



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **82926** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
G01N 33/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 00404	(72) Винахідник(и): Пилипенко Людмила Миколаївна (UA), Пилипенко Інна Василівна (UA), Гайдукевич Діана Казимирівна (UA), Данилова Олена Іванівна (UA), Вікуль Світлана Іванівна (UA), Курдова Світлана Георгіївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 11.01.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.08.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.08.2013, Бюл.№ 16	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)

(54) СПОСІБ БІОЛОГІЧНОГО ТЕСТУВАННЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ НА АКРИЛАМІД

(57) Реферат:

Спосіб біологічного тестування харчових продуктів на акриламід включає інкубацію тест-організмів інфузорій, введення їх в розчин досліджуваної речовини, підрахунок кількості тест-організмів у фіксованому об'ємі суміші, внесення в мікроакваріуми добову культуру інфузорії *Stylonichia mytilus* або *Colpoda steinii* і додавання розчину досліджуваної речовини, підрахування початкової чисельності інфузорій, доведення об'єму суміші розчином досліджуваної речовини до половини кожного мікроакваріума, витримання 60 хвилин, після чого вдруге підраховують чисельність інфузорій і по кількості тест-організмів, що вижили, оцінюють кількість та ступінь токсичності акриламіду.

UA 82926 U

Корисна модель належить до галузі аналізу гігієнічної безпеки харчових продуктів і продовольчої сировини, а саме до визначення наявності акриламід у харчових продуктах способом біотестування.

Відомий спосіб біологічного тестування токсичності акриламід у його похідних в досліді in vitro на культурі фібробластів легкого ембріона людини та in vivo на білих мишах при внутрішньочеревному введенні (Соловський М.В. Исследование токсичности in vitro и in vivo полиакриламида и некоторых анионных сополимеров акриламида / М.В. Соловский, М.Ю. Еропкин, Е.М. Еропкина, Смирнова М.Ю., Белохвостова А.Т. // Токсикологический вестник.- 2012. - № 2. - С. 24-26). Цей спосіб дає достатньо точні результати, але дуже тривалий і вимагає наявності достатньо специфічного біологічного матеріалу.

Найбільш близьким аналогом є спосіб визначення токсичності ("ГОСТ 13496.7-97 Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности"), згідно з яким токсичність біопроби визначають за допомогою інфузорій *Tetrahymena pyriformis*, *Stylonychia mytilus*, *Colpoda steinii* послідовно в три етапи. Попередньо готують середовища для проведення досліджень: середовище для культивування та поживне середовище для інфузорій. На першому етапі здійснюють екстракцію токсичних речовин із подрібненої зернової маси чи комбікорму за допомогою ацетону. На другому етапі здійснюють випарювання ацетону до повного випарювання екстрагента і додають середовище для культивування, змивають із стінок чашки маслянистий екстракт, здійснюють повторне випарювання до повного зникнення запаху розчинника, додають 1-2 см³ екстракту, фільтрують у флакони і доводять рН до 7,0-7,5. На третьому етапі беруть 1 см³ екстракту, додають 3-и або 5-ти добову культуру інфузорій *Tetrahymena pyriformis* і двічі через 30 та 60 хв. визначають ефект біопроби в краплині під мікроскопом шляхом підрахунку живих і загинувших інфузорій у відсотках, який залежить від ступеня токсичності проби зерна або корму.

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

- використання як тест-організмів культури інфузорій;
- інкубація тест-організмів інфузорій;
- оцінювання біологічної активності об'єкта шляхом підрахунку кількості інфузорій.

Але спосіб аналог має наступні недоліки:

- необхідність попереднього приготування спеціального поживного середовища для інфузорій і витримка їх у ньому 3-5 діб;
- визначення токсичної дії акриламід проводять в три етапи, що подовжує термін виконання дослідження;
- використовують водно-ацетонне середовище для екстракції досліджуваних зразків, яке може специфічно впливати на тест-організми і його дія може не збігатися з механізмом дії акриламід, що може призвести до похибки в результатах.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб біологічного тестування харчових продуктів на акриламід, в якому за рахунок використання добової культури інфузорій *Stylonychia mytilus* або *Colpoda steinii* забезпечити отримання однозначного результату щодо ступеня токсичності наявного в зразку акриламід, прискорення проведення тестування, а також спрощення процесу через те, що спосіб не вимагає використання спеціального складного обладнання і приготування спеціальних поживних середовищ для отримання 3-х та 5-ти добових культур.

Запропонований спосіб дозволяє швидко виявити потенційно небезпечні об'єкти, що важливо при біологічному та екологічному моніторингу харчових систем.

Поставлена задача вирішується в способі біологічного тестування харчових продуктів на акриламід, що передбачає інкубацію тест-організмів інфузорій, введення їх в розчин досліджуваної речовини і підрахунок кількості тест-організмів у фіксованому об'ємі суміші, згідно з корисною моделлю, добову культуру інфузорій *Stylonychia mytilus* або *Colpoda steinii* вносять в мікроакваріуми і додають розчин досліджуваної речовини, після адаптації тест-організмів підраховують початкову чисельність інфузорій, доводять об'єм суміші розчином досліджуваної речовини до половини кожного мікроакваріума і витримують 60 хвилин, після чого вдруге підраховують чисельність інфузорій і по кількості тест-організмів, що вижили, оцінюють кількість та ступінь токсичності акриламід.

У способі, що заявляється, використовується добова культура інфузорій *Stylonychia mytilus* або *Colpoda steinii*, термін проведення біотестування значно скорочений. Вживаність інфузорій вираховують по середньому значенню не менше 3-5 підрахунків в мікроакваріумах по формулі:

$$N = \left(\frac{N_2}{N_1} \right) \cdot 100, \text{ де:}$$

N - виживаність, %

N_1 - середня арифметична кількість інфузорій на початку дослідів (за результатами не менше 5-ти досліджень), особин

N_2 - середня арифметична кількість інфузорій через 1 год. експозиції (за результатами не менше 5-ти досліджень), особин

5 100 - коефіцієнт перерахунку у відсотки.

Приклади здійснення способу.

Контроль: В п'ять акваріумів вносять добову культуру інфузорій *Stylonichia mytilus* у кількості 0,02 см³ в такій послідовності: в перший мікроакваріум 15 особин, в другий - 16, в третій - 16, четвертий - 14, п'ятий - 13. Через годину експозиції підраховують кількість живих інфузорій:

$$10 \quad 15+16+15+14+13=73. \quad N = \left(\frac{73/5}{74/5} \right) \cdot 100 = \left(\frac{14,6}{14,8} \right) \cdot 100 = 98,65 \cdot$$

Приклад 1. В п'ять мікроакваріумів вносили добову культуру інфузорій *Stylonichia mytilus* у кількості 0,02 см³, в такій послідовності: в перший мікроакваріум 13 особин, в другий - 15 особин, в третій - 12, четвертий - 13, п'ятий - 15. Додавали по 0,2 см³ розчину досліджуваної речовини - соку свіжої картоплі, розбавленого водою у відношенні 1:5. Через 5 хв., після адаптації тест-організмів у розчині, здійснювали підрахунок початкової сумарної кількості інфузорій, яка складала 68 особин. Через 60 хвилин експозиції вдруге проводили підрахунок чисельності інфузорій у мікроакваріумах.

Результати впливу акриламідів на *Stylonichia mytilus* через 1 годину експозиції наведені у таблиці 1.

20 Приклад 2. Добову культуру інфузорій *Stylonichia mytilus* у кількості 0,02 см³ вносили в п'ять мікроакваріумів, додавали по 0,2 см³ розчину досліджуваної речовини - модельний зразок соку свіжої картоплі, розбавленого водою у відношенні 1:5 з додаванням 10 мг акриламідів на 100 г суміші. Через 5 хв., після адаптації тест-організмів у розчині, здійснювали підрахунок початкової сумарної кількості інфузорій, яка складала 66 особин. Через 60 хвилин експозиції вдруге проводили підрахунок чисельності інфузорій у мікроакваріумах.

Результати впливу акриламідів на *Stylonichia mytilus* через 1 годину експозиції наведені у таблиці 1.

30 Приклад 3. Здійснювали аналогічно прикладу 2, але як модельний зразок використовували сік свіжої картоплі, розбавлений водою у відношенні 1:5 з додаванням 50 мг акриламідів на 100 г суміші. Результати впливу акриламідів на *Stylonichia mytilus* через 1 годину експозиції наведені у таблиці 1.

35 Приклад 4. Здійснювали аналогічно прикладу 2, але як модельний зразок використовували сік свіжої картоплі, розбавлений водою у відношенні 1:5 з додаванням 100 мг акриламідів на 100 г суміші. Результати впливу акриламідів на *Stylonichia mytilus* через 1 годину експозиції наведені у таблиці 1.

Приклад 5. Здійснювали аналогічно прикладу 1, але як досліджуваний зразок використовували екстракт з картопляних чіпсів, розбавлений водою у відношенні 1:5. Результати впливу акриламідів на *Stylonichia mytilus* через 1 годину експозиції наведені у таблиці 1.

40 Приклад 6. Здійснювали аналогічно прикладу 1, але як досліджуваний зразок використовували екстракт з кукурудзи для попкорну, розбавлений водою у відношенні 1:5. Результати впливу акриламідів на *Stylonichia mytilus* через 1 годину експозиції наведені у таблиці 1.

45 Приклад 7. Здійснювали аналогічно прикладу 1, але як досліджуваний зразок використовували екстракт з кукурудзи для попкорну після термообробки, розбавлений водою у відношенні 1:5. Результати впливу акриламідів на *Stylonichia mytilus* через 1 годину експозиції наведені у таблиці 1.

Приклад 8. Здійснювали аналогічно прикладу 1, але експозиція складала 3 години. Результати наведені в таблиці 2.

50 Приклад 9. Здійснювали аналогічно прикладу 2, але експозиція складала 3 години. Результати наведені в таблиці 2.

Приклад 10. Здійснювали аналогічно прикладу 3, але експозиція складала 3 години. Результати наведені в таблиці 2.

55 Приклад 11. Здійснювали аналогічно прикладу 4 але експозиція складала 3 години. Результати наведені в таблиці 2.

Приклад 12. Здійснювали аналогічно прикладу 5 але експозиція складала 3 години. Результати наведені в таблиці 2.

Приклад 13. Здійснювали аналогічно прикладу 6, але експозиція склала 3 години. Результати наведені в таблиці 2.

Приклад 14. Здійснювали аналогічно прикладу 7, але експозиція склала 3 години. Результати наведені в таблиці 2.

5 Приклад 15. Здійснювали аналогічно прикладу 1, як тест-культуру використовували інфузорії *Colpoda steinii*. Результати наведені в таблиці 3.

Приклад 16. Здійснювали аналогічно прикладу 2, як тест-культуру використовували інфузорії *Colpoda steinii*. Результати наведені в таблиці 3.

10 Приклад 17. Здійснювали аналогічно прикладу 3, як тест-культуру використовували інфузорії *Colpoda steinii*. Результати наведені в таблиці 3.

Приклад 18. Здійснювали аналогічно прикладу 4, як тест-культуру використовували інфузорії *Colpoda steinii*. Результати наведені в таблиці 3.

Приклад 19. Здійснювали аналогічно прикладу 5, як тест-культуру використовували інфузорії *Colpoda steinii*. Результати наведені в таблиці 3.

15 Приклад 20. Здійснювали аналогічно прикладу 6, як тест-культуру використовували інфузорії *Colpoda steinii*. Результати наведені в таблиці 3.

Приклад 21. Здійснювали аналогічно прикладу 7, як тест-культуру використовували інфузорії *Colpoda steinii*. Результати наведені в таблиці 3.

20 Приклад 22. Здійснювали аналогічно прикладу 15, але експозиція склала 3 години. Результати наведені в таблиці 4.

Приклад 23. Здійснювали аналогічно прикладу 16, але експозиція склала 3 години. Результати наведені в таблиці 4.

Приклад 24. Здійснювали аналогічно прикладу 17, але експозиція склала 3 години. Результати наведені в таблиці 4.

25 Приклад 25. Здійснювали аналогічно прикладу 18 але експозиція склала 3 години. Результати наведені в таблиці 4.

Приклад 26. Здійснювали аналогічно прикладу 19 але експозиція склала 3 години. Результати наведені в таблиці 4.

30 Приклад 27. Здійснювали аналогічно прикладу 20, але експозиція склала 3 години. Результати наведені в таблиці 4.

Приклад 28. Здійснювали аналогічно прикладу 21, але експозиція склала 3 години. Результати наведені в таблиці 4.

Таблиця 1

Результати дослідження впливу акриламідів на *Stylonichia mytilus* за 1 годину експозиції

№	Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> за 1 годину експозиції, особин	Вживаність <i>Stylonichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
	Вода-контроль	74	73	98,7	не токсичний
1	Сік картоплі свіжої	68	67	98,5	не токсична
2	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 10 мг/100 г акриламідів	66	57	86,4	не токсичний
3	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 50 мг/100 г акриламідів	60	47	78,3	слаботоксичний
4	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 100 мг/100 г акриламідів	62	20	32,3	токсичний
5	Картопляні чіпси	74	43	58,1	слаботоксичні
6	Кукурудза для поп-корна	70	69	98,6	не токсична
7	Кукурудза для поп-корна після термообробки	64	50	78,1	слаботоксична

Таблиця 2

Результати дослідження впливу акриламідів на *Stylonichia mytilus* за 3 години експозиції

№	Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Stylonichia mytilus</i> за 3 години експозиції, особин	Вживаність <i>Stylonichia mytilus</i> , %	Ступінь токсичності
8	Сік картоплі свіжої	68	66	97,1	не токсична
9	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 10 мг/ 100 г акриламідів	66	56	84,9	не токсичний
10	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 50 мг/100 г акриламідів	60	41	68,3	слаботоксичний
11	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 100 мг/100 г акриламідів	62	10	16,1	токсичний
12	Картопляні чіпси	74	32	43,2	слаботоксичні
13	Кукурудза для поп-корна	70	67	95,7	не токсична
14	Кукурудза для поп-корна після термообробки	64	44	68,8	слаботоксична

Таблиця 3

Результати дослідження впливу акриламиду на *Colpoda steinii* за 1 годину експозиції

№	Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Colpoda steinii</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Colpoda steinii</i> за 1 годину експозиції, особин	Вживаність <i>Colpoda steinii</i> , %	Ступінь токсичності
15	Сік картоплі свіжої	70	68	98,6	не токсична
16	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 10 мг/100 г акриламиду	64	58	90,6	не токсичний
17	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 50 мг/100 г акриламиду	60	51	85,0	не токсичний
18	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 100 мг/100 г акриламиду	82	33	40,2	токсичний
19	Картопляні чіпси	68	41	60,3	слаботоксичні
20	Кукурудза для поп-корна	64	63	98,4	не токсична
21	Кукурудза для поп-корна після термообробки	67	58	86,6	не токсична

Таблиця 4

Результати дослідження впливу акриламиду на *Colpoda steinii* за 3 години експозиції

№	Досліджувані зразки	Сумарна кількість <i>Colpoda steinii</i> на початку експозиції, особин	Сумарна кількість <i>Colpoda steinii</i> за 3 години експозиції, особин	Вживаність <i>Colpoda steinii</i> , %	Ступінь токсичності
22	Сік картоплі свіжої	70	67	95,71	не токсична
23	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 10 мг/100 г акриламиду	64	57	89,06	не токсичний
24	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 50 мг/100 г акриламиду	60	48	80,00	не токсичний
25	Модельний зразок соку картоплі свіжої з додаванням 100 мг/100 г акриламиду	82	30	36,6	токсичний
26	Картопляні чіпси	68	34	50,0	слаботоксичні
27	Кукурудза для поп-корна	64	62	96,88	не токсична
28	Кукурудза для поп-корна після термообробки	67	48	67,61	слаботоксична

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб біологічного тестування харчових продуктів на акриламід, що передбачає інкубацію тест-організмів інфузорій, введення їх в розчин досліджуваної речовини і підрахунок кількості тест-організмів у фіксованому об'ємі суміші, який **відрізняється** тим, що добову культуру інфузорії *Stylonichia mytilus* або *Colpoda steinii* вносять в мікроакваріуми і додають розчин досліджуваної речовини, після адаптації тест-організмів підраховують початкову чисельність інфузорій, доводять об'єм суміші розчином досліджуваної речовини до половини кожного мікроакваріума і
- 10 витримують 60 хвилин, після чого вдруге підраховують чисельність інфузорій і по кількості тест-організмів, що вижили, оцінюють кількість та ступінь токсичності акриламіду.

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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