کروماتوگرافی شود.

منابع

- Asnaashari, M., Esmaeilzadeh Kenari, R., Farahmandfar, R., Taghdisi, S. M., & Abnous, K. (2018). Fluorescence quenching biosensor for acrylamide detection in food products based on double-stranded DNA and gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 265, 339-345. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.083>
- Bethke, P. C., & Bussan, A. J. (2013). Acrylamide in Processed Potato Products. *American Journal of Potato Research*, 90(5), 403-424. doi:10.1007/s12230-013-9321-4
- Claeys, W. L., De Vleeschouwer, K., & Hendrickx, M. E. (2005). Effect of amino acids on acrylamide formation and elimination kinetics. *Biotechnology Progress*, 21(5), 1525-1530.
- Elbashir, A. A., Omar, M. M. A., Ibrahim, W. A. W., Schmitz, O. J., & Aboul-Enein, H. Y. (2014). Acrylamide analysis in food by liquid chromatographic and gas chromatographic methods. *Critical reviews in analytical chemistry*, 44(2), 107-141.
- Emrani, A. S., Danesh, N. M., Lavaee, P., Ramezani, M., Abnous, K., & Taghdisi, S. M. (2016). Colorimetric and fluorescence quenching aptasensors for detection of streptomycin in blood serum and milk based on double-stranded DNA and gold nanoparticles. *Food Chemistry*, 190, 115-121.
- Garabagiu, S., & Mihailescu, G. (2011). Simple hemoglobin-gold nanoparticles modified electrode for the amperometric detection of acrylamide. *Journal of electroanalytical chemistry*, 659(2), 196-200.
- Ghasemian, S., Rezaei, K., Abedini, R., Poorazarang, H., & Ghaziani, F. (2014). Investigation of different parameters on acrylamide production in the fried beef burger using Taguchi experimental design. *Journal of food science and technology*, 51, 440-448.
- Hu, Q., Xu, X., Li, Z., Zhang, Y., Wang, J., Fu, Y., & Li, Y. (2014). Detection of acrylamide in potato chips using a fluorescent sensing method based on acrylamide polymerization-induced distance increase between quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 64-71. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.046>

- Hu, Q., Xu, X., Li, Z., Zhang, Y., Wang, J., & Li, Y. (2013). *Rapid detection of acrylamide in food using a fluorescent sensing method based on functional CdSe/ZnS quantum dots*. Paper presented at the SENSORS, 2013 IEEE.
- Huang, S., Lu, S., Huang, C., Sheng, J., Zhang, L., Su, W., & Xiao, Q. (2016). An electrochemical biosensor based on single-stranded DNA modified gold electrode for acrylamide determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 224, 22-30.
- Khoshbin, Z., Moeenfar, M., Abnous, K., & Taghdisi, S. M. (2023). Nano-gold mediated aptasensor for colorimetric monitoring of acrylamide: Smartphone readout strategy for on-site food control. *Food Chemistry*, 399, 133983.
- Krajewska, A., Radecki, J., & Radecka, H. (2008). A voltammetric biosensor based on glassy carbon electrodes modified with single-walled carbon nanotubes/hemoglobin for detection of acrylamide in water extracts from potato crisps. *Sensors*, 8(9), 5832-5844.
- Krishnakumar, T., & Visvanathan, R. (2014). Acrylamide in food products: a review. *Journal of Food Processing and Technology*, 5(7).
- Li, C., Ya, Y., & Zhan, G. (2010). Electrochemical investigation of tryptophan at gold nanoparticles modified electrode in the presence of sodium dodecylbenzene sulfonate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 340-345.
- Li, D., Xu, Y., Zhang, L., & Tong, H. (2014). A label-free electrochemical biosensor for acrylamide based on DNA immobilized on graphene oxide-modified glassy carbon electrode. *Int. J. Electrochem. Sci*, 9, 7217-7227.
- Liu, C., Luo, F., Chen, D., Qiu, B., Tang, X., Ke, H., & Chen, X. (2014). Fluorescence determination of acrylamide in heat-processed foods. *Talanta*, 123, 95-100.
- Mojska, H., Gielecińska, I., Zielińska, A., Winiarek, J., & Sawicki, W. (2016). Estimation of exposure to dietary acrylamide based on mercapturic acids level in urine of Polish women post partum and an assessment of health risk. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 26(3), 288-295.
- Oracz, J., Nebesny, E., & Żyżelewicz, D. (2011). New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*, 86, 23-34.
- Pattnayak, B. C., & Mohapatra, S. (2023). A smartphone-assisted ultrasensitive detection of acrylamide in thermally processed snacks using CQD@ Au NP integrated FRET sensor. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 286, 1-22009.
- Ramezani, M., Danesh, N. M., Lavaee, P., Abnous, K., & Taghdisi, S. M. (2015). A novel colorimetric triple-helix molecular switch aptasensor for ultrasensitive detection of tetracycline. *Biosensors and Bioelectronics*, 70, 181-187.
- Saeedian, M., Niazmand, R., Ajam, M. (2019). Chemical characteristics and the amount of acrylamide in burger: the effect of meat amount and powdered milk. *Journal of food science and technology*, (Iran) 91 (16), 337-346.
- Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mucic, R. C., Mirkin, C. A., & Letsinger, R. L. (1998). One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc*, 120(9), 1959-1964.

- Tekkeli, S. E. K., Önal, C., & Önal, A. (2012). A review of current methods for the determination of acrylamide in food products. *Food Analytical Methods*, 5(1), 29-39.
- Wang, Q., Ji, J., Jiang, D., Wang, Y., Zhang, Y., & Sun, X. (2014). An electrochemical sensor based on molecularly imprinted membranes on a P-ATP–AuNP modified electrode for the determination of acrylamide. *Analytical Methods*, 6(16), 6452-6458.
- Xu, N., Ma, X., Cao, Y., Wang, H., Wu, H., Zheng, H., . . . Sun, C. (2023). A novel fluorescent structure-switching aptasensor for the sensitive detection of acrylamide based on AuNPs-assisted separation of ssDNA. *Advanced Agrochem*, 2(3), 276-283.
- Yaylayan, V. A., Locas, C. P., Wnorowski, A., & O'Brien, J. (2004). The role of creatine in the generation of N-methylacrylamide: a new toxicant in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17), 5559-5565.

Original Research

Fabrication a biosensor based on double-stranded DNA and gold nanoparticles to detect acrylamide in hamburger

M.Asnaashari*, R. Farahmandfar

* **Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Animal Processing, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: asnaashari@asri.ir

Received: 20 August 2023 **Accepted:** 24 December 2023

http://doi: 10.22092/FOODER.2024.363260.1372

Abstract

Acrylamide is a hazardous carcinogen which is produced during high temperature food processing by Millard reaction. Quantitative and qualitative methods of acrylamide detection in food products often require skilled technicians and high cost. So, in this paper, the biosensor based on gold nanoparticles and FAM-labeled double-stranded DNA (FAM-dsDNA) is fabricated. In the presence of acrylamide, the ssDNA binds to acrylamide and causes ssDNA-acrylamide complex and its release FAM-labeled complementary strand DNA (FAM-csDNA) adsorbs on the surface of gold nanoparticles and quenches. Analysis of synthesized gold nanoparticles by SEM and DLS showed that gold nanoparticles were well distributed with diameter of 13-17 nm. Under optimized conditions (the binding of DNA and acrylamide after 80 minutes, the highest hybridization between ssDNA and FAM-csDNA after 20 minutes of incubation time, the most conjugation between FAM-csDNA and gold nanoparticles at 15 nm), this fluorescent analytical approach showed high selectivity toward acrylamide in hamburger with marvelous linear response (0.1 to 10^{-8} M) and low limit of detection (3.34×10^{-9} M). Therefore, it can be admitted that the designed sensors, comparing to the common method, not only do not require specialized labor and spending much time and cost, but can also be a good alternative to chromatography methods for acrylamide detection in food products.

Keywords: Acrylamide, Biosensor, Limit of detection, Hamburger, Fluorescence

<http://doi:10.22092/FOODER.2024.363260.1372>

Email : asnaashari@asri.ir

نگارنده مسئول:



© 2023, The Author(s). Published by [Agricultural Engineering Research Institute](https://www.arei.ac.ir/). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).