



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **96465** (13) **U**

(51) МПК (2015.01)

C12N 11/04 (2006.01)

C12N 11/08 (2006.01)

C12P 7/56 (2006.01)

C08F 216/00

C08F 226/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 08572	(72) Винахідник(и): Пилипенко Людмила Миколаївна (UA), Пилипенко Інна Василівна (UA), Данилова Олена Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 28.07.2014	
(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) КОМПОЗИЦІЯ ІНГРЕДІЄНТІВ ЛЮМІНЕСЦЕНТНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНТАМІНАНТІВ В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

(57) Реферат:

Композиція інгредієнтів люмінесцентного біосенсора для визначення контамінантів в харчових продуктах містить клітини фотобактерій, іммобілізовані в гідрогель полівінілового спирту, живильне середовище і багатоатомний спирт та/або антиоксидант.

U
96465
UA

Корисна модель належить до 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)°C впродовж 10-24 годин і наступному відтаюванні при 4-20 °C. (див. патент РФ № 2461625, МПК C12N 11/04, C12N 11/08, C08F 216/06, C08F 226/10). Композиція складається з полівінілового спирту (ПВС) і співполімеру N-вінілпіролідону (N-ВП). При цьому початкові 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 ПВС, модифікованого N-ВП. 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 °C. Іммобілізовані в цій композиції мікроорганізми мало придатні для застосування як рецепторні елементи біосенсорних аналізаторів, оскільки у вигляді тонких плівок кріогель ПВС має дуже низьку механічну міцність.

Найбільш близьким аналогом до запропонованої корисної моделі є композиція інгредієнтів на основі клітин бактерій, що світяться, іммобілізованих в кріогель ПВС, призначена для визначення токсикантів [див. міжнародна заявка WO/2001/032911 A2 (PCT/GB00/04182), 2001, Toxicity assay using PVA-immobilized luminescent bacteria. C12Q 1/02; C12Q 1/66]. Для отримання такого біокаталізатора клітини *Photobacterium (Vibrio) fischeri* вирощують впродовж 20 год. при 25 °C на середовищі, що містить 5,6 мМ NH₄Cl, 1,2 мМ MgSO₄, 6 мкМ FeCl₃, 10 мМ CaCO₃, 22 мМ KH₂PO₄, 510 мМ NaCl, 110 мМ гліцерофосфат натрію, 0,5 % триптон, 0,25 % дріжджового екстракту [Philp J.C., Balmand S., Hajto E., Bailey M.J., Wiles S., Whiteley A.S., Lilley A.K., Hajto J., Dunbar S.A. (2003) Whole cell immobilized biosensors for toxicity assessment of a wastewater treatment plant treating phenolics-containing waste. // Anal. Chim. Acta, V. 487. - P. 61-74]. Далі клітини центрифугують і отриманий осад змішують в співвідношенні 1:1 (або 1:1-1:0,25) з 14 % (або 8-20 %) розчином ПВС, приготованим на основі фосфатного буфера, що містить 3 % NaCl і 10 % гліцерину. Кінцева концентрація клітин в такій суміші складає 2×10⁹ клітин/см³. Отриману суміш наносять краплинно на поверхню мікробіологічного предметного скла, яке поміщають на поверхню, що обертається, і розкручують впродовж 15-20 секунд із швидкістю 800-1000 об/хв. так, щоб крапля під дією відцентрових сил розтекла по поверхні скла шаром завтовшки 100 мкм (або 20 мкм - 5 мм). Далі скло з краплею на поверхні поміщають в морозильну камеру з температурою - 30-10 °C на 16-48 год., потім переносять для глибшого заморожування при температурі - 40-100 °C, далі розморожують зразок впродовж 30 хв. при кімнатній температурі, щоб в результаті процесу "заморожування-відтавання" сформувати кріогель ПВС з включеними в нього клітинами бактерій за відомою методикою [Лозинский В.И., Дамшкalin Л.Г., Шаскольский Б.Л., Бабушкина Т.А., Курочкин И.Н., Курочкин И.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 27. Физико-химические свойства кріогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии. // Колоидн. журн. – 2007. - № 69 (6). – С. 798-816]. Отримуваний люмінесцентний біокаталізатор є тонкою плівкою гідрогеля з іммобілізованими в ньому клітинами бактерій, що світяться. Щоб досягти рівня люмінесценції, що забезпечує наступне тривале застосування отриманого біокаталізатора, проводять інкубації сформованих плівок з іммобілізованими клітинами після їх розморожування в середовищі, що містить β-гліцерофосфат, або мальтозу, або гліцерин, впродовж 12-27 діб. Максимальна тривалість можливого використання такого активованого біокаталізатора для визначення токсикантів складає 6 місяців (180 діб).

Найближчий аналог і запропонована корисна модель мають наступні спільні ознаки:

- біосенсор - клітини фотобактерій,
- полівініловий спирт,
- живильне середовище,
- додатковий компонент (у найближчого аналога це гліцерин).

Але найближчому аналогу притаманні суттєві недоліки, пов'язані із заморожуванням і розморожуванням мікроорганізмів.

Відомо, що при глибокому заморожуванні біологічних об'єктів можуть відбуватися серйозні, у тому числі безповоротні, ушкодження клітин за рахунок ушкоджень, що викликаються формуванням кристалів льоду як усередині, так і зовні клітин, що супроводжуються їх зневодненням і порушенням бар'єрних властивостей клітинних мембран. Підвищення концентрації електролітів в процесі заморожування призводить до зміни концентрації водневих іонів і порушення рН. В процесі зневоднення вміст солей в клітині досягає гіпертонічної

концентрації, що викликає негативну дію внаслідок порушення білкових структур. Варіювання режимів "заморожування-відтавання" клітин (температура заморожування, температура відтавання, швидкості одного і іншого процесу) може підвищити ефективність результатів кріоконсервації клітин фототрофних мікроорганізмів до 50 %, але втрати залишаються досить

5 значними, тому нами була поставлена задача отримати композицію для іммобілізації клітин фотобактерій без етапу заморожування або ліофілізації.

Окрім того,

- приготування описаної полімерної композиції є трудомістким і вимагає великих часових витрат, застосування спеціальної апаратури.

10 - композиція під час модифікації вимагає отримання кріогелю, що є складним і небезпечним, оскільки передбачає використання рідкого азоту;

- умови заморожування-відтавання суміші клітин з полімером призводять до високої загибелі клітин бактерій (до 50 %), що світяться, при їх іммобілізації, що компенсується розробниками введенням високих концентрацій клітин для забезпечення задовільних рівнів

15 люмінесценції, а також застосуванням у складі 10 % гліцерину, що проявляє властивості кріопротектора;

- вихід клітин з матриці носія, а також загибель клітин в процесі їх іммобілізації зумовлює низький рівень люмінесценції отриманого біокаталізатора, який збільшують до 2500-5500 умовних одиниць за рахунок тривалої (12-27 діб) інкубації іммобілізованих клітин в спеціальних

20 середовищах, що суттєво збільшує термін отримання біокаталізатора;

- високі концентрації розчину полімеру, вживані для формування біокаталізатора забезпечують в процесі заморожування суспензії клітин в розчині ПВС утворення структур з дуже дрібними порами, що формуються кристалами замороженої води, яка входить до складу біокаталізатора. Утворенню дрібних пор сприяє також присутність гліцерину у складі заморожуваної суміші. Дрібнопориста структура полімерної матриці, у свою чергу, створює

25 дифузійні проблеми і істотно погіршує масообмінні процеси для клітин, що призводить до зниження їх люмінесценції і обмежує їх застосування.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити композицію для іммобілізації фотобактерій, в якій за рахунок використання додаткових компонентів - багатоатомних спиртів (гліцерин, ксиліт, сорбіт), антиоксидантів (аскорутин, кверцетин, аскорбінова кислота), за

30 рахунок люмінесценції при збудженні електронів біосенсорів (клітин мікроорганізмів) забезпечується отримання композиції, яка може бути використана як біосенсор для визначення токсичності неорганічних і органічних речовин та/або їх сумішей, при цьому підвищується чутливість методу і достовірність результатів, а також досягається спрощення за рахунок того,

35 що не вимагає використання спеціального складного обладнання.

Поставлена задача вирішується тим, що композиція інгредієнтів люмінесцентного біосенсора для визначення контамінантів в харчових продуктах, що містить клітини фотобактерій іммобілізованих в гідрогель полівінілового спирту, живильне середовище і

40 додатковий компонент, згідно з корисною моделлю, як додатковий компонент композиція містить багатоатомний спирт та/або антиоксидант при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

полівініловий спирт	5,0-16,0
клітини фотобактерій	0,1-10,0
багатоатомний спирт та/або	
антиоксидант	0,1-5,0
живильне середовище	решта.

Як багатоатомний спирт композиція містить ксиліт, або сорбіт, а як антиоксидант - аскорутин, або кверцетин, або аскорбінову кислоту.

Співвідношення компонентів установлене експериментально. Верхні і нижні значення

45 обумовлені наступним.

При концентрації ПВС вище 16 %, при отриманні біосенсора у вигляді гранул або плівки, у ньому утворюються міцні пружні дрібнопористі структури, які можуть погіршувати масообмінні процеси усередині гранул або плівки та призводити до зниження максимального рівня люмінесценції біосенсора. Нижня межа концентрації біомаси клітин, що заявляється, у складі

50 композиції визначається необхідним рівнем люмінесценції, що забезпечує тривале використання біосенсора для визначення токсикантів. При використанні менше 0,10 % концентрації клітин отримуваний іммобілізований біосенсор має помітно менший рівень люмінесценції, а верхня межа концентрації клітин у біосенсорі визначається тим, що при використанні концентрації, що перевищує 10,0 %, відбувається неповне включення усіх клітин,

55 що вводяться в суміш з розчином полімеру, і при використанні може спостерігатися їх

вимивання в середовище для визначення токсикантів, що призводить до значної зміни амплітуди сигналу в процесі багатократної або тривалої експлуатації біосенсора, в результаті знижується точність досліджень. Таким чином, перевищення вказаної верхньої межі концентрації клітин є недоцільним.

5 Отримання клітин бактерій кожної культури, що світяться, перед їх іммобілізацією для приготування біосенсора проводиться із застосуванням відомих біотехнологічних прийомів відповідно до характеристик культур.

В ході обробки отриманому біосенсору можуть бути надані будь-який розмір і будь-яка необхідна форма, зокрема форма півсферичних гранул, часток неправильної форми, блоків
10 гелів, дисків, листів, плівок, трубок та ін. Для цього суспензія клітин в розчині гелеутворювача полімеризується у відповідній формі або форма може бути надана готовій плівці після процесу полімеризації.

Визначення токсикантів за допомогою люмінесцентного біосенсора, що заявляється, на основі іммобілізованих клітин бактерій, що світяться, проводять стандартним шляхом із застосуванням фотоприймачів, що функціонують в струмовому режимі, ґрунтуючись на
15 визначенні зміни рівня люмінесценції іммобілізованих клітин після їх експонування в середовищі, що містить різні токсиканти.

Технічним результатом запропонованої композиції є підвищення основних характеристик, а саме:

20 - композиція забезпечує іммобілізацію фотобактерій у полімерний носій із отриманням тонких, еластичних, не розчинних у воді плівок або гранул з іммобілізованими мікроорганізмами, що можуть бути використані для здійснення біосенсорного аналізу на токсичні речовини;

- для отримання полімерної плівки не потрібно тривале заморожування, що дозволяє спростити процедуру іммобілізації і уникнути втрати чутливості біорецепторних елементів,
25 внаслідок згубної дії низької температури на бактерії при відсутності токсичної дії на мікроорганізми.

Визначення флуоресценції здійснюють при максимумі поглинання: $\lambda = 390-590$ нм.

При використанні як біосенсора культур *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford та *Vibrio fischeri* при зберіганні в захищеному від світла місці в стерильній герметичній тарі при температурі $4-10 \pm 2$ °C гарантоване відтворення результатів культури мікроорганізмів дають 2
30 місяці.

При приготуванні біосенсорів з іммобілізованими мікроорганізмами з використанням композиції для отримання полімерної плівки не потрібно тривале заморожування, що дозволяє спростити процедуру іммобілізації і уникнути втрати чутливості біорецепторних елементів
35 внаслідок згубної дії низької температури на бактерії. Отримані з використанням описаної композиції полімерні тонкі плівки або гранули з іммобілізованими мікроорганізмами використовують для визначення вмісту токсичних речовин у харчових продуктах біологічним методом.

Корисна модель ілюструється наступними прикладами.

40 Приклад 1. Композиція для отримання іммобілізованих клітин бактерій *P. phosphoreum* (Cohn) Ford, що світяться, для визначення токсикантів як люмінесцентна біотестова система.

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 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 г/л $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$, 0,1 г/л $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л пептону і 3 см³ гліцерину, до отримання однорідної маси. Тобто, співвідношення біомаси мікроорганізмів до основи склало 1:35. Цю суспензію далі використовували для отримання плівки іммобілізованого біокаталізатора. Отриману суспензію розподіляли за допомогою дозуючого пристрою (шприц,
45 дозатор та ін.) в чашки Петрі при температурі 20 °C і залишали для полімеризації на 12-14 год. Співвідношення компонентів наведені в таблиці.

Визначали люмінесценцію *P. phosphoreum* (Cohn) Ford в інтервалі поглинання $\lambda = 390-410$ нм. Визначали інтенсивність флуоресценції, яку в подальшому приймали за 100 %. Визначення токсичності проби за допомогою отриманої біотестової системи проводиться по відносній
55 відмінності в інтенсивності біолюмінесценції контрольної і дослідної проб.

Тривалість гарантованого використання отриманого біотестатора з мікроорганізмами для визначення токсикантів складає 2 місяці.

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 біолоюмінесценції, а високі концентрації (більше 2 ГДК) викликали інгібування біолоюмінесценції.

Приклад 2. Здійснювали аналогічно прикладу 1, але брали співвідношення біомаси бактерій до розчину ПВС 1:30, а масова частка ПВС у розчині складала 12 %, вводили додатково 2,7 см³ багатоатомного спирту (гліцерину).

Приклад 3. Здійснювали аналогічно прикладу 1, але брали співвідношення біомаси бактерій до розчину ПВС 1:40, а масова частка ПВС у розчині складала 16 %, вводили додатково 2,7 г багатоатомного спирту (сорбіту).

Приклад 4. Здійснювали аналогічно прикладу 2, масова частка ПВС у розчині була 10 % і додатково у нього вводили 0,1 % аскорутин.

Приклад 5. Здійснювали аналогічно прикладу 1, але брали співвідношення біомаси бактерій до розчину ПВС 1:40, масова частка ПВС у розчині була 14 % і додатково у нього вводили 0,1 % кверцетин.

Приклад 6. Здійснювали аналогічно прикладу 2, але брали співвідношення біомаси бактерій до розчину ПВС 1:10, масова частка ПВС у розчині була 10 % і додатково у нього вводили 0,1 % ксиліт.

Приклад 7. Здійснювали аналогічно прикладу 5, але використовували штам бактерій *Vibrio fischeri*, виділений з риби (кільки чорноморської).

Для виділення штаму біолоюмінесцентних бактерій їх концентрували і потім вирощували на селективних середовищах для бактерій, що світяться (середовище Фаргалі). Виділення біолоюмінесцентних бактерій проводили, візуально аналізуючи наявність біолоюмінесценції. При виявленні люмінесценції виділяли чисту культуру бактерій стандартними методами. Ідентифікація штаму була здійснена на підставі вивчення культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних характеристик відповідно до опису, даного у визначенні бактерій Bergey (Определитель бактерий Берджи. Т.1 / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, С. Уильямса. - М.: Мир, 1997. - 432 с; Краткий определитель бактерий Берги. Под ред. Дж. Хоулта. - М.: Мир, 1980. - 496 с). Культура являє собою рухливі, грамнегативні паличкоподібними клітин із розмірами в межах (1,4-2,6) мкм. Люмінесценцію вивчали при: $\lambda = 570-590$ нм.

Приклад 8. Здійснювали аналогічно прикладу 1, але брали співвідношення біомаси бактерій до розчину ПВС 1:20, масова частка ПВС у розчині була 15 %, додавали 4,2 % гліцерину і додатково у нього вводили 0,5 % аскорбінової кислоти, як біосенсор використовували фотобактерії *Vibrio fischeri*.

Приклад 9. Здійснювали аналогічно прикладу 1, але масова частка ПВС у розчині була 5 %, як біосенсор використовували фотобактерії *Vibrio fischeri* при співвідношенні фотобактерії: гідрогель 1:10.

Солі міді в низьких концентраціях підвищують люмінесценцію штаму в межах 12 %. При концентраціях міді (Cu^{2+}), починаючи з 1 мг/100 г і вище, спостерігається помітне гасіння біолоюмінесценції. Цинк при концентраціях до 2 мг/100 г підвищує інтенсивність біолоюмінесценції на 20-24 %, при збільшенні - починає індукувати. Солі Pb^{2+} при концентраціях до 0,5 мг/дм³ (ГДК) збільшують люмінесценцію на 15 %, а починаючи із 2 ГДК - починають зменшувати її. Інсектицид "Бульдог" при концентраціях до 0,2 мг/дм³ (ГДК) підвищує інтенсивність біолоюмінесценції в середньому на 25 %, при 2 ГДК і більше - зменшує.

Дія фенолу в концентраціях 0,0001-1,0 мг/дм³ в цілому має схожий вплив на інтенсивність світіння штаму. При концентрації фенолу на рівні 0,001-0,01 мг/дм³ (ГДК фенолу 0,001 мг/дм³) світіння штаму *Vibrio fischeri* індукувалося на 25 %. У концентрації 1 мг/дм³ світіння зростало на 38 %.

Таким чином, низькі концентрації токсикантів викликають у бактерій стабільну індукцію біолоюмінесценції. Слід зазначити, що помітна індукція світіння штаму *Vibrio fischeri* (на 20-40 %) спостерігалася на рівні ГДК токсикантів, або значно нижче за ГДК (у 5-10 разів). Вищі концентрації токсикантів викликали інгібування біолоюмінесценції.

Таблиця

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

№ з/п прикладів	полівініловий спирт	багатоатомний спирт	антиоксидант	живильне середовище Фаргалі	суспензія клітини мікроорганізмів із вмістом $1,2 \cdot 10^7 - 1,0 \cdot 10^8$ кл/г	
					Photobacterium	Vibrio
1	8,5	0,3	-	85,4	2,8	-
2	12	3,0	-	81,7	3,3	-
3	16	3,0	-	81,5	2,5	-
4	10	3,0	0,1	83,6	3,3	-
5	14	-	0,1	83,4	2,5	-
6	10	0,1	-	89,8	0,1	-
7	14	-	0,1	83,5	-	2,5
8	15	4,2	0,5	75,3	-	5,0
9	5	0,3	-	84,5	-	10,0

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Композиція інгредієнтів люмінесцентного біосенсора для визначення контамінантів в харчових продуктах, що містить клітини фотобактерій, іммобілізовані в гідрогель полівінілового спирту, живильне середовище і додатковий компонент, яка **відрізняється** тим, що як додатковий компонент вона містить багатоатомний спирт та/або антиоксидант при наступному співвідношенні вказаних компонентів, мас. %:
- полівініловий спирт 5-16
клітини фотобактерій 0,1-10,0
багатоатомний спирт, та/або
антиоксидант 0,1-5,0
живильне середовище решта.
- 10 2. Композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що як багатоатомний спирт вона містить ксиліт або сорбіт.
3. Композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що як антиоксидант вона містить аскорутин, або кверцетин, або аскорбінову кислоту.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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