



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **96575** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
G01N 33/00
C12N 11/00
C08F 216/00
C08F 226/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 09435	(72) Винахідник(и): Пилипенко Людмила Миколаївна (UA), Пилипенко Інна Василівна (UA), Данилова Олена Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 26.08.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.02.2015	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.02.2015, Бюл.№ 3	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНИХ РЕЧОВИН

(57) Реферат:

Спосіб одержання флуоресцентного біосенсора для визначення токсичних речовин включає вирощування біомаси клітин фотобактерій, відокремлення центрифугуванням, змішування клітин фотобактерій з розчином полівінілового спирту, приготованого на живильному середовищі Фаргалі і наступне формування іммобілізату. До суміші клітин фотобактерій з розчином полівінілового спирту, приготованого на живильному середовищі Фаргалі додають модифікатор, а іммобілізацію здійснюють при співвідношенні полівініловий спирт:маса клітин фотобактерій:модифікатор рівному (5-16):(0,1-10,0):(0,1-5,0), відповідно.

UA 96575 U

Корисна модель належить до галузі гігієнічної безпеки харчових продуктів і продовольчої сировини та екологічної безпеки, а саме до способу одержання флуоресцентного біосенсора для визначення токсичних речовин у харчових продуктах біологічним методом.

Найбільш близьким за технічною суттю до запропонованого способу є спосіб отримання люмінесцентного біосенсора для визначення токсикантів з використанням іммобілізованих клітин бактерій, що включає одностадійне заморожування при температурі $(-15-20\pm 2)^{\circ}\text{C}$ іммобілізованих в кріогель клітин мікроорганізмів родів *Photobacterium* і *Vibrio* (див. патент РФ № 2394910, МПК⁶ C12N 11/04, C12Q 1/02, C12Q 1/66). При цьому біомасу клітин фотобактерій після вирощування на відповідному середовищі і центрифугування (10 хв при 5000 об/хв) змішують із розчином полівінілового спирту (ПВС), приготованого на середовищі Фаргалі, отриману суспензію за допомогою дозатора розподіляють по $0,2\text{ см}^3$ в лунки планшетів із плоским дном, заморожують, витримують 17 годин, розморожують при температурі $(+4) - (+8)^{\circ}\text{C}$ (4-8) годин і після розморожування отримують циліндричні гранули із складом: клітини бактерій (0,15-1,5), ПВС (5,0-10,0), водна фаза - до 100. Гранули використовують для визначення токсичності, порівнюючи зміну люмінесценції в пробі і контролі. Про наявність або відсутність сумарної токсичності речовин роблять висновки на основі аналізу відсотка інгібування люмінесценції фотобактерійної системи у присутності токсикантів. Суспензію можна заморожувати у будь-якій формі, відповідно, біосенсор може бути у вигляді пластин, кульок, циліндрів тощо.

Цей спосіб вибраний як найближчий аналог.

Найближчий аналог і корисна модель, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

- вирощування біомаси клітин фотобактерій;
- відокремлення шляхом центрифугування;
- змішування клітин фотобактерій з розчином полівінілового спирту, приготованого на середовищі Фаргалі;
- формування іммобілізату.

Але спосіб за найближчим аналогом має наступні недоліки:

- рецепторні елементи (біомаса мікроорганізмів) під час іммобілізації зазнають значних втрат внаслідок дії температурних та інших факторів, що викликає необхідність використання їх значних надлишків та для самої іммобілізації необхідні значні проміжки часу;
- модифікація вимагає складного процесу отримання кріогелю з використанням рідкого азоту, що є небезпечним процесом і вимагає застосування спеціальної апаратури.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб одержання флуоресцентного біосенсора для визначення токсичних речовин, в якому шляхом проведення іммобілізації клітин фотобактерій в присутності модифікатора при заданому співвідношенні компонентів, забезпечити спрощення процесу одержання біосенсора, а також отримання однозначного результату щодо величини токсичності речовин, підвищення чутливості і достовірності отриманих результатів, які отримують з використанням біосенсора.

Поставлена задача вирішується в способі одержання флуоресцентного біосенсора для визначення токсичних речовин, що включає вирощування біомаси клітин фотобактерій, відокремлення центрифугуванням, змішування клітин фотобактерій з розчином полівінілового спирту, приготованого на живильному середовищі Фаргалі і наступне формування іммобілізату, згідно з корисною моделлю, до суміші клітин фотобактерій з розчином полівінілового спирту, приготованого на живильному середовищі Фаргалі додають модифікатор, а іммобілізацію здійснюють при співвідношенні полівініловий спирт: маса клітин фотобактерій із вмістом клітин в суспензії $1,6\cdot 10^6 - 1,0\cdot 10^8$ клітин/г: модифікатор рівному (5-16):(0,1-10,0):(0,1-5,0), відповідно.

Як модифікатор використовують гліцерин або ксиліт, або гліцид.

До суміші клітин фотобактерій, полівінілового спирту, приготованого на живильному середовищі Фаргалі і модифікатора додають антиоксидант в кількості 0,1-5,0 мас. %.

Як антиоксидант використовують аскорутин або кверцетин, або аскорбінову кислоту.

При приготуванні біосенсора з іммобілізованими природними компонентами (клітинами фотобактерій родів *Photobacterium* і *Vibrio*) з використанням пропонованого способу, не потрібно тривале заморожування, що дозволяє спростити процедуру іммобілізації і уникнути втрати чутливості біорецепторних елементів, внаслідок згубної дії низької температури на природні компоненти. Отримані з використанням описаного способу, полімерні тонкі плівки або біосенсиори іншої форми (гранули) з іммобілізованими мікроорганізмами використовують для визначення вмісту токсичних речовин у харчових продуктах біологічним методом.

Нижня межа концентрації біомаси клітин, що заявляється, у складі пропонованого способу визначається необхідним рівнем люмінесценції, що забезпечує тривале використання біосенсора для визначення токсикантів. При використанні клітин фотобактерій менше ніж 0,1 %

отримуваний іммобілізований біосенсор має помітно менший рівень люмінесценції, що призводить до зменшення точності досліджень, а верхня межа концентрації клітин у композиції визначається тим, що при використанні концентрації, вище 10,0 %, відбувається неповне включення усіх клітин, що вводяться в суміш з розчином полімеру, в гель ПВС і спостерігається їх вимивання при використанні отриманих плівок в середовищі для визначення токсикантів.

Таким чином, перевищення вказаної верхньої межі концентрації недоцільно. Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом можна пояснити наступним.

Технічним результатом даного способу є:

- спрощення процесу одержання біосенсора;
- підвищення чутливості визначення токсичних речовин в харчових продуктах із використанням біосенсора;
- підвищення достовірності отриманих результатів.

Спрощення досягається за рахунок отримання біосенсора без стадії заморожування та розморожування.

При отриманні біосенсора під час полімеризації йому може бути надана будь-яка форма: гранул, навівсфер, плівок, трубок, листків, часток неправильної форми тощо.

Визначення токсикантів за допомогою біосенсора здійснюється за допомогою фотоприймачів, які функціонують в струмовому режимі, при цьому визначають зміни рівня люмінесценції іммобілізованих біоматеріалів (клітин фотобактерій) після їх експонування в середовищі, в якому наявні різні токсиканти в інтервалі поглинання $\lambda=390-410$ нм.

Величина токсичності неорганічних та органічних речовин, що можуть бути визначені запропонованим способом, залежить від їх сумарного вмісту, хімічної природи і належності до різних видів токсикантів: важкі метали, органічні речовини, у тому числі, різні групи пестицидів (інсектициди, фунгіциди, гербіциди), глікозиди, речовини білкового походження тощо.

Запропонований спосіб дозволяє швидко виявити потенційно небезпечні об'єкти, які містять контамінанти неорганічного та органічного походження, що важливо для визначення безпеки харчових продуктів і продовольчої сировини та екологічної безпеки, а також моніторингу якості харчових систем. Приклади співвідношення компонентів наведені в табл. 1.

Здійснення заявляемого способу ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1. 0,25 г біомаси клітин бактерій, що світяться *P. phosphoreum* (Cohn) Ford, отримані після центрифугування (10 хв, 5000 об/хв) із вмістом клітин в суспензії $1,6 \cdot 10^6$ клітин/г, змішували при кімнатній температурі з 8,75 г 14 % розчину ПВС, приготованого на основі поживного середовища Фаргалі, що містить 30 г/л NaCl, 5,3 г/л Na_2HPO_4 , 2,1 г/л $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 г/л $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$, 0,1 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л пептону і 3 см³ гліцерину, до отримання однорідної маси. Тобто, співвідношення біомаси мікроорганізмів до основи складало 1:35. Цю суспензію далі використовували для отримання плівки іммобілізованого біосенсора. Отриману суспензію розподіляли за допомогою дозуючого пристрою (шприц, дозатор та ін.) в чашки Петрі при температурі 20 °C і залишали для полімеризації на 12-14 год.

Визначали люмінесценцію *P. phosphoreum* (Cohn) Ford при поглинанні $\lambda=410$ нм. Визначали інтенсивність флуоресценції, яку в подальшому приймали за 100 %. Визначення токсичності проби за допомогою отриманої біотестової системи проводили по відносній відмінності в інтенсивності біолюмінесценції контрольної і дослідної проб (табл. 2).

Були проведені виміри чутливості біолюмінесценції біотесторів до дії токсичних чинників хімічного походження: солей важких металів (Zn^{2+} , Pb^{2+}), фенолу, пестициду "Бульдог". З'ясовано, що низькі концентрації токсикантів викликають у бактерій стабільну індукцію біолюмінесценції, а високі концентрації (більше 2 ГДК) викликали інгібування біолюмінесценції. Вплив токсикантів визначали після занурення плівки з іммобілізованими фотобактеріями в модельні розчини із додаванням солі токсикантів. Приклади результатів визначення впливу токсикантів на зміни ΔI наведені у табл. 3.

Приклади 2, 3, 4 здійснювали аналогічно прикладу 1, але використовували розчин ПВС із різною масовою часткою ПВС, додавали різні кількості модифікатору. Як модифікатор використовували відповідно ксиліт, сорбіт, манніт. Склад представлений у табл. 1.

Приклади 5, 6, 7, здійснювали аналогічно прикладу 1, але використовували розчин ПВС із різною масовою часткою ПВС, додавали різні кількості гліцерину, додатково вводили 0,1 г аскорутину або кверцетину. Склад представлений у табл. 1.

Приклади 8, 9, 10, 11 здійснювали аналогічно прикладу 1, але використовували розчин ПВС із різною масовою часткою ПВС, додавали різні кількості гліцерину, додатково вводили 0,1 г аскорутину або кверцетину або аскорбінової кислоти. Склад представлений у табл. 1.

Приклад 12 здійснювали аналогічно прикладу 1, але використовували розчин ПВС з масовою часткою 5,0 %, додавали 0,1 % ксиліту, додатково вводили 0,5 г кверцетину.

Приклад 13 здійснювали аналогічно прикладу 1, але як культуру фотобактерій використовували штам бактерій *Vibrio fischeri*, виділений з риби (кільки чорноморської). Вплив токсикантів визначали після занурення плівки з іммобілізованими фотобактеріями в модельні розчини із додаванням солі токсикантів. Результати визначення впливу токсикантів на зміни ΔI наведені у табл. 3.

Приклади 14, 15, 16 здійснюються аналогічно прикладу 13, але використовували розчин ПВС із різною масовою часткою ПВС, додавали різні кількості гліцерину, додатково вводили 0,1 г аскорутину або кверцетину. Склад представлений у табл. 1.

Результати визначення впливу токсикантів на зміни ΔI наведені у табл. 3.

Таблиця 1

Склад іммобілізаційної композиції з фотобактеріями для виготовлення плівки (масова частка, %)

№ з/п прикладів	суспензія клітин фотобактерій із вмістом $1,2 \cdot 10^7$ - $1,0 \cdot 10^8$ кл/г		Полівініловий спирт на живильному середовищі Фаргалі	модифікатор			антиоксидант		
	Photo-bacterium	Vibrio		гліцерин	ксиліт	гліцид	аскорутин	кверцетин	аскорбінова кислота
1	2,8	-	14	0,3	-	-	-	-	-
2	0,1	-	5	0,1	-	-	-	-	-
3	10,0	-	10	3,0	-	-	-	-	-
4	5,0	-	14	5,0	-	-	-	-	-
5	0,1	-	5	-	3,0	-	-	-	-
6	5,0	-	16	-	-	3,0	-	-	-
7	10,0	-	10	-	-	3,0	-	-	-
8	0,1	-	5	0,1	-	-	0,1	-	-
9	5,0	-	16	3,0	-	-	-	0,1	-
10	10,0	-	10	5,0	-	-	-	-	0,1
11	2,5	-	14	3,0	-	-	-	-	0,1
12	2,8	-	5	-	0,1	-	-	0,5	-
13	-	5,0	15	4,2	-	-	0,5	-	-
14	-	2,5	16	5,0	-	-	0,1	-	-
15	-	10,0	5	0,1	-	-	-	0,1	-
16	-	0,1	10	3,0	-	-	0,5	-	-

Таблиця 2

Вплив модельних розчинів токсикантів на визначення інтенсивності флуоресценції при $\lambda=410$ нм

Досліджуваний зразок	Результати аналізу			
	Оптична щільність початкова	Оптична щільність через 30 хв	Різниця оптичної щільності, Δ	залишкова люмінесценція, ΔI , %
Вода	0,081	0,081	0	100,0
Вода із додаванням 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	0,081	0,068	0,013	84,0
Вода з додаванням 5 ГДК Pb^{2+}	0,080	0,064	0,016	80,0
Вода з додаванням 3 ГДК о-хлорфенолу	0,080	0,055	0,025	68,8
Вода із додаванням інсектициду 2 ГДК "Децис"	0,080	0,042	0,038	52,5

Продовження таблиці 2

Вода із додаванням інсектициду 1 ГДК "Тілт"	0,080	0,053	0,027	66,3
Вода із додаванням 1 ГДК інсектициду "Бульдог"	0,079	0,031	0,048	39,2

Таблиця 3

Результати дослідження впливу зразків на зміни ΔI

Використана композиція із табл. 1	Досліджуваний зразок	Результати аналізу	
		залишкова люмінесценція, %	оцінка токсичності
контроль	Вода	91±2	нетоксичний
1	Сік зі слив	89±2	нетоксичний
	Сік зі слив із додаванням 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	87±3	нетоксичний
	Пюре з кабачків, із додаванням 1 ГДК о-хлорфенолу + 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	37±2	токсичний
2	Морква подрібнена з додаванням 0,5 ГДК Pb^{2+} +0,5 ГДК Cd^{2+}	84±3	нетоксичний
	Морква подрібнена з додаванням 2 ГДК Pb^{2+} +0,3 ГДК інсектициду "Бульдог"	61±3	слабо токсичний
	Пюре з кабачків із додаванням 0,5 ГДК о-хлорфенолу +1,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	23±2	токсичний
3	Пюре зі слив із додаванням 0,3 ГДК інсектициду "Бульдог"	90±2	нетоксичний
	Пюре зі слив із додаванням 1,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	59±2	слабо токсичний
	Пюре зі слив із додаванням 2 ГДК Cd^{2+} + 2 ГДК інсектициду "Бульдог"	23±3	токсичний
4	Сік зі слив із додаванням 0,3 ГДК інсектициду "Децис"	90±3	нетоксичний
	Сік зі слив із додаванням 0,5 ГДК о-хлорфенолу +0,5 ГДК Pb^{2+} +0,5 ГДК фунгіциду "ТІЛТ":	66±3	слабо токсичний
	Сік зі слив із додаванням 2 ГДК Cd^{2+} +0,5 ГДК інсектициду "Децис"	40±3	токсичний
5	Картопля свіжа подрібнена	90±3	нетоксичний
	Картопля свіжа подрібнена з додаванням 1 ГДК Pb^{2+} +0,5 ГДК "Децис"	75±3	слабо токсичний
	Картопля свіжа подрібнена з додаванням 1,5 ГДК о-хлорфенолу +1 ГДК інсектициду "Бульдог"	37±3	токсичний
6	Сік зі слив із додаванням 0,5 ГДК Pb^{2+} +0,3 ГДК інсектициду "Децис"	84±3	нетоксичний
	Сік зі слив із додаванням 1 ГДК Pb^{2+} +2 ГДК Cd^{2+}	60±3	слабо токсичний
	Вода з додаванням по 0,5 ГДК "Децис" та 0,5 ГДК "Тілт"	41±3	токсичний
7	Пюре зі слив із додаванням 0,5 ГДК Cd^{2+} +0,3 ГДК інсектициду "Бульдог"	83±3	нетоксичний
	Пюре зі слив із додаванням 1 ГДК Cd^{2+} +1 ГДК інсектициду "Бульдог"	59±2	слабо токсичний
	Пюре зі слив із додаванням 2 ГДК Cd^{2+} +2 ГДК інсектициду "Бульдог"	23±3	токсичний

Продовження таблиці 3

8	Морква подрібнена з додаванням 0,5 ГДК Pb^{2+} +0,3 ГДК "Тілт"	84±3	нетоксичний
	Морква подрібнена з додаванням 2 ГДК Pb^{2+} + 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	57±3	слабо токсичний
	Морква подрібнена із додаванням 0,5 ГДК о-хлорфенолу+1,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	27±3	токсичний
9	Морква подрібнена із додаванням 0,5 ГДК о-хлорфенолу	82±3	нетоксичний
	Морква подрібнена з додаванням 1,5 ГДК Cd^{2+} +0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	51±3	слабо токсичний
	Морква подрібнена з додаванням 1 ГДК "Тілт"+0,5 ГДК "Децис"+0,5 ГДК "Бульдог"	24±3	токсичний
10	Морква подрібнена з додаванням 1 ГДК Cd^{2+} +1 ГДК о-хлорфенолу	61±3	слабо токсичний
	Морква подрібнена з додаванням 1 ГДК о-хлорфенолу+1 ГДК "Бульдог"	41±3	токсичний
11	Пюре кабачків з додаванням 1 ГДК Pb^{2+} +0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	59±3	слабо токсичний
	Сік слив із додаванням 0,5 ГДК "Децис"+0,5 ГДК "Тілт"	44±2	токсичний
12	Пюре з кабачків із додаванням 0,3 ГДК "Децис"+0,3 ГДК "Тілт"	65±3	слабо токсичний
	Пюре з кабачків із додаванням 2 ГДК Pb^{2+} +1 ГДК о-хлорфенолу	40±3	токсичний
13	Пюре кабачків з додаванням 0,5 ГДК "Децис"	90±3	нетоксичний
	Пюре кабачків з додаванням 2 ГДК Pb^{2+} +0,6 ГДК "Децис"	61±3	слабо токсичний
	Вода з додаванням 2 ГДК Pb^{2+} +1,0 ГДК інсектициду "Бульдог"	45±2	токсичний
14	Пюре кабачків із додаванням 0,5 ГДК о-хлорфенолу+0,5 ГДК фунгіциду "Тілт"	69±3	слабо токсичний
	Пюре кабачків із додаванням +1,5 ГДК о-хлорфенолу+2 ГДК "Бульдог"	21±3	токсичний
15	Пюре з кабачків із додаванням 2 ГДК Pb^{2+} +0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	65±3	слабо токсичний
	Пюре з кабачків із додаванням 1,5 ГДК о-хлорфенолу+1ГДК Pb^{2+}	35±3	токсичний
16	Сік зі слив із додаванням 1 ГДК Cd^{2+} +1 ГДК о-хлорфенолу	60±3	слабо токсичний
	Сік зі слив із додаванням 1 ГДК "Децис"+1 ГДК "Тілт"	29±3	токсичний

Примітка: ГДК Pb^{2+} =0,5 мг/дм³ ГДК Cd^{2+} =0,03 мг/дм³
 ГДК о-хлорфенолу =0,1 мг/дм³;
 ГДК інсектициду "Бульдог"=0,0002 мг/см³
 ГДК фунгіциду "Тілт"=0,0001 мг/см³
 ГДК інсектициду "Децис"=0,0001 мг/см³

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб одержання флуоресцентного біосенсора для визначення токсичних речовин, що включає вирощування біомаси клітин фотобактерій, відокремлення центрифугуванням, змішування клітин фотобактерій з розчином полівінілового спирту, приготованого на живильному середовищі Фаргалі і наступне формування іммобілізату, який **відрізняється** тим, що до суміші клітин фотобактерій з розчином полівінілового спирту, приготованого на живильному середовищі Фаргалі додають модифікатор, а іммобілізацію здійснюють при

співвідношенні полівініловий спирт:маса клітин фотобактерій:модифікатор рівному (5-16):(0,1-10,0):(0,1-5,0), відповідно.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як модифікатор використовують гліцерин або ксиліт, або гліцид.

5 3. Спосіб за п. 1, 2, який **відрізняється** тим, що до суміші клітин фотобактерій, полівінілового спирту, приготованого на живильному середовищі Фаргалі, і модифікатора додають антиоксидант в кількості 0,1-5,0 мас. %.

4. Спосіб за п. 1, 2, 3, який **відрізняється** тим, що як антиоксидант використовують аскорутин або кверцетин, або аскорбінову кислоту.

10

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601