УКРАЇНА **(19) UA** **(11) 106751** **(13) C2**

(51) МПК
C12Q 1/04 (2006.01)
B65D 30/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2011 14460**
(22) Дата подання заявки: **21.04.2010**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.10.2014**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **P200930141**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **07.05.2009**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **ES**
(41) Публікація відомостей про заявку: **12.03.2012, Бюл.№ 5**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.10.2014, Бюл.№ 19**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/ES2010/000176, 21.04.2010**

(72) Винахідник(и):
Нерін де ла Пуерта М. С. Крістіна (ES),
Гутіеррез Бартоломе Лаура (ES),
Санчез Джарабо Крістіна (ES)

(73) Власник(и):
УНІВЕРСІДАД ДЕ ЗАРАГОЗА,
C/Pedro Cerbuna, 12, E-50009 Zaragoza, Spain (ES)

(74) Представник:
Блощинська Олена Олександрівна, реєстр. №153

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
JP 7289290 A, 07.11.1995, abstract
WO 2008026119 A2, 06.03.2008
US 2006134728 A1, 22.06.2006
US 4900681 A, 13.02.1990

UA 106751 C2

(54) УПАКОВКА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

(57) Реферат:

Винахід належить до упаковки, яка виготовлена з прозорого і безбарвного матеріалу, та містить датчик у формі частково полярної адсорбуючої твердої підкладинки, здатної всмоктувати рідину, з поверхневим шаром, який вміщує ванілін, при цьому вказаний датчик прикріплений до внутрішньої сторони упаковки з можливістю виявлення росту вказаних мікроорганізмів без безпосереднього контакту з зазначеними продуктами через газоподібне середовище, тобто парову фазу, усередині упаковки і є видимим ззовні упаковки для відображення присутності мікроорганізмів у запакованих харчових продуктах, фармацевтичних продуктах або косметичних засобах шляхом зміни кольору датчика.

Галузь винаходу

Цей винахід стосується галузі харчової, хіміко-фармацевтичної та косметичної промисловості. Зокрема, він стосується нового матеріалу, який містить тверду підкладинку на основі частково полярного адсорбенту, просочену розчином ваніліну, та його застосування в якості колориметричного датчика для виявлення присутності мікроорганізмів у харчових продуктах, косметичних та лікарських засобах.

Галузь техніки

Щороку до лікарень по всьому світу потрапляє велика кількість осіб із випадками харчових отруєнь внаслідок присутності мікроорганізмів в продуктах.

Частково це пов'язано з тим, що споживачі двадцять першого сторіччя очікують від харчових продуктів високих смакових показників та високої поживності, а також мінімальної переробки, яка не шкодить якості традиційних продуктів. Очевидно, що застосування менш жорстких умов переробки стає причиною підвищених мікробіологічних ризиків, а проблема різноманітних проявів мікробної поведінки стає критичною, оскільки необхідно знати про дійсну імовірність виживання та розвитку залишкових мікробів у будь-якому продукті для того, аби визначити його термін зберігання або мікробіологічні ризики, які б хотів передбачити виробник.

Саме вивчення присутності та поширеності патогенних організмів у харчових продуктах фактично є одним із пріоритетних для Європейського Союзу у контексті безпеки харчових продуктів. Його мета полягає в оцінці ризиків, пов'язаних із харчовими продуктами, а також у розробці мікробіологічних критеріїв та показників безпеки для деяких різновидів харчових продуктів.

На сьогоднішній день на ринку не існує матеріалу, який би містив природні компоненти та який би мав здатність візуально визначати присутність широкого спектру мікроорганізмів в упакованих продуктах. У зв'язку з цим ні споживач, ні роздрібний торгівець, ні дистриб'ютор не можуть визначити, чи уражені запаковані продукти мікроорганізмами. У випадку з патогенними мікроорганізмами така ситуація пов'язана із серйозними ризиками для здоров'я. Для їх контролю необхідно проводити вивчення під мікроскопом та мікробіологічний аналіз або ж висівання в селективному культуральному середовищі, що потребує значних затрат людських та матеріальних ресурсів. Більше того, такі методи деструктивні, а це означає, що аналізований продукт більше не буде реалізуватися в торговій мережі, вони надто затратні щодо часу, так як з моменту висівання до моменту підрахунку мікроорганізмів минає від 2 до 7 днів, незалежно від того, скільки часу потрібно на попереднє насичення. Такі аналізи також тягнуть за собою значні лабораторні витрати. У будь-якому разі такі аналізи зрідка проводять відносно наперед заданого числа відібраних зразків, але у жодному разі їх неможливо провести для всіх одиниць харчової продукції, внаслідок чого завжди існує потенційний ризик мікробного забруднення продукту, що не буде виявлене виробником або кінцевим споживачем. У випадку лікарських засобів ризик значно вищий, так як проблема такого роду виявляється лише тоді, коли здоров'ю вже завдано шкоди і часто непоправної.

Протягом останніх років системи пакування харчових продуктів були удосконалені у відповідь на вимоги споживача щодо тривалості зберігання продукту, збереження його властивостей, свіжості, зовнішнього вигляду і т.д. З іншого боку, сучасні маркетингові стратегії вимагають привабливої упаковки, яка б несла певне повідомлення для споживача, аби переконати його придбати продукт. По-друге, протягом тривалого часу упаковка удосконалювалась у відповідь на разючі зміни у стилі життя, на які мала реагувати пакувальна індустрія.

Упаковка, окрім іншого, має виконувати такі функції:

- утримувати харчовий продукт,
- захищати їжу від фізичного, хімічного та мікробіологічного впливу
- зберігати якість продукту та гарантувати його безпечність для здоров'я,
- запобігати шахрайству/підробкам,
- надавати продукту товарного вигляду,
- демонструвати та ідентифікувати продукт,
- інформувати споживачів про властивості харчового продукту,
- збільшувати термін придатності, і т.д.

Останнім часом із урахуванням попиту споживача сформувались дві нові концепції пакування: активна упаковка і розумна упаковка. Активна та розумна упаковка можуть розцінюватися як наступне покоління у пакуванні харчових продуктів.

Активні матеріали і вироби, що контактують із харчовими продуктами, визначаються Директивою ЄС 1935/2004 як такі, що призначені продовжувати термін зберігання, підтримувати або покращувати стан упакованих харчових продуктів, і які спеціально містять у своєму складі

компоненти, які передають речовини упакованим продуктам або до їх середовища, або які абсорбують речовини, що виділяються упакованими продуктами або їх середовищем. За останні роки було зроблено важливе досягнення у сфері активної упаковки, чому присвячено цілий ряд публікацій (Rodríguez, A., Battle, R., Nerín, C (2007) "The use of natural oils as antimicrobial solutions essential in paper packaging. Part II". "Progress in Organic Coatings 60 (1): 33-38), Rodríguez, A., Nerín, C, and Battle, R (2008). "New cinnamon-based active paper packaging against Rhizopusstolonifer food spoilage." Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (15)), López, P., Sánchez C, Batlle, R, and Nerín, C. (2007b). "Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents." Journal of Agricultural and Food Chemistry 55 (21): 8814-8824) Gutiérrez, L, Sánchez C, Batlle, R.; Nerín, C. (2009). "New antimicrobial active package for bakery products." Trends in Food Science & Technology 20 (2): 92-99.

Щодо розумної упаковки, то цілі такої упаковки відмінні, що виправдовує їх розмежування з огляду на спеціальне призначення. Їх дія робить мрію у світі сучасних споживчих вимог реальністю, так як упаковка сама говорить про якість продукту, який вона містить, або про те, що сталось з продуктом в ході переробки, а отже вона виступає інформатором стосовно можливого псування або розкладу, а також неадекватного зберігання, транспортування або умов реалізації продукту. Відповідно до Директиви 1935/2004 розумна упаковка визначається як матеріали, які контролюють стан упакованих харчових продуктів або їх середовища.

Як "розумні упаковки" розцінюються ті упаковки, в яких використовуються або властивості, або компоненти харчового продукту, або певного пакувального матеріалу в якості індикаторів якості продукту та його історії; до цього часу, по суті, такі індикатори включали індикатори терміну-температури, індикатори мікробіологічної якості, індикатори кисню або діоксиду вуглецю.

Таким чином, розумна упаковка визначається як упаковка, яка моніторить стан упакованого харчового продукту шляхом надання інформації про якість продукту в упаковці під час транспортування та зберігання, при цьому під станом харчового продукту маються на увазі:

- фізіологічні процеси (процес дихання фруктів та свіжих овочів)
- хімічні процеси (ліпідне окиснення)
- фізичні процеси (затвердіння хліба, зневоднення)
- мікробіологічні аспекти (пошкодження мікроорганізмами), і
- зараження (комахами)

Такі упаковки представляють великий інтерес для харчової промисловості, а доказом цього служить той факт, що на сьогодні докладаються значні зусилля до розробки і дослідження цього типу упаковки.

До цієї групи належать упаковки, які містять етикетки, барвники або емалі, що застосовуються як індикатори якості, безпеки або обробки упакованого продукту. В їх основі лежать фізико-хімічні, ензимні реакції або інше, що призводить до зміни кольору у пристрої, таким чином вказуючи на ушкодження або зміни, які мали місце у харчовому продукті.

Таким чином, можливість використання взаємодії між продуктом та упаковкою в позитивному аспекті починає знаходити застосування, а саме завдяки блокуванню або інгібуванню факторів, що зумовлюють псування харчових продуктів.

Багато з існуючих смарт-індикаторів знаходять активне застосування у пакувальній промисловості, а саме індикатори часу-температури, індикатори цілісності упаковки, мікробного росту, автентичності упаковки і т.д. Деякі з цих упаковок представляють собою спеціалізовані патентовані системи, але лише деякі з них знайшли комерційне застосування, найпоширенішими з яких є індикатори часу-температури.

Існує досить мало джерел, що описують розробку розумних упаковок, які здатні швидко та ефективно виявляти присутність мікроорганізмів у харчових продуктах на момент придбання або споживання таких продуктів. Беручи до уваги, що споживання зіпсованих з мікробіологічної точки зору харчових продуктів є однією з основних причин проблем зі здоров'ям (харчового отруєння), важливо виявляти заздалегідь, тобто до споживання, заражені упаковані продукти. Так, продавець зможе своєчасно вилучати їх, а споживач уникне споживання таких продуктів, не піддаючи ризику власне здоров'я.

Розробки, описані стосовно цього типу розумної упаковки, вимагають прямого контакту мікроорганізму із датчиком, який виконує функції розумної упаковки, як описано у патентах EP1326653, WO03093784, WO2008026119, (Kimberly-Clark Worldwide, INC), в якій використовується хромогенний детектор, або WO0013009, (Johnson Matthey Public Limited Company), в якій в якості реагуючих підкладинок застосовуються комплекси металів. Відповідно до публікації Desbordes, J: CONIVE, L Prevot.A. Annales Francaises Pharmaceutiques 1972, 30 (7-8), 507-518 реакцію ваніліну у забарвленому середовищі сірчаної і фосфорної кислоти

застосовують для виявлення присутності ліпідів у бактеріальних дослідженнях, і, зрештою, для виявлення жирних кислот з допомогою тонкошарової та газової хроматографії. Знову таки, відповідно до цієї розробки з метою ініціювання реакції потрібен прямий контакт бактерії та реагенту. Крім того, з виробничої точки зору цей різновид датчиків є досить складним, що ускладнює їх виробництво у комерційному масштабі. Крім того, складним є механізм ініціювання реакції, який спочатку вимагає отримання забарвленої сполуки, забарвлення якої зникне після контакту з мікроорганізмами. Крім того, сполуки, що використовуються як хромогени, є хімічними сполуками, які у деяких випадках вимагають спеціальних умов, таких як підкислення або присутність складних хімічних сполук, необхідних для того, щоб реакція відбулась, причому деякі з таких сполук на сьогодні не допускаються до контакту з харчовими продуктами або мають ряд обмежень щодо їх концентрацій. У будь-якому випадку, природні сполуки використовуються як основні хромогенні сполуки, меншою мірою використовуються сполуки, які є прийнятними харчовими добавками, у зв'язку з технологічними перевагами та безпечністю для здоров'я.

З огляду на недоліки описаних упаковок автори цього винаходу в результаті глибокого дослідження розробили новий матеріал, який містить тверду підкладинку із частково полярного адсорбенту, просочену розчином ваніліну, який може використовуватись в якості колориметричного датчика для виявлення мікроорганізмів в упакованих продуктах різної природи.

Перевагою такого рішення є те, що ванілін (3-метокси-4-гідроксибензальдегід), який є дозволеною харчовою добавкою, здатен виявляти ріст мікроорганізмів завдяки простій та легко ідентифікованій хромогенній реакції. Він також діє на датчик, не взаємодіючи напряму із харчовим продуктом або упакованим продуктом, проте для того, щоб така реакція відбулась, необхідна невисока концентрація вологи у паровій фазі.

Ванілін є природною сполукою, яка входить до складу багатьох рослин, зокрема до складу ванільної палички. У промисловості цю сполуку отримують з евгенолу, який є основним складником гвоздичного олії. Його також отримують шляхом окиснення лігніну, комплексного полімеру, який міститься у деревині.

Ванілін широко застосовують як смакову добавку в харчових продуктах, зокрема в кондитерських виробах. Він також використовується у фармацевтичній промисловості в якості стимулятора шлункової діяльності та у парфумерній промисловості.

Рівень техніки включає деякі

Джерела інформації:, в яких також згадується застосування ваніліну в якості прекурсору для інших реагентів, але вказується на те, що його синтез займає багато часу, а сам він має змішуватись із розчинниками, такими як етанол, і реагентами, такими як концентрована соляна кислота, піперидин, йодистий метил або інші. Наприклад, відповідно до WO2008026119 ванілін не є основним складником матеріалу згідно з винаходом, але він вимагає присутності іншої сполуки в реакційній суміші для досягнення зміни кольору.

Відповідно до інших способів, застосування ваніліну як засобу виявлення присутності мікроорганізмів вимагає сильного підкислення середовища з допомогою HCI, із недоліками, які з цим пов'язані, і, крім того, такі способи роблять можливим виявлення присутності тих мікроорганізмів, які здатні виробляти індол. Так, у документі Ferlin, H.J. and Karabiner (J.V. Euclides 1954, 14, 345-353) описане середовище, яке містить триптофан як джерело для виділення E. coli та P. vulgaris із сумішей на основі відмінностей у виробленні індолу з триптофану. Разом з тим, авторами також було отримано реагент для проведення індольного тесту. У таких умовах ними використовувався 0.25 % розчин ванілі у концентрованій соляній кислоті із одержанням фіолетового кольору з індолом за рахунок прямого контакту у рідкій фазі. Тобто у такому розчині мали бути виявлені мікроорганізми, які виробляють індол, так як вироблення індолу запускає хромогенну реакцію.

З огляду на ці недоліки, однією з основних переваг даного винаходу є застосування нешкідливої природної сполуки, харчової добавки, такої як ванілін, та здатність виявляти присутність мікроорганізмів без потреби у прямій взаємодії мікроорганізмів і пакувального матеріалу.

Застосування такого винаходу покликане вирішити проблему, з якою пов'язані значні ризики для суспільства, а саме присутність патогенних мікроорганізмів у харчових продуктах, косметичних і лікарських засобах та в упакованих продуктах.

Матеріал згідно з винаходом входить до складу пакувального матеріалу для харчових продуктів або будь-яких інших продуктів, чутливих до забруднення мікроорганізмами, завдяки чому внаслідок легко пізнаваної зміни кольору (від безбарвного до пурпурового) споживач має змогу відмовитись від продукту і уникнути споживання або застосування продукту, інфікованого

та забрудненого мікроорганізмами, шкідливими для здоров'я.

З іншого боку, він представляє собою систему, яка має виконувати функції контролю якості упакованих товарів за рахунок своєчасного вилучення забруднених упаковок, запобігаючи доступу до них кінцевого споживача та проблемам і витратам, пов'язаним із можливим поверненням таких неякісних продуктів. Сектори економіки, які будуть задіяні у комерціалізації такого нового пристрою, з одного боку, включають пакувальну промисловість, яка відповідальна за виготовлення та введення в оборот матеріалу, що входить до складу упаковки, і, з іншого боку, харчову, косметичну та фармацевтичну промисловість. Ця галузь має вирішити питання щодо оптимізації розміщення заявленого матеріалу всередині упаковки, враховуючи особливості промислового процесу пакування, з метою забезпечення місцезнаходження, яке б було добре помітним для кінцевого користувача, і яке б забезпечувало уникнення взаємодії із продуктом та створення перешкод для технологічного процесу пакування.

Головною перевагою застосування датчика, такого як датчик згідно з винаходом, є можливість повідомити споживачу про те, що продукт, який він збирається спожити або застосувати, містить мікроорганізми на момент придбання та споживання продукту, внаслідок чого споживач може утриматись від його споживання та відхилити продукт.

Короткий опис креслень

Фігура 1. Застосування сенсорного матеріалу у поліпропіленовій плівці. E. coli culture.

Фігура 2. Застосування сенсорного матеріалу у паперових фільтрах за відсутності мікроорганізмів (порожнє поле), із середовищем культури (ліва колонка) та без середовища культури (права колонка).

Фігура 3. Застосування сенсорного матеріалу в адгезивній паперовій етикетці. Культура E. coli.

Фігура 4. Застосування сенсорного матеріалу у паперових фільтрах в присутності мікроорганізмів (E. coli) або за відсутності мікроорганізмів (порожнє поле). Середовище культури – середовище Мюллера-Хінтона.

Фігура 5. Діаграма днів, необхідних для досягнення забарвлення у іншому середовищі (Мюллер-Хінтон, TSA, ; M.E.A.) для інших мікроорганізмів.

Фігура 6. Нанесення сенсорного матеріалу на паперовий фільтр при різних значеннях pH у культурі без мікроорганізмів, середовище Мюллера-Хінтона.

Фігура 7. Діаграма зміни концентрації ваніліну залежно від часу за a) відсутності мікроорганізмів (порожнє поле); b) Candida albicans; c) Staphylococcus aureus і d) Salmonella cholerasuis.

Задача винаходу

Перш за все, в основу винаходу поставлена задача створення матеріалу, який містить тверду підкладинку на основі частково полярного адсорбенту, просочену розчином, який містить ванілін.

Ще однією задачею винаходу є застосування такого матеріалу в якості колориметричного датчика для візуального виявлення росту мікроорганізмів, де такий датчик не потребує прямої взаємодії з мікроорганізмами або із середовищем, яке їх містить, для того, аби досягти зміни кольору.

Зрештою, ще однією задачею винаходу є застосування ваніліну в якості колориметричного реагенту для візуального виявлення росту мікроорганізмів.

Опис винаходу

Цей винахід стосується нової розумної упаковки, виготовленої на основі нового матеріалу, який робить можливим візуальне виявлення росту мікроорганізмів у продуктах різної природи без прямої взаємодії із такими мікроорганізмами або середовищем, що їх містить.

Таким чином, відповідно до основного аспекту винаходу заявлено матеріал, який містить тверду підкладинку на основі частково полярного адсорбенту, просочену розчином, який містить ванілін.

Вміст ваніліну у композиції такого матеріалу дозволяє виявити ріст мікроорганізмів завдяки простій та легко ідентифікованій хромогенній реакції. Зміна кольору (від безбарвного до пурпурового) в тестових умовах чітко вказує на присутність мікроорганізмів, як в чистих культурах у чашечках Петрі, так і в зразках їжі, таких як, наприклад майонез домашнього приготування, що не містить консервантів, у ліках та косметичних засобах.

Ванілін є природною сполукою, яка вступає в реакцію у присутності мікроорганізмів. За відсутності ваніліну забарвлення в ході реакції не виникає. Така реакція є необоротною, і колір, що утворюється, стає все більш насиченим в міру продовження росту мікробів.

Відповідно до конкретного прикладу реалізації розчин ваніліну містить етанол. Мінімальна концентрація ваніліну, необхідна для візуалізації реакції забарвлення, становить 10 %,

переважно від 10 до 50 % етанолу.

Реакція потребує водного середовища або принаймні вологи для того, щоб забарвлення було помітним, реакція тривала та мала необоротний характер, а отже могла виступати колориметричним детектором. Таким чином, тверда підкладинка має бути виготовлена із частково полярного адсорбуючого матеріалу, здатного утримувати вологу, яку виділяє сама їжа, у паровій фазі, переважно із застосуванням паперу або картону.

У випадку якщо ванілін входить до складу гідрофобного середовища, реакція буде непостійною, так як волога буде конденсуватись на гідрофобній підкладинці і, хоча вона так само буде забарвлюватись, цей стан не буде постійним через краплі роси, що падають під дією сили тяжіння. Відповідно, це не буде необоротна та стійка підкладинка.

Як зазначалося вище, описані ознаки матеріалу згідно з винаходом роблять його придатним для візуального виявлення мікробного росту, а тому відповідно до ще одного ключового аспекту винаходу такий новий матеріал може використовуватись як колориметричний датчик для візуального виявлення присутності мікроорганізмів.

Сенсорна реакція відбувається у паровій фазі, а тому немає потреби у тому, щоб ванілін вступав у взаємодію із самими мікроорганізмами або середовищем, що їх містить. Таким чином, такий датчик і мікроорганізми можуть знаходитись на відстані один від одного, і єдиний контакт, який існуватиме між ними – це контакт через парову фазу.

Той факт, що такий датчик не вимагає прямої взаємодії з організмом створює суттєві переваги та становить важливу відмінність від датчиків, відомих із рівня техніки, оскільки у такий спосіб сполуки, які виділяються мікроорганізмами в результаті їх метаболізму, досягають парової фази і через неї досягають датчика, де відбувається хромогенна реакція. Це робить можливим розміщення датчика на кришці або його наклеювання на упаковку або ж розміщення в якості частини упаковки, але на відстані від продукту. Він також має ті переваги, що за таких умов, а саме дія у паровій фазі, він здатен зреагувати на присутність мікроорганізмів у будь-якій частині продукту, де вони можуть знаходитись, не обмежуючись його окремою фракцією або частиною, на відміну від випадків, коли потрібна пряма взаємодія.

Крім того, той факт, що зміна кольору відбувається внаслідок переносу або дифузії сполук від мікроорганізмів у парову фазу, забезпечує високу чутливість, а це означає, що датчик реагує на появу перших колоній мікроорганізмів у середовищі.

При концентрації мікробів, яка дорівнює або більша, ніж 10 колонієутворюючих одиниць на мл або на мг (КУО/мл, КУО/мг)) їжі, що містить мікроорганізми, такий датчик необоротно змінює колір від безбарвного (або білого за рахунок паперу або твердої підкладинки) до рожево-фіолетового. Інтенсивність забарвлення залежить від концентрації мікроорганізмів.

Такий датчик робить можливою візуальну ідентифікацію росту широкого спектру мікроорганізмів, таких як пліснява, дріжджі і/або бактерії.

Всі мікроорганізми, які виробляють індол в результаті метаболізму, реагують з ваніліном. Крім того, інші організми, які не виробляють індол в ході метаболізму, такі як Salmonella і Pseudomonas spp., також позитивні щодо реакції з ваніліном, завдяки чому реакція не носитиме специфічний характер "індол-ванілін", а буде визначатись як більш загальна реакція "азотовмісні сполуки – ванілін".

Виявлення мікроорганізмів смарт-датчиком або системою згідно з винаходом може здійснюватись в упакованих продуктах. Такий упакований продукт може мати різну природу, переважно він є харчовим продуктом, лікарським або косметичним засобом.

Таким чином, відповідно до конкретного варіанту реалізації розумна система, яка утворена матеріалом, що використовується як датчик, може використовуватись як пакувальний матеріал або наноситися у формі етикетки на паперовій основі, переважно у самоклеючому вигляді, яка розміщується на внутрішній стороні упаковки, яка може бути виготовленою із пластмаси або іншого матеріалу, внаслідок чого вона зазнає дії атмосфери, яка створюється всередині упаковки. Така упаковка має бути виготовлена із прозорого безбарвного матеріалу у цій зоні для того, щоб була видимою зміна кольору, яка має місце у присутності мікроорганізмів.

Зрештою, ще один ключовий аспект винаходу стосується застосування ваніліну в якості колориметричного реагенту для візуального виявлення росту мікроорганізмів у паровій фазі, а саме без прямої взаємодії ваніліну з мікроорганізмами.

Приклади

Була досліджена активність датчика на основі різних підкладинкових матеріалів та в різних експериментальних умовах. Це забезпечило чітке уявлення про роботу датчика на мікроскопічному рівні.

На Фігурі 1 показане застосування поліпропіленової (ПП) плівки, просоченої розчином ваніліну у культурі E.coli. Хоча застосовувана композиція була придатною для такого датчика,

зміни кольору не спостерігалось. Причиною відсутності реакції (зміни кольору) є те, що матеріал не абсорбував вологу або сполуки, або ж так само реакція із композицією, що містить ванілін, не підтримувалась на підкладинці, так як проходила вона у неполярному середовищі, яким був просочений поліпропілен (ПП). Насправді, мав місце забарвлений ореол, що покривав ПП, але поступово він конденсувався і відпав від плівки, тому неполярна або адсорбуюча підкладинка є непридатною для використання в якості підкладинки для датчика.

На Фігурі 2 показано, що порожні тести (відсутні мікроорганізми) проводили із використанням декількох паперових підкладинкових фільтрів, просочених розчином ваніліну у присутності середовища культури (ліва колонка) та за відсутності середовища культури (права колонка). Було показано, що за відсутності мікроорганізмів наявність середовища культури не є достатньою умовою для реакції.

На Фігурі 3 показане нанесення сенсорного матеріалу згідно з винаходом на етикетку, яка самостійно приклеюється, для виявлення присутності мікроорганізмів у культурі E. coli, внаслідок чого спостерігалась зміна кольору датчика.

На Фігурі 4 показане нанесення сенсорного матеріалу на декілька паперових фільтрів у різних культурах E. coli і у порожній культурі, тобто без мікроорганізмів. У якості середовища культури використовували середовище Мюллера-Хінтона. Спостерігалось, що забарвлення мало місце в усіх культурах E. coli, тоді як забарвлення було відсутнє лише у порожній культурі.

З метою розширення дослідження оцінювали поведінку матеріалу згідно з винаходом відносно широкого спектру мікроорганізмів для визначення мінімальної концентрації, необхідної для належної роботи датчика.

Тести проводили з метою оцінки ефективності датчика щодо наступних мікроорганізмів:

ПЛІСНЯВА

- Aspergillus flavus (Іспанська колекція типових культур, CECT, 2687)
- Penicillium roqueforti (Культуральна колекція грибів, IBT, 21319)
- Eurotium repens (IBT 1800)
- Penicillium islandicum (CECT 2762)
- Penicillium ammune (IBT 21314)
- Penicillium expansum
- Penicillium nalgiovensis

ДРІЖДЖІ

- Candida albicans (Американська колекція типових культур, ATCC, 64550)
- Debaryomyces hansenii (CECT 10353)
- Zygosaccharomyces rouxii (CECT 11928)
- Botrytis cinerea

БАКТЕРІЇ

- Enterococcus faecalis (ATCC 29212)
- Listeria monocytogenes (ATCC 7644)
- Bacillus cereus (CECT 495)
- Staphylococcus aureus (ATCC 29213)
- Salmonella choleraesuis (CECT 4000)
- Yersinia enterocolitica (CECT 4315)
- Escherichia coli (ATCC 29252)
- Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

Позитивні реакції спостерігались як серед бактерій, так і серед плісняви та дріжджів. Серед досліджуваних мікроорганізмів, які дали позитивну реакцію, у нижченаведеній таблиці (Таблиця 1) вказані ті мікроорганізми, в яких може бути чітко виражене значення концентрації залежно від концентрації інокульованих мікроорганізмів та часу, необхідного для зміни кольору в датчику.

Таблиця 1

Зміна кольору залежно від концентрації

Бактерія	Число днів інкубації	MCC (КУО на мг/мл)	MCD (КУО на мг/мл)
Bacterium	Incubation days	MCC (cfu per mg/ml)	MCD (cfu per mg/ml)
P. aeruginosa	1	10	10^7
	2	10	10^2
	3	10	10
E. coli	1	10	10^7
	2	10	10^2
	3	10	10
E. faecalis	1	10	10^6
	2	10	10^2
	3	10	10^2
	4	10	10
B. cereus	1	10	10^6
	2	10	10^4
	3	10	10^2
	4	10	10^2
S. aureus	1	10	$>10^7$
	2	10	10^5
	3	10	10^4
	4	10	10^4
Y. enterocolitica	1	10	$>10^7$
	2	10	$>10^7$
	3	10	10^7
	4	10	10^6

MCC: Мінімальна концентрація інокуляту:

MCD: Мінімальна виявлювана концентрація

Дослідження проводили на основі вивчення впливу різного середовища культури на зміну кольору адсорбуючої підкладинки, що містить датчик. Внаслідок потреби в значних ресурсах нами були вибрані два мікроорганізми як представники кожної групи і три генеричних середовища культури, які забезпечують ріст всіх мікроорганізмів, але із різним вмістом протеїнового джерела в якості диференціальної ознаки. Вибрані середовища включали середовище Мюллера-Хінтона (M. H), солодово-пептонний агар (M.E.A.) і T.S.A. (трипсом-соєвий агар). Час дослідження був продовжений до року. У нижченаведених таблицях (2 і 3) узагальнений перелік вибраних мікроорганізмів та середовищ культури. Відмінності у складі середовища культури становлять різні концентрації поживних речовин, що імітує ситуацію з харчовими продуктами, у випадку яких поживність середовища для мікроорганізмів завжди буде різною.

Таблиця 2

Мікроорганізми

ГРУПА	МІКРООРГАНІЗМИ	СЕРЕДОВИЩЕ КУЛЬТУРИ
ГРАМ-ПОЗИТИВНІ	B. cereus і E. faecalis	M.H, M.E.A. і T.S.A.
ГРАМ-НЕГАТИВНІ	P. aeruginosa і S. cholerasuis	M.H, M.E.A. і T.S.A.
ДРІЖДЖІ	C. albicans	M.H, M.E.A. і T.S.A.
ПЛІСНЯВА	A. flavus і P. roqueforti	M.H, M.E.A. і T.S.A.

Таблиця 3

Склад різних середовищ культури, що використовувались у дослідженні

	МЮЛЛЕР-ХІНТОН	T.S.A.	Агар Сабуро з декстрозою	M.E.A.
	Крохмаль 1,5 г.	Хлорид натрію 5 г.	D(+) глюкоза 40 г.	Солодовий екстракт 13 г
	Інфузія яловичини 2 г	Казеїн пептон 15 г	Хлорамфенікол 50 мг	Декстрин 2,5 г.
	Гідролізований казеїн пептон	Соєвий пептон 5 г.	Пептонова суміш 10 г.	Желатиновий пептон 5 г.
		Агар 15 г.	Агар 1 г.	Агар 15 г.
Кінцевий pH	7,2	7,3 +/- 0,2		5,5 +/- 0,2

На діаграмах, наведених на Фігурі 5, показані дні, потрібні для того, щоб фільтр набув кінцевого по суті чорного кольору (пурпуровий або дуже насичений фіолетовий) для різних мікроорганізмів у різних досліджуваних середовищах культури. Поглиблення інтенсивності забарвлення спостерігається залежно від концентрації мікроорганізмів.

На основі цього дослідження було зроблено висновок про те, що середовище культури, в якому відбувається ріст мікроорганізмів, сильно впливає на зміну кольору. Така зміна була більш швидкою у середовищі Мюллера-Хінтона, яке має більш високий вміст азотовмісних сполук. Наступні позиції посідають агарові середовища T.S.A. та M.E.A., в яких така зміна відбувалась значно повільніше.

Основна відмінність між цими середовищами полягає у вмісті азотовмісних сполук. У випадку середовища Мюллера-Хінтона яловичина та казеїн є постачальниками азотовмісних сполук, вітамінів, вуглецю, сірки та амінокислот. У випадку T.S.A. ферментативне перетравлювання сої забезпечує азот, вітаміни і мінерали, тоді як M.E.A. характеризується високим вмістом полісахаридів і в якості єдиного джерела азоту містить пептон у менших кількостях, ніж в інших середовищах. Це позначається на інтенсивності реакції з ваніліном, а отже і на зміні кольору, так як у випадках, коли мікроорганізми ростуть швидко, бо мають більше поживних речовин, реакція відбувається раніше, викликаючи більш ранню і більш інтенсивну зміну кольору в датчику, ніж в інших випадках.

Нами був досліджений механізм реакції, яка мала місце у цьому випадку, і доведено, що мікроорганізми, які виробляють індол в ході їх метаболізму, забезпечували позитивну реакцію, а отже можна було зробити висновок, що сполука забарвлювалась внаслідок хімічної реакції індолу з ваніліном. Проте, мікроорганізми, які не виробляють індол, такі як Salmonella і Pseudomonas spp, також забезпечували позитивну реакцію з ваніліном.

З метою доведення ефективності ваніліну у виявленні мікроорганізмів та виключення припущення, що зміна кольору може бути наслідком зміни рівня pH або внаслідок присутності CO_2, що є продуктом метаболізму мікроорганізмів, проводили додаткові дослідження. У цих дослідженнях нами було вибране середовище Мюллера-Хінтона, оскільки саме воно викликало більш швидку реакцію зміни кольору для всіх випадків.

Вплив CO_2:

Мікроорганізми в процесі росту та дихання виділяють CO_2. Враховуючи кількість та летку природу цієї сполуки, нами вивчався її вплив на колір, якого набували етикетки, просочені ваніліном.

Це досягалось завдяки підготовці планшетів із середовищем культури та етикеток, просочених розчином ваніліну, до аналізу, але за відсутності мікроорганізмів. Інкубацію

здійснювали в анаеробних посудинах в анаеробних та мікроаерофільних умовах, використовуючи саше, що генерують таку атмосферу. Планшети засівали поза посудинами, внаслідок чого до них міг проникнути CO_2.

Тест повторювали тричі, і він показав, що через 50 днів при температурі 37 °С на планшетах з середовищем Мюллера-Хінтона та на фільтрі, що містить ванілін, зміни кольору не спостерігалось.

Внаслідок цього було зроблено висновок, що зміна кольору не викликається присутністю CO_2.

Вплив pH:

Рівень pH середовища змінювали на поверхні. До трьох планшетів додавали оцтову кислоту, а до інших трьох - NaOH, і спостерігали за впливом, який можуть мати ці кислотні або основні сполуки на датчик за відсутності мікроорганізмів. Спостерігалось, що через три місяці зміни кольору не відбулось. При цьому прямий контакт між фільтрами та окиснюючими або лужними агентами був відсутній.

У наступному аналізі кислоту та основу безпосередньо вносили на фільтр, на який попередньо вносили ванілін. В іншому підготовка планшетів була однаковою для всіх випадків без висівання мікроорганізмів. Змін у кольорі також не спостерігалось.

На доповнення до цих аналізів кислоту та основу безпосередньо додавали до етанол-ванільної суміші, а фільтр просочували такою сумішшю і розміщували на планшетах подібно до попередніх тестів.

Через місяць було виявлено, що у жодному з фільтрів не відбулась зміна кольору. Відповідно, ми дійшли висновку, що зміна кольору датчика не є результатом зміни рівня pH. Через три місяці все ще не спостерігалось змін у кольорі.

Проте, коли pH середовища культури змінилось природним шляхом через 5 днів, у зразках, які знаходились у паровій фазі із pH середовищем на рівні 12 і 10, мала місце зміна кольору (Фігура 6).

Ріст мікроорганізмів також викликав зміни у кінцевому рівні pH середовища, при цьому базовий pH становив приблизно 10.

Аналіз сполук, які відповідають за зміну кольору

Зміни у ваніліні та нові сполуки, які утворилися в результаті реакції, аналізували з допомогою хроматографії.

З метою аналізу змін у ваніліні проводили мікроекстрагування у твердій фазі (SPME) та газову хроматографію мас-спектрометрію.

Як видно з Фігури 7, в усіх випадках спостерігалось зниження концентрації ваніліну. Таке зниження було більш сильно виражене відносно S. aureus і S. cholerasuis, які також є мікроорганізмами, які викликають більш швидку та більш сильно виражену зміну кольору. З допомогою цієї методики не було виявлено нових сполук, які відповідають за зміну кольору, що, ймовірно, є наслідком того, що такі сполуки не є леткими. Проте, концентрація ваніліну знижувалась, і це вказувало на те, що реакція ваніліну із сполукою, яку виділять мікроорганізми в ході росту, відбулась, внаслідок чого утворилась сполука, що викликає зміну кольору.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Упаковка для харчових продуктів, фармацевтичних продуктів або косметичних засобів для виявлення росту бактерій, плісняви і дріжджів у харчових продуктах, фармацевтичних продуктах або косметичних засобах, яка **відрізняється** тим, що упаковка виготовлена з прозорого і безбарвного матеріалу та містить датчик у формі частково полярної адсорбуючої твердої підкладинки, здатної всмоктувати рідину, з поверхневим шаром, який вміщує ванілін, при цьому вказаний датчик прикріплений до внутрішньої сторони упаковки з можливістю виявлення росту вказаних мікроорганізмів без безпосереднього контакту з зазначеними продуктами через газоподібне середовище, тобто парову фазу, усередині упаковки і є видимим ззовні упаковки для відображення присутності мікроорганізмів у запакованих харчових продуктах, фармацевтичних продуктах або косметичних засобах шляхом зміни кольору датчика.

2. Упаковка для харчових продуктів, фармацевтичних продуктів або косметичних засобів згідно з п. 1, яка **відрізняється** тим, що поверхневий шар датчика є шаром, просоченим етанолом та принаймні 10 % ваніліну.

3. Упаковка для харчових продуктів, фармацевтичних продуктів або косметичних засобів згідно з п. 1, яка **відрізняється** тим, що поверхневий шар датчика є шаром, просоченим етанолом з ваніліном у концентрації 10 % на 50 % ваніліну.

4. Упаковка для харчових продуктів, фармацевтичних продуктів або косметичних засобів згідно з будь-яким з попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що частково полярний адсорбуючий твердий датчик є папером з клейкою речовиною для прикріплення.

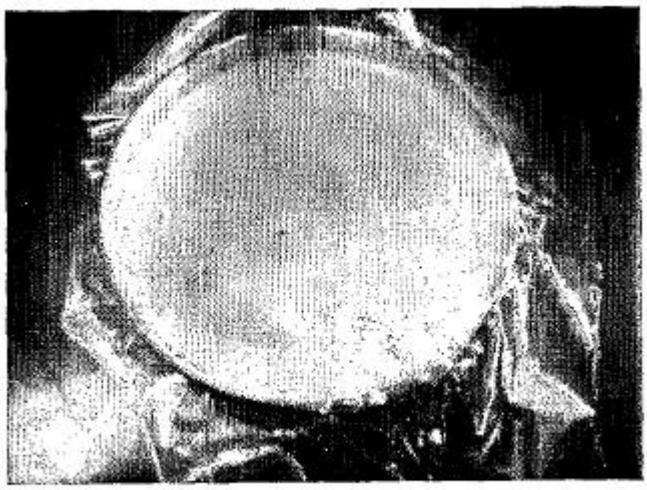
5. Застосування упаковки для харчових продуктів, фармацевтичних продуктів або косметичних засобів згідно з будь-яким з попередніх пунктів для колориметричного візуального виявлення росту мікроорганізмів у харчових продуктах, фармацевтичних продуктах або косметичних засобах у паровій фазі, тобто без безпосереднього контакту між упаковкою і мікроорганізмами, які мають бути виявленими у харчових продуктах, фармацевтичних продуктах або косметичних засобах, де зміна кольору стає помітна візуально ззовні упаковки, коли концентрація мікроорганізмів дорівнює або вища 10 cfu на мл або мг продукту.

6. Застосування упаковки для харчових продуктів, фармацевтичних продуктів або косметичних засобів згідно з п. 5 для виявлення плісняви, дріжджів і/або бактерій у харчових продуктах, фармацевтичних продуктах або косметичних засобах.

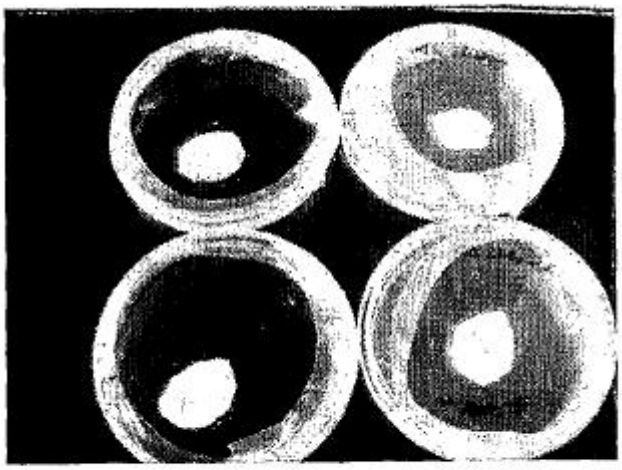
7. Застосування упаковки для харчових продуктів, фармацевтичних продуктів або косметичних засобів згідно з будь-яким з пп. 5 або 6 для виявлення мікроорганізмів у упакованих харчових продуктах, фармацевтичних продуктах або косметичних засобах.

8. Застосування упаковки для харчових продуктів, фармацевтичних продуктів або косметичних засобів згідно з будь-яким з пп. 5-7, яке **відрізняється** тим, що упаковка для харчових продуктів, фармацевтичних продуктів або косметичних засобів, у якій має бути виявлений ріст бактерій, плісняви і дріжджів, є упаковкою згідно з одним з пунктів від 1 до 4.

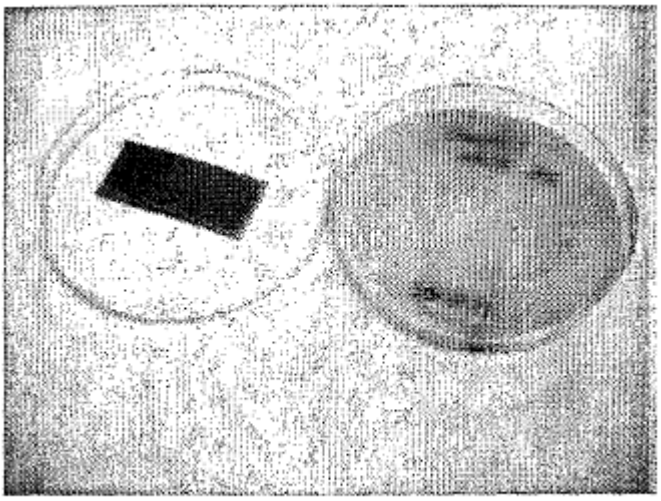
9. Застосування ваніліну як колориметричного реагенту в упаковці для харчових продуктів, фармацевтичних продуктів або косметичних засобів згідно з будь-яким з попередніх пунктів для візуального виявлення росту мікроорганізмів у паровій фазі.



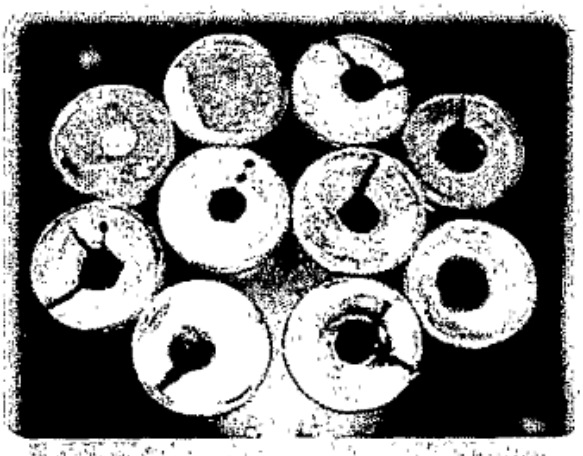
Фіг. 1



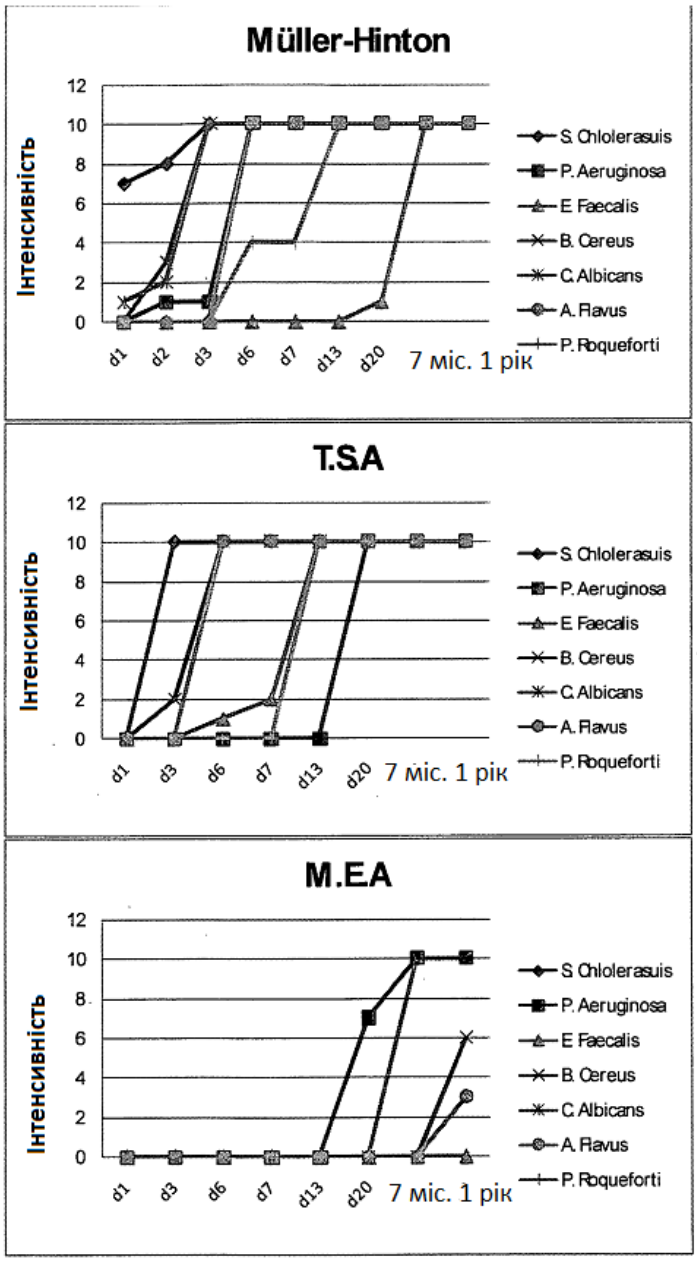
Фіг. 2



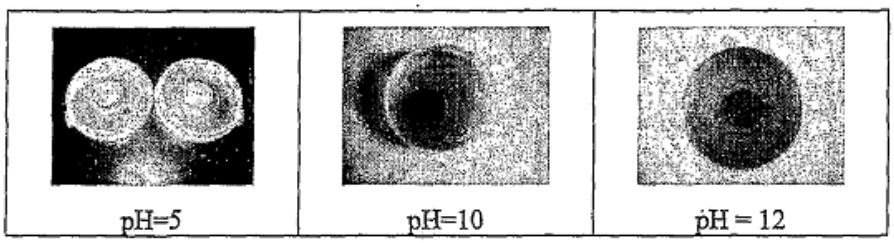
Фіг. 3



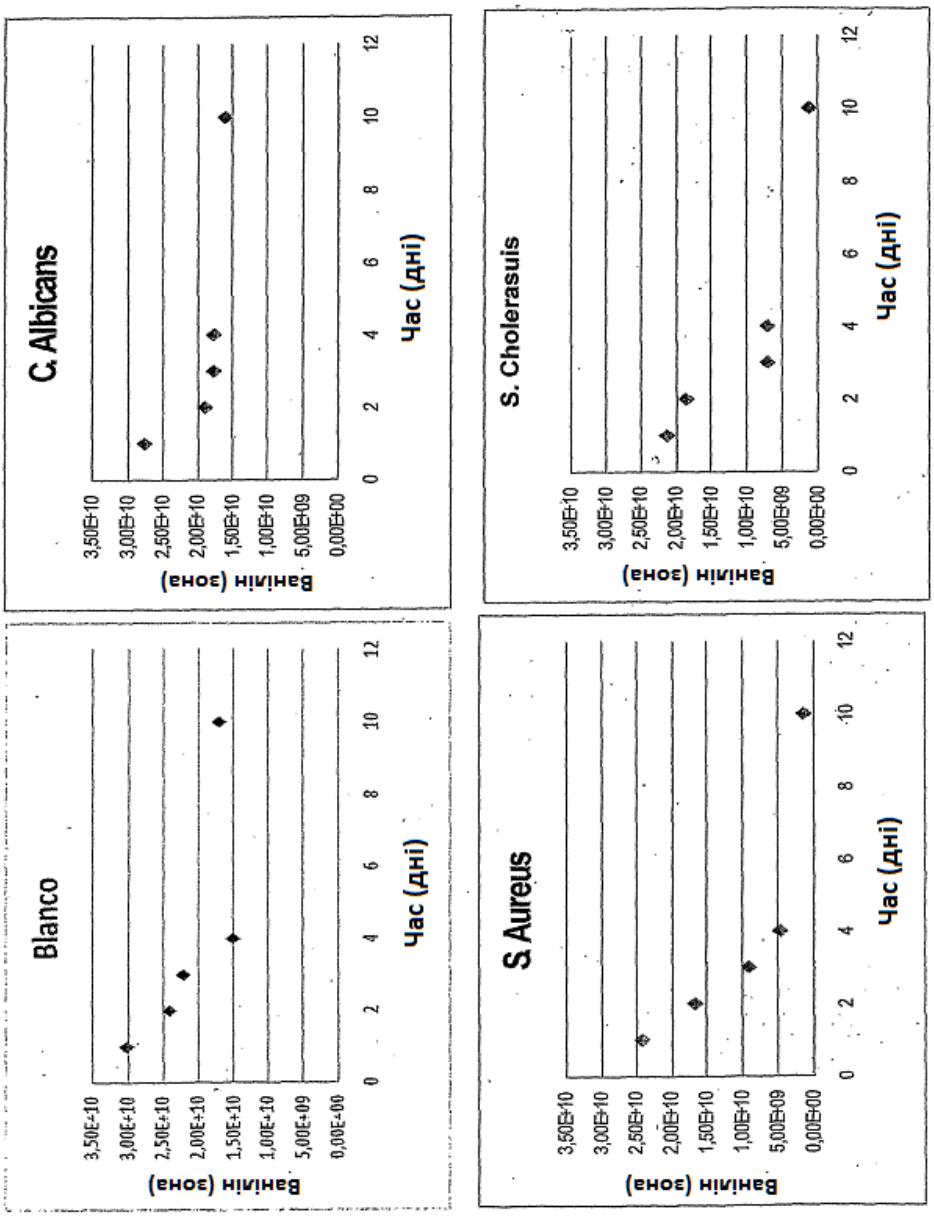
Фіг. 4


Müller-Hinton
Інтенсивність
12
10
8
6
4
2
0
d1
d2
d3
d6
d7
d13
d20
7 міс. 1 рік
S. Chlolerasuis
P. Aeruginosa
E. Faecalis
B. Cereus
C. Albicans
A. Flavus
P. Roqueforti
T.S.A
Інтенсивність
d1
d3
d6
d7
d13
d20
7 міс. 1 рік
M.E.A
Інтенсивність
d1
d3
d6
d7
d13
d20
7 міс. 1 рік

Фіг. 5


pH=5
pH=10
pH = 12

Фіг. 6



Фіг. 7

Комп'ютерна верстка В. 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