



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 95345

(13) U

(51) МПК

C12N 11/04 (2006.01)

C12P 7/56 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2014 06031	(72) Винахідник(и):	Пилипенко Людмила Миколаївна (UA), Пилипенко Інна Василівна (UA), Данилова Олена Іванівна (UA), Гайдукевич Діана Казимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	02.06.2014	(73) Власник(и):	ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.12.2014		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.12.2014, Бюл.№ 24		

(54) КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ТОКСИЧНИХ РЕЧОВИН В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

(57) Реферат:

Композиція для визначення вмісту токсичних речовин в харчових продуктах містить полівініловий спирт, модифікатор і воду. Вона додатково містить біосенсор, при цьому як модифікатор композиція містить багатоатомний спирт або антиоксидант, або пероксид водню.

UA 95345 U

Корисна модель стосується біотехнології і біохімії та може бути використана для визначення вмісту токсичних речовин у харчових продуктах біологічним методом.

Відома полімерна композиція для іммобілізації мікроорганізмів на основі кріогелю полівінілового спирту (ПВС). Кріогелі ПВС утворюються при заморожуванні 10-20 % водних розчинів при - 20-30 °С впродовж 10-24 годин і наступному відтаюванні при 4-20 °С. [див. патент РФ №2253677, МПК⁷ C12N 11/04, C12P 7/56]. Іммобілізований біокатализатор, спосіб його отримання і спосіб отримання молочної кислоти з використанням цього біокатализатора передбачає використання як матриці кріогелю на основі полімеру, вибраного з групи: полівініловий спирт, полігалактоманнан, амілолітично стійкий крохмаль, желатина, при співвідношенні вихідних компонентів, %: біомаса мікроорганізмів на суху речовину (0,04-4,0), полімер - 2-15 %, вода або водний буфер - до 100. Отримання біокатализатора здійснюють із включенням біомаси в матрицю кріогелю з наступною обробкою іммобілізованих клітин інкубуванням при температурі 28-45 °С протягом 10-200 годин в середовищі, що підвищує лактатдегідрогеназну активність іммобілізованої біомаси. В результаті отримуємо стійкий високо пористий носій, що надійно утримує іммобілізовану біомасу, забезпечує її високу біоактивність. Іммобілізовані в цій композиції мікроорганізми мало придатні для застосування як рецепторних елементів біосенсорних аналізаторів, оскільки у вигляді тонких плівок кріогель ПВС має дуже низьку механічну міцність.

Найбільш близькою до корисної моделі, що заявляється, є композиція для отримання полімерної плівки для іммобілізації мікроорганізмів у біосенсорних аналізаторах [див. патент РФ № 2461625, МПК⁷ C12N 11/04 (2006.01), C12N 11/08 (2006.01), C08F 216/06 (2006.01), C08F 226/10 (2006.01)]. Композиція складається з ПВС і співполімера N-вінілпіролідону (N-ВП), які розчинені у воді. При цьому вихідні компоненти узяті в молярному співвідношенні ПВС:N-ВП 239:(9,0-56,2). Композиція забезпечує високу чутливість біосенсора при стабільній роботі до 40 діб. Композицію для отримання полімерної плівки отримують з полівінілового спирту, модифікованого N-вінілпіролідонм. Модифікацію проводять в струмі азоту у присутності нітрату церію-амонію як каталізатора при молярному співвідношенні реагентів ПВС:N-ВП:каталізатор - 239:(9,0-56,2):(0,7-6,0). Для приготування рецепторних елементів біосенсора отриманий розчин композиції для отримання полімерної плівки змішують з клітинами бактерій і висушують при 20 °С.

Дана композиція вибрана прототипом.

Прототип і корисна модель, що заявляється, мають такі спільні компоненти:

- полівініловий спирт як полімерна матриця;
- модифікатор (у прототипі це співполімер N-вінілпіролідону).

Але композиція 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;
- рецепторні елементи (біомаса мікроорганізмів) мають невисоку стабільності (40 діб), що обмежує їх застосування.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити композицію для визначення вмісту токсичних речовин в харчових продуктах, в якій шляхом введення додаткового компонента забезпечується підвищення ступеня іммобілізації рецепторних компонентів, що підвищує чутливість аналізу з її використанням і достовірність результатів та спрощення технології приготування композиції.

Поставлена задача вирішена запропонованим складом композиції для визначення вмісту токсичних речовин в харчових продуктах, що містить полівініловий спирт, модифікатор і воду тим, що вона додатково містить біосенсор, а як модифікатор композиція містить багатоатомний спирт або антиоксидант або пероксид водню, за наступним співвідношенням вказаних компонентів, мас. %:

полівініловий спирт	5-16
модифікатор	0,5-2,0
біосенсор	5,0-40,0
вода	решта.

Окрім того, як біосенсор композиція містить подрібнену масу зеленого листа, або витяжку хлорофілу, або субклітинні структури - хлоропласти, як багатоатомний спирт вона містить гліцерин, або ксиліт, або гліцид, а як антиоксидант - аскорутин, або кверцетин, або аскорбінову кислоту.

При приготуванні композиції з іммобілізованими природними компонентами (елементами тканин, наприклад, хлоропластами) з використанням складу, що пропонується для отримання полімерної плівки 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 описаної композиції полімерні тонкі плівки з іммобілізованими мікроорганізмами або природними компонентами використовують для визначення вмісту токсичних речовин у харчових продуктах біологічним методом.

Нижня межа концентрації біомаси клітин, що заявляється, у складі заявляємої композиції визначається необхідним рівнем люмінесценції, що забезпечує тривале використання біотестора для визначення токсикантів. При використанні меншої ніж 5,0 % за масою концентрації компонентів біосенсору (хлорофілу, хлоропластів, 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.

Застосування гелю ПВС як носія для іммобілізованих клітин обумовлене високою пористістю матриці гелю, що утворюється, забезпечує неускладнену дифузію субстратів і продуктів, відповідно, до і від іммобілізованих клітин, а також хорошими експлуатаційними характеристиками матеріалу такого гелю. Розмір пор носія обумовлюється концентрацією полімеру в суміші з клітинами, а також температурою полімеризації цієї суміші [Лозинский В.І., Дамшкालн Л.Г., Шаскольский Б.Л., Бабусина Т.А., Курочкин И.Н., Курочкин И.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 27. Физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии. // Коллоидн. журн. 69 (6) 798-816 (2007)]. Нижня межа концентрації ПВС, що заявляється, визначається тим, що при масовій частці ПВС, меншій 5 % у складі композиції помітно знижується стійкість плівки до деформаційних навантажень внаслідок збільшення розміру пор в матриці, що формується. Збільшення розміру пор також сприяє виходу частини іммобілізованих клітин з матриці. При концентрації ПВС вище 16 % у складі біомембрани, яка є верхньою межею у корисній моделі, що заявляється, утворюються міцні пружні плівки з дрібнопористою структурою, яка помітно погіршує іммобілізацію природних об'єктів усередині плівки і призводить до зниження максимального рівня люмінесценції.

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.

Максимальна тривалість можливого використання отриманого біотестора для визначення токсикантів складає 2 роки при зберіганні в захищеному від світла місці в стерильній герметичній тарі при температурі $4-10\pm 2$ °C.

Приклад 1

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

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 107 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 або у фосфатно-цитратному буферному розчині (pH=6,0).

Для визначення флуоресценції рецепторні елементи 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 %.

Вплив токсикантів визначали після занурення плівки з іммобілізованими хлоропластами в модельні розчини із додаванням інсектициду "Бульдог". Результати представлені в табл. 1. Токсичним вважається модель, в якій інтенсивність флуоресценції менше, ніж 50 % від контролю.

Приклад 2 здійснювали аналогічно прикладу 1, але брали розчин ПВС із масовою часткою ПВС 10 %, додавали 0,2 см³ гліцерину, після охолодження додавали 20 % подрібненої зеленої маси листків салату із вмістом 101 мг/г хлорофілу, суміш переносили в чашку Петрі і висушували при 22±2 °С. З отриманої плівки завтовшки 0,2-0,5 мм вирізували рецепторні елементи круглої форми діаметром 5 мм, які зберігали в холодильнику (+6 °С) в сухому вигляді або у фосфатно-цитратному буферному розчині (рН=6,0).

Вплив токсикантів визначали після занурення плівки з іммобілізованими хлоропластами в модельні розчини із додаванням солі важкого металу свинцю. Результати представлені в табл. 1.

Приклад 3 здійснювали аналогічно прикладу 1, але брали розчин ПВС із масовою часткою ПВС 12 %, додавали 0,1 г аскорутину, після охолодження додавали 15 % подрібненої зеленої маси листків салату із вмістом 101 мг/г хлорофілу, суміш переносили в чашку Петрі і висушували при 25±2 °С. З отриманої плівки завтовшки 0,2-0,5 мм вирізували рецепторні елементи довільної зручної форми, які зберігали в холодильнику (+8 °С) в сухому вигляді або у фосфатно-цитратному буферному розчині (рН=6,0).

Вплив токсикантів визначали після занурення плівки з іммобілізованими хлоропластами в модельні розчини із додаванням о-хлорфенолу. Результати представлені в табл. 1.

Приклад 4 здійснювали аналогічно прикладу 1, але брали розчин ПВС із масовою часткою ПВС 14 %, додавали 0,1 г кверцетину, після охолодження додавали 10 % хлорофілу, виділеного із зеленої маси листків салату, суміш переносили в чашку Петрі і висушували при 27±2 °С.

Вплив токсикантів визначали після занурення плівки з іммобілізованими хлоропластами в модельні розчини із додаванням інсектициду "Децис". Результати представлені в табл. 1.

Приклад 5 здійснювали аналогічно прикладу 1, але брали розчин ПВС із масовою часткою ПВС 10 %, додавали 0,1 г кверцетину, після охолодження додавали 10 % виділеного із зеленої маси листків салату із хлорофілу, суміш переносили в чашку Петрі і висушували при 15±2 °С.

Вплив токсикантів визначали після занурення плівки з іммобілізованими хлоропластами в модельні розчини із додаванням інсектициду "Тілт". Результати представлені в табл. 1.

Приклад 6 здійснювали аналогічно прикладу 1, але брали 8,5 см розчину ПВС із масовою часткою ПВС 16 %, додавали 0,06 г перекису водню в 1 см³ води, 0,05 мг аскорбінової кислоти в 0,5 см³ води, 20 % зеленої маси листків салату із вмістом 101 мг/г хлорофілу, суміш переносили в чашку Петрі і висушували при 17±2 °С.

Вплив токсикантів визначали після занурення плівки з іммобілізованими хлоропластами в модельні розчини із додаванням солі важкого металу свинцю і інсектициду "Бульдог".

Результати визначення впливу токсикантів на зміни ΔI наведені у табл. 2.

Таблиця 1

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

№ дослідів	Досліджуваний зразок	Результати аналізу			
		Оптична щільність початкова	Оптична щільність через 30 хв	Різниця оптичної щільності, Δ	залишкова люмінесценція, ΔI , %
	Вода	0,077	0,077	0	0
1	Вода із додаванням 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	0,077	0,065	0,012	84,4
2	Вода з додаванням 4 ГДК Рb ²⁺	0,076	0,063	0,012	82,9
3	Вода з додаванням 2 ГДК о-хлорфенолу	0,075	0,056	0,019	74,7
4	Вода із додаванням інсектициду 2 ГДК "Децис"	0,076	0,041	0,035	53,9
5	Вода із додаванням інсектициду 1 ГДК "Тілт"	0,074	0,050	0,024	67,6
6	Вода із додаванням 1 ГДК інсектициду "Бульдог"	0,076	0,030	0,046	39,5

Таблиця 2

Результати дослідження впливу зразків на зміни ΔI

Досліджуваний зразок	Результати аналізу	
	залишкова люмінесценція, %	оцінка токсичності
Вода	91±2	нетоксичний
Сік зі слив	89±2	нетоксичний
Картопля свіжа подрібнена	90±3	нетоксичний
Морква свіжа подрібнена	94±3	нетоксичний
Пюре з кабачків	88±3	нетоксичний
Сік із слив зі додаванням 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	87±3	нетоксичний
Вода із додаванням 0,5 ГДК о-хлорфенолу	78±3	нетоксичний
Сік зі слив із додаванням 2 ГДК Cd^{2+}	62±3	слаботоксичний
Вода з додаванням 1 о-хлорфенолу ГДК + 1 ГДК Pb^{2+} + 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	45±3	токсичний
Морква з додаванням 2 ГДК Pb^{2+} + 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	54±3	слаботоксичний
пюре з кабачків з додаванням 1 ГДК о-хлорфенолу + 0,5 ГДК інсектициду "Бульдог"	37±2	токсичний
пюре з кабачків з додаванням 1 ГДК о-хлорфенолу + 1 ГДК Pb^{2+}	40±3	токсичний
Вода з додаванням по 0,3 ГДК "Децис" та 0,5 ГДК "Тілт"	42±3	токсичний
Сік зі слив із додаванням по 0,3 ГДК "Децис" та 0,5 ГДК "Тілт"	45±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

- 5 1. Композиція для визначення вмісту токсичних речовин в харчових продуктах, що містить полівініловий спирт, модифікатор і воду, яка **відрізняється** тим, що вона додатково містить біосенсор, при цьому як модифікатор композиція містить багатоатомний спирт або антиоксидант, або пероксид водню, за наступним співвідношенням вказаних компонентів, мас. %:
- | | |
|---------------------|----------|
| полівініловий спирт | 5-16 |
| модифікатор | 0,5-2,0 |
| біосенсор | 5,0-40,0 |
| вода | решта. |
- 10 2. Композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що як біосенсор композиція містить подрібнену масу зеленого листа або витяжку хлорофілу, або субклітинні структури - хлоропласти, як багатоатомний спирт вона містить гліцерин або ксиліт, або гліцид, а як антиоксидант - аскорутин або кверцетин, або аскорбінову кислоту.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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