



**«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ  
НАТУРАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК»**

Материалы международной научно-технической Интернет-конференции,  
17-18 октября 2014 г.



Краснодар  
2014



**Редакционная коллегия:**

Проректор по НИИД КубГТУ, д-р техн. наук, проф. С.А. Калманович (*председатель*);  
Проректор по МДиМП, наук, проф. Т.В. Бархатова (*зам. председателя*);  
Директор Института пищевой и перерабатывающей промышленности КубГТУ, д-р техн.  
наук, проф. А.Ю. Шаizzo (*зам. председателя*);  
д-р техн. наук, проф. Г.И.Касьянов (*отв. редактор*);  
аспирант М.Г. Редько (*секретарь*)

Современные достижения в исследовании натуральных пищевых добавок: Сборник  
материалов международной научно-технической Интернет - конференции, 17-18 октября  
2014 г.- Краснодар: Изд. КубГТУ, 2014.- 288 с.

Modern development in the research of natural food supplements: The collection of  
international scientific-technical Internet-conference materials, 17-18 of October of 2014 –  
Krasnodar: KubSTU, 2014. – 288 с.

В сборнике представлены статьи о перспективных видах мясной, рыбной и  
молочной продукции, обогащенной натуральными пищевыми добавками.

Материалы, помещенные в сборнике, публикуются по авторским оригиналам.

The collection contains articles about perspective kinds of meat, fish and dairy products  
enriched with natural food supplements.

The materials, represented in the collection, are printed using authors originals.

ISBN

© Кубанский государственный технологический университет, 2014



**РАЗРАБОТКА ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ К БИОСЕНСОРАМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И ДОБАВОК**

Л. Н. Пилипенко, И.В. Пилипенко, Е. И. Данилова

Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса  
l.pylypenko@mail.ru

**Аннотация**

Приведены результаты исследований по созданию чувствительных элементов на основе растительных хлорофиллсодержащих тканей и субклеточных структур, а также микроорганизмов. Исследованы их индикативные способности к выявлению токсических загрязнителей, относящихся к разным классам химических соединений, в пищевых продуктах и добавках.

**DEVELOPMENT SENSITIVE ELEMENTS TO A BIOSENSOR FOR DETERMINING THE SAFETY OF FOODS AND SUPPLEMENTS**

L.N. Pilipenko, I.V. Pilipenko, E.I. Danilova

Odessa National Academy of Food Technologies, Odessa  
l.pylypenko@mail.ru

**Abstract**

The results of researches on creation of sensitive elements on the basis of vegetable tissues, which contain chlorophyll, and subcellular structures, and also microorganisms were resulted. Their indicative capacities for the exposure of the different classes of toxic contaminant compounds in food products and additions were investigated.

Актуализация в современных условиях контроля качества и безопасности пищевых продуктов, необходимости быстрого непрерывного контроля технологического процесса их производства, оценки сроков хранения, загрязнения и порчи сырья и готовой продукции, мониторинга безопасности в соответствии с принципами HACCP требует совершенствования методов контроля, в частности, биологических [1]. Одним из перспективных диагностических детекторных систем в этом направлении является биосенсорика. Биосенсорика использует специфические биохимические отклики, посредничающие между изолированными ферментами, иммунными системами, тканями, субклеточными органеллами или целыми ячейками и смесями детектируемых химических соединений, в частности, загрязнителей, поллютантов – и обычно электрическими, тепловыми или оптическими сигналами.

Биосенсоры состоят из трёх частей:



- биоселективного элемента (биологический материал, например, ткани, микроорганизмы, органеллы, клеточные рецепторы, ферменты, антитела, нуклеиновые кислоты и т.д., материал биологического происхождения или биомиметик);
- преобразователя (работает на физико-химических принципах: оптический, пьезоэлектрический, электрохимический и т.д.), который преобразует сигнал, появляющийся в результате взаимодействия среды с биоселективным элементом, в другой сигнал, который проще измерить;
- связанной электроники, которая отображает результат в удобном для пользователя виде.

Их взаимосвязь можно представить следующей, согласно IUPAC, схемой (рис.1).

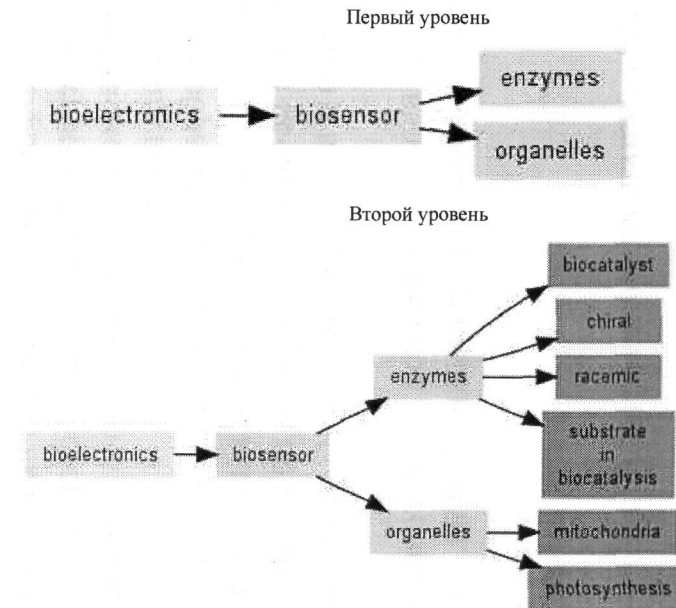


Рисунок 1 – Уровни биосенсорной детекции по IUPAC [2]

Следует заметить, что биоселективные элементы играют ключевую роль в определении рекомендованных показателей. Именно поэтому целью работы явилось:

- изыскание чувствительных элементов применительно к специфике физико-химических и структурно-механических свойств пищевых продуктов и добавок;



- разработка и обоснование состава чувствительных элементов для использования в биосенсорных системах;

- апробация их способности определять регламентированные загрязнители, относящиеся к различным классам химических соединений, а также осуществлять интегральную оценку безопасности продуктов и добавок.

Обзор аналитических и патентных источников показал, что рациональным является получение биосенсора путем иммобилизации микроорганизмов или субклеточных структур (например, хлоропластов) в полимерную композицию на основе ПВС. При этом обеспечивается отсутствие токсичного действия на биоматериал и осуществляется иммобилизация естественных компонентов (тканей, хлоропластных структур и микроорганизмов) в полимерную пленку. Проведенные нами исследования показали, что возможно получить тонкие, эластичные, не растворимые в воде пленки с иммобилизованными микроорганизмами или субклеточными структурами, которые могут быть использованы для осуществления биосенсорного анализа на наличие в образцах пищевых продуктов и добавок токсичных веществ.

При приготовлении биосенсоров с иммобилизованными микроорганизмами или естественными компонентами (элементами тканей, например, хлоропластами) с использованием разработанной нами композиции для получения полимерной пленки, не нужно длительное замораживание, что позволяет упростить процедуру иммобилизации и избежать потери чувствительности биорецепторных элементов в результате губительного действия низкой температуры на естественные компоненты или действия ультрафиолетовых лучей на микроорганизмы. Получены с использованием новых композиций полимерные тонкие пленки с иммобилизованными микроорганизмами или естественными компонентами можно использовать в контроле безопасности пищевых продуктов и добавок.

Эффективными для использования в качестве чувствительных элементов-биоиндикаторов признаны клетки фотобактерий - *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*. Такие биосенсоры способны обнаружить широкий спектр токсичных соединений при весьма низких их концентрациях (табл. 1) [3].

Таблица 1 – Пределы обнаружения некоторых экотоксикантов с помощью биосенсоров

Экотоксикант	Нижний предел обнаружения, г /дм <sup>3</sup>
Хлорорганические и фосфорорганические соединения	5,0·10 <sup>-6</sup>



Углеводороды нефти	7,5·10 <sup>-5</sup>
Ионы тяжелых металлов	1,0·10 <sup>-5</sup>
Производные фенола	6,0·10 <sup>-6</sup>

Как отмечают авторы, основой функционирования биосенсоров с использованием этих микроорганизмов является измерение интенсивности их биолюминесценции при наличии экотоксикантов в окружающей среде [1,3].

Основным ограничением для использования фотобактерий в аналитических целях является невозможность применения свободных клеток для проведения анализа *in situ* в проточных системах. Подходом к преодолению этих ограничений является иммобилизация клеток с использованием разнообразных носителей. Применение клеток в иммобилизованном виде позволяет осуществить их использование в проточных системах и обеспечить стабильность аналитических характеристик клеток на протяжении длительного периода времени [1, 3, 4]. Носитель для иммобилизации микроорганизмов должен иметь механическую прочность и не быть токсичным для клеток.

Разработанный нами новый высокочувствительный биоиндикатор экотоксикантов на основе клеток биолюминесцентных фотобактерий *Photobacterium phosphoreum* (Cohn), иммобилизованных в гель поливинилового спирта (ПВС), позволяет осуществлять непрерывный экомониторинг присутствия токсичных соединений как в воде, так и в пищевых продуктах. При разработке биоиндикатора уровень аналитического сигнала препаратов иммобилизованных клеток оценивался по величине их биолюминесценции. Были оптимизированы условия формирования биоиндикатора и его состав, показана возможность его длительного хранения без потери эффективности действия для тканей растений, что оформлено заявкой на патент [5].

Композиция для получения полимерной пленки для иммобилизации микроорганизмов или субклеточных структур включает поливиниловый спирт (ПВС) и может содержать дополнительные компоненты: многоатомные спирты (глицерин, ксилит, сорбит), антиоксиданты (аскорутин, кверцетин, аскорбиновая кислота), вещества, которые способствуют процессу полимеризации (перекись водорода и др.). В качестве биосенсоров используются способные к флуоресценции компоненты растительных клеток (хлоропласты, хлорофилл) или клетки микроорганизмов при массовой концентрации ПВС от 10 до 20 % к массе геля, дополнительных компонентов от 1 до 2 %, биосенсоров от 0,01 до 20,0 % (на сухую массу).

Нижний предел концентрации биомассы клеток в составе биокатализатора определяется необходимым уровнем люминесценции, которая обеспечивает длительное



использование биокатализатора для определения токсикантов. При использовании меньшей, чем указанный нижний предел концентрации компонентов биосенсора (хлорофилла, хлоропластов, клеток микроорганизмов), получаемый иммобилизованный биокатализатор имеет заметно меньший уровень люминесценции, которая приводит к уменьшению точности исследований, а верхний предел их массовой доли в биокатализаторе определяется тем, что при превышении 20,0 % концентрации этих компонентов происходит неполное включение вводимых в смесь клеток в раствор полимера, которое сопровождается вымыванием чувствительных элементов при использовании полученных пленок в среде при определении токсикантов.

Разработана композиция для иммобилизации естественных компонентов, тканей и микроорганизмов, в которой за счет люминесценции при возбуждении электронов биосенсоров (хлорофилла, хлоропластов, клеток микроорганизмов) обеспечивается получение однозначного результата относительно степени токсичности неорганических и органических веществ и/или их смесей, повышается чувствительность метода и достоверность результатов, а также достигается упрощение за счет того, что не требуется использования специального сложного оборудования. Определяли изменение интенсивности люминесценции в образцах, содержащих токсиканты, в сравнении с контрольным (ДИ) и выражали его в процентах к контролю (табл. 2), а также изучали характеристики полученных чувствительных элементов-биоиндикаторов.

Таблица 2 - Результаты исследования влияния вида образцов на чувствительные элементы по изменению интенсивности их люминесценции (%),  $M \pm m$ ,  $n=5$

Исследуемый образец	Результаты анализа	
	остаточная люминесценция %	оценка токсичности
Вода	91±2	нетоксичный
Сок из слив	89±2	нетоксичный
Картофель свежий измельченный	90±3	нетоксичный
Морковь свежая измельченная	94±3	нетоксичный
Пюре кабачков	89±3	нетоксичный
Сок из слив с добавлением 0,5 ПДК инсектицида «Бульдог»	82±2	нетоксичный
Сок из слив с добавлением 2 ПДК $Cd^{2+}$	62±3	слабо токсичный
Морковь с добавлением 2 ПДК $Pb^{2+}$ + 0,5 ПДК инсектицида «Бульдог»	51±3	токсичный



Примечание: ПДК  $Pb^{2+}$  = 0,5 мг/дм<sup>3</sup>, ПДК  $Cd^{2+}$  = 0,03 мг/дм<sup>3</sup>, ПДК инсектицида «Бульдог» = 0,0002 мг/см<sup>3</sup>.

Приведенные в табл. 2 результаты свидетельствуют о способности полученных чувствительных элементов к индикации токсикантов, что показывает целесообразность использования их в качестве биосенсоров - достойных приемников целого ряда аналитических методов контроля, использующихся в различных отраслях пищевой промышленности. Потенциальные приложения сенсорной техники столь широки, что ее применение привело бы к революционному совершенствованию контроля качества и безопасности продукции пищевой промышленности.

#### Библиографический список

1. Пилипенко Л.Н., Пилипенко И. В. Биологические методы в оценке безопасности растительных пищевых продуктов и ингредиентов.- Одесса: Изд-во «Optimum», 2014. – 264с.
2. IUPAC. Glossary for chemists of terms used in biotechnology. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. Last update: 2012-08-19; version: 2.3.2.
3. Холстов А.В., Сенько О.В., Исмаилов А.Д., Ефременко Е. Н. Разработка биосенсора на основе иммобилизованных клеток *Photobacterium phosphoreum* для обнаружения экотоксикантов в водных средах [текст] // Москва, Россия <http://waste.ua/eco/2009/wastewater/phosphoreum/>.
4. Ермолаева Т. Н., Калмыкова Е. Н., Шашканова О.Ю. Пьезокварцевые биосенсоры для анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов и для клинической диагностики // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2008. - Т. LII, № 2, С. 17 - 25.
5. Патент на корисну модель № 88894 Україна, МПК G01N 33/00 Спосіб біотестування контамінантів в харчових продуктах [Текст] / Пилипенко Л.М., Пилипенко І.В., Гайдукевич Д.К., Данилова О.І., Вікуль С.І. власник Одес. нац. акад. харч. технологій, - № u 201310225; заявл. 19.08.13 , опубл. 10.04.14, бюл. № 7.