



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97836** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
G01N 33/02 (2006.01)
C12N 11/00
C12N 11/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 10600	(72) Винахідник(и): Пилипенко Людмила Миколаївна (UA), Пилипенко Інна Василівна (UA), Данилова Олена Іванівна (UA), Гайдукевич Діана Казимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 29.09.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2015, Бюл.№ 7	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНИХ РЕЧОВИН В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

(57) Реферат:

Спосіб одержання флуоресцентного біосенсора для визначення токсичних речовин в харчових продуктах передбачає іммобілізацію чутливих органічних структур з полівініловим спиртом і наступне формування іммобілізату. Як чуттєві органічні структури використовують хлоропласти або клітини зеленої маси рослин, що містять хлорофіл у кількості 0,70-2,00 мг/г, при цьому спочатку водний розчин полівінілового спирту змішують з модифікатором, після чого до отриманої суміші додають чутливі органічні структури, а іммобілізацію здійснюють за наступним співвідношенням компонентів полівініловий спирт:чутливі органічні структури:модифікатор рівним (5-16):(5,0-40,0):(0,1-10,0) відповідно.

UA 97836 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 передбачає 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 C12N11/04, C12Q1/02, C12Q1/66). 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 вибрано прототипом.

Прототип і корисна модель, що заявляється, мають такі спільні ознаки: іммобілізація чутливих органічних структур з полівініловим спиртом; формування іммобілізату.

Але спосіб за прототипом 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;

отримання біосенсора вимагає наявності живильного середовища для підтримання біосенсора в живому стані.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб одержання флуоресцентного біосенсора для визначення токсичних речовин в харчових продуктах, в якому шляхом проведення іммобілізації клітин біосенсора 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 вирішена в способі одержання флуоресцентного біосенсора для визначення токсичних речовин в харчових продуктах, що передбачає іммобілізацію чутливих органічних структур з полівініловим спиртом і наступне формування іммобілізату тим, що як чутливі органічні структури використовують хлоропласти, або клітини зеленої маси рослин, що містять хлорофіл у кількості 0,7-2,0 мг/г зеленої маси, при цьому спочатку водний розчин полівінілового спирту змішують з модифікатором, після чого до отриманої суміші додають чутливі органічні структури, а іммобілізацію здійснюють за наступним співвідношенням компонентів полівініловий спирт:чутливі органічні структури:модифікатор рівним (5-16) : (5,0-40,0) : (0,1-10,0) відповідно.

Як модифікатор використовують гліцерин або ксиліт, або гліцид.

До суміші водного розчину полівінілового спирту, чутливих органічних структур (хлоропластів, або клітин зеленої маси рослин) і модифікатора додають 0,1-5,0 мас. % антиоксиданту.

Як антиоксидант використовують аскорутин або кверцетин, або аскорбінову кислоту.

Нижня межа концентрації біомаси клітин, що заявляється, у складі заявлюваної композиції визначається необхідним рівнем люмінесценції, що забезпечує тривале використання біотестора для визначення токсикантів. При використанні меншої ніж 5,0 % за масою концентрації компонентів біосенсора (хлоропластів, або клітин зеленої маси рослин) отримуваний іммобілізований біотестер має помітно менший рівень люмінесценції, що призводить до зменшення точності досліджень, а верхня межа концентрації клітин у композиції визначається тим, що при використанні концентрації, що перевищує 40,0 %, 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 заявлених ознак можна пояснити наступним.

Технічним результатом даного способу є:

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

- 10 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, напівсфер, плівок, трубок, листків, часток неправильної форми тощо.

- 15 Визначення токсикантів за допомогою біосенсора здійснюється за допомогою фотоприймачів, які функціонують в струмовому режимі, при цьому визначають зміни рівня люмінесценції іммобілізованих біоматеріалів (хлоропластів, або клітин зеленої маси рослин) після їх експонування в середовищі, в якому наявні різні токсиканти.

- 20 Зазвичай при визначенні флуоресценції хлорофілу використовують два максимуми поглинання: при $\lambda_1=430-460$ нм і $\lambda_2=660-690$ нм, але більш інтенсивний максимум λ_2 дає стабільні значення при повторних замірах, тому визначення флуоресценції здійснювали саме при $\lambda=640-690$ 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.

- 25 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.

- 30 Біосенсор зберігають в холодильнику (при температурі від +4 до + 8 °C) в сухому вигляді або у фосфатно-цитратному буферному розчині (рН=6,0).

Для визначення флуоресценції біосенсор у вигляді кружків плівки у кількості 5 штук занурювали в 80 % водний розчин ацетону, визначали люмінесценцію хлорофілу при фотозбудженні з використанням ртутно-кварцової лампи в максимумі поглинання $\lambda=680$ нм. Визначали інтенсивність флуоресценції, яку в подальшому приймали за 100 %.

- 35 Вплив токсикантів визначали після занурення плівки з іммобілізованими хлоропластами в модельні розчини із токсикантів. Токсичним вважається модель, в якій інтенсивність флуоресценції менше, ніж 50 % від контролю. Приклади розрахунків наведені в табл. 2.

Здійснення заявляемого способу пояснюється наступними прикладами.

- 40 Приклад 1. Для приготування біосенсора до 20 см 15 % водного розчину ПВС (молярна маса 70000-100000) додавали 0,15 см³ гліцерину при постійному перемішуванні. Перемішування проводили при 40 °C на водяній бані.

- 45 Для іммобілізації хлоропластів розчин ПВС з гліцериним охолоджували до кімнатної температури, відбирали необхідну кількість мікропіпеткою і додавали в нього 10 % подрібненої зеленої маси листків петрушки, яка містила 1,07 мг/г хлорофілу, суміш переносили в чашку Петрі і висушували при 20±2 °C.

З отриманої плівки завтовшки 0,2-0,5 мм вирізували рецепторні елементи розміром 10×3 мм, які зберігали в холодильнику (+4 °C) в сухому вигляді.

Результати дослідження впливу токсикантів наведені в табл.3.

- 50 Приклади 2-7 здійснювали аналогічно прикладу 1, але використовували різні види чутливих органічних структур, різні концентрації розчину полівінілового спирту, модифікатора і антиоксиданту. Дані наведені в табл. 1.

Результати впливу токсикантів після занурення плівки з біосенсором в модельні розчини із введенням токсикантів або без них представлені в табл.3.

Таблиця 1

Склад іммобілізаційної композиції з чутливими органічними структурами для виготовлення плівки, (масова частка, %)								
№ з/п прикладі в	Зразок із вмістом хлорофілу	полівінілов ий спирт	модифікатор			антиоксидант		
			гліцери н	ксиліт	Гліци д	аскорут ин	кверцет ин	аскорбін ова кислота
1	подрібнена зелена маса листіків петрушки, із вмістом хлорофілу 1,07 мг/г	14	0,3	-	-	-	-	-
2	подрібненої зеленої маси листіків салату із вмістом хлорофілу 0,70 мг/г	5	3,0	-	-	-	-	-
3	подрібнена зелена маса листіків петрушки, із вмістом хлорофілу 1,07 мг/г	10	-	3,0	-	-	-	-
4	суспензія виділеного із петрушки хлорофілу із вмістом 1,5 мг/см ³	14	-	-	3,0	-	-	-
5	суспензія виділеного із кропу хлорофілу із вмістом 2,0 мг/см ³	5	0,1	-	-	5,0	-	-
6	подрібнена зелена маса листіків кропиви із вмістом хлорофілу 2,00 мг/г	12	3,0	-	-	-	0,5	-
7	хлоропласти, виділені із шпинату із вмістом хлорофілу 2,00 мг/см ³	16	10	-	-	-	-	0,1

Таблиця 2

Вплив модельних розчинів токсикантів на визначення інтенсивності флуоресценції при $\lambda=640$ нм

Досліджуваний зразок	Результати аналізу			
	Оптична щільність початкова	Оптична щільність через 30 хв.	Різниця оптичної щільності, Δ	залишкова люмінесценція , I, %
Вода	0,077	0,077	0	0
Вода з додаванням 1 ГДК Cd^{2+}	0,077	0,075	0,002	97,4
Вода із додаванням 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	0,077	0,065	0,012	84,4
Вода з додаванням 4 ГДК Pb^{2+}	0,076	0,063	0,012	82,9
Вода з додаванням 2 ГДК о- хлорфенолу	0,075	0,056	0,019	74,7
Вода із додаванням інсектициду 2 ГДК "Децис"	0,076	0,041	0,035	53,9
Вода із додаванням інсектициду 1 ГДК "Тілт"	0,074	0,050	0,024	67,6
Вода із додаванням 1 ГДК інсектициду "Бульдог"	0,076	0,030	0,046	39,5

Таблиця 3

Результати дослідження впливу зразків на зміни ΔI

№ біосенсора за прикладом	Досліджуваний зразок	Результати аналізу	
		залишкова люмінесценція, %	оцінка токсичності
1	Сік зі слив	95±3	нетоксичний
	Морква з додаванням 2 ГДК Pb^{2+} +0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	55±3	слаботоксичний
	пюре кабачків із додаванням 0,5 ГДК о-хлорфенолу+1 ГДК інсектициду "Бульдог"	43±2	токсичний
2	Картопля свіжа подрібнена	93±2	нетоксичний
	Сік із слив із додаванням 2 ГДК Cd^{2+} +0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	56±3	слаботоксичний
	Картопля свіжа подрібнена із додаванням 0,5 ГДК о-хлорфенолу+0,3 ГДК "Децис"+0,3 ГДК "Тілт"	54±3	слаботоксичний
	Сік зі слив із додаванням 2 ГДК Cd^{2+} +0,5 ГДК о-хлорфенолу	43±3	токсичний
	Вода з додаванням 1 ГДК о-хлорфенолу+0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	33±2	токсичний
3	Морква свіжа подрібнена	97±3	нетоксичний
	Морква свіжа подрібнена з додаванням 0,7 ГДК "Децис"+0,7 ГДК "Тілт"	51±3	слаботоксичний
	Пюре із кабачків із додаванням 2 ГДК інсектициду "Бульдог"	27±3	токсичний
4	Пюре з кабачків	95±3	нетоксичний
	Пюре з кабачків із додаванням 1 ГДК Cd^{2+} + 0,3 ГДК "Децис"+0,3 ГДК "Тілт"	57±3	слаботоксичний
	Пюре з кабачків із додаванням 0,5 ГДК о-хлорфенолу + 0,5 ГДК "Децис"+0,5 ГДК "Тілт"	38±3	токсичний
5	Сік із слив із додаванням 0,3 ГДК інсектициду "Бульдог"	90±2	нетоксичний
	Вода із додаванням 1 ГДК о-хлорфенолу	64±3	слаботоксичний
	пюре кабачків з додаванням 1 ГДК о-хлорфенолу+1 ГДК Pb^{2+}	41±2	токсичний
6	Сік із слив із додаванням 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	86±2	нетоксичний
	Сік із слив із додаванням інсектициду 2 ГДК "Децис"	56±2	слаботоксичний
7	Сік із слив із додаванням 2 ГДК Pb^{2+} + 1 ГДК інсектициду "Бульдог"	29±3	токсичний
	Сік із слив із додаванням 1 ГДК Cd^{2+}	95±3	нетоксичний
	Сік із слив із додаванням інсектициду 1 ГДК "Тілт"	71±3	слаботоксичний
	Сік із слив із додаванням 1 ГДК інсектициду "Бульдог"	39±3	токсичний

Примітка:

ГДК Pb^{2+} =0,5 мг/дм³ГДК Cd^{2+} =0,03 мг/дм³ГДК о-хлорфенолу=0,1 мг/дм³;ГДК інсектициду "Бульдог"=0,0002 мг/см³

ГДК фунгіциду "Тілт"=0,0001 мг/см

ГДК інсектициду "Децис"=0,0001 мг/см³

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 1. Спосіб одержання флуоресцентного біосенсора для визначення токсичних речовин в харчових продуктах, що передбачає іммобілізацію чутливих органічних структур з полівініловим спиртом і наступне формування іммобілізату, який **відрізняється** тим, що як чутливі органічні структури використовують хлоропласти або клітини зеленої маси рослин, що містять хлорофіл у кількості 0,70-2,00 мг/г, при цьому спочатку водний розчин полівінілового спирту змішують з модифікатором, після чого до отриманої суміші додають чутливі органічні структури, а
- 10 іммобілізацію здійснюють за наступним співвідношенням компонентів: полівініловий спирт:чутливі органічні структури:модифікатор рівним (5-16):5,0-40,0):(0,1-10,0), відповідно.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як модифікатор використовують гліцерин або ксиліт, або гліцид.
- 15 3. Спосіб за пп. 1, 2, який **відрізняється** тим, що до суміші водного розчину полівінілового спирту, чутливих органічних структур (хлорофілу, хлоропластів, клітин зеленої маси рослин) і модифікатора додають 0,1-5,0 мас. % антиоксиданту.
4. Спосіб за пп. 1, 2, 3, який **відрізняється** тим, що як антиоксидант використовують аскорутин або кверцетин, або аскорбінову кислоту.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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

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