

Точность и достоверность определения проверена путем статистической обработки результатов определения. При  $n = 5$ ,  $P = 0,95$  величина относительного стандартного отклонения составляет 4,7 – 7,0 %.

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что некоторые БАД («Эпигал Велес», «Теавит», «Сарасвати») не могут рассматриваться как существенный регулярный источник кофеина. Таким образом, стандартизация БАД на основе экстрактов чая по содержанию кофеина позволяет выявить недоброкачественные продукты (фальсификаты) и оценить суточное потребление биологически активных веществ, в частности, кофеина с данным продуктом.

**Выводы.** Показана возможность применения эффекта тушения сенсibilизированной твердофазной люминесценции ионов  $Tb$  (III) в комплексе с 1,10-фенантролином и  $\beta$ -циклодекстрином в присутствии алкалоида кофеина для определения последнего в биологически активных добавках.

### Литература

1. Суханов, Б.П. Биологически активные добавки к пище. Сообщ. 1 / Б.П. Суханов, М.Г. Керимова // Вопр. питания. – 2004. – № 3. – С. 31–34.
2. Биологически активные добавки в питании человека (оценка качества и безопасность, эффективность, характеристика, применение в профилактической и клинической медицине) [Текст] / В.А. Тутельян, Б.П. Суханов, А.Н. Астриевский, В.М. Позняковский // Томск: Из-во НТЛ, 1999. – 296 с.
3. Глушенко, Н.Н. Фармацевтическая химия [Текст] / Н.Н. Глушенко, Т.В. Плешнева, В.А. Попков. – М.: Академия, 2004. – 384 с.
4. ГОСТ Р 51881–2002. Кофе натуральный растворимый. Общие технические условия. – Введ. 2003–01–01. – М.: Изд-во стандартов, 2003. – 12 с.
5. Андреева, К.Ю. Спектрофотометрическое определение кофеина и теофиллина по реакции азосочетания с тетрафторборатом 4-нитрофенилдиазония / К.Ю. Андреева, С.Г. Дмитренко, Ю.А. Золотов // Зав. лаб. Диагностика материалов. – 2010. – Т. 76, № 2. – С. 21–24
6. Новый способ определения кофеина / В.В. Хасанов, К.А. Дычко, Т.Т. Куряева и др. // Журн. прикладной химии. – 2005. – Т. 78, № 9. – С. 1451–1454.
7. Хроматографическое разделение парацетамола, кофеина и аспирина на сорбенте с привитыми нитрильными группами и анализ таблеток «АскофенП» / Т.Б. Голубецкий, Е.В. Будко, Е.М. Басова и др. // Журн. аналит. химии. – 2007. – Т. 62, № 6. – С. 636–640.
8. Карцова, Л.А. Использование селективного комплексообразования катехинов с ионами  $Fe^{3+}$  при определении кофеина в чае методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии / Л.А. Карцова, А.В. Алексеева // Журн. аналит. химии. 2009. – Т. 64, – № 9. – С. 954–958.
9. Карцова, Л.А. Возможности и ограничения различных режимов капиллярного электрофореза для количественного определения катехинов и кофеина в черном и зеленом чае / Л.А. Карцова, О.В. Ганжа, А.В. Алексеева // Журн. аналит. химии. 2010. – Т. 65, – № 2. – С. 212–217.
10. Анализ образцов чая с помощью мультисенсорной системы и капиллярного электрофореза / И.С. Папиева, Д.О. Кирсанов, А.В. Легин и др. // Журн. аналит. химии. 2011. – Т. 84, – № 6. – С. 940–947.
11. Химия комплексных соединений редкоземельных элементов [Текст] / К.Б. Яцимирский, Н.А. Костромина, З.А. Шека и др. – К.: «Наукова думка», 1966. – 493 с.
12. Сумина, Е.Г. Применение циклодекстриновых подвижных фаз в тонкослойной хроматографии органических реагентов ксантенового и хинолинового ряда / Е.Г. Сумина, В.В. Атаян, С.И. Штыков // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. – Т. 8, вып. 1. – С. 83–93.

УДК [602.1:53.082.9]-047.64:664-027.3

## БІОСЕНСОРИ В КОНТРОЛІ ЯКОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

Пилипенко Л.М., д-р техн. наук, професор, Данилова О.І., канд. хім. наук, ст. наук. співр.,  
Пилипенко І.В., канд. техн. наук, доцент, Гайдукевич Д.К., наук. співр.  
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

*Розроблена композиція для отримання біосенсорів шляхом іммобілізації рослинних тканин, субклітинних структур або мікроорганізмів (наприклад, хлоропластів). Запропонована біосенсорна детекція токсичних контамінантів різної хімічної природи у харчових продуктах.*

*Composition for the receipt of biosensors by immobilization of vegetable tissues, subcellular structures or microorganisms (for example, chloroplasts) is developed. Biosensory detection of different chemical toxic contaminants in food products is offered.*

Ключові слова: біосенсор, контроль якості, біосенсорна композиція, контамінанти, харчові продукти.

У останнє десятиліття показана висока ефективність застосування біосенсорного аналізу для вирішення ряду практичних завдань. За літературними даними, основними галузями найбільш успішного використання біосенсорів є промислова біотехнологія, харчова промисловість екологія, клінічна діагностика [1-4].

Аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання даної проблеми, свідчить, що застосування біосенсорів на основі ферментів і клітин мікроорганізмів для оцінки вмісту різних органічних сполук (наприклад, спиртів, моносахаридів) оптимізує процес виробництва і здатне знизити за рахунок цього вартість кінцевого продукту. Виявлення сумарного вмісту органічних сполук, включаючи спирти і вуглеводи, необхідно для екологічного моніторингу (оцінка присутності вуглеводів у стічних водах, заснована на вимірі індексу БСК<sub>5</sub> – біологічного споживання кисню); оцінка вмісту метилового спирту (для об'єктів газодобування). Нині для вказаної мети використовуються трудомісткі аналітичні методи, які не дозволяють отримувати оперативну інформацію про присутність поллютантів у стічних водах [5].

Актуальною проблемою екологічного контролю є детекція поллютантів, зокрема, в воді, ксенобіотиків у воді та харчових продуктах, у які вони потрапляють із різних джерел. До поширених груп ксенобіотиків належать похідні бензену, зокрема, нітроароматичні сполуки (2,4-динітрофенол, пікринова кислота, 2,4,6-тринітротолуол та ін.), пестициди, важкі метали та інші токсиканти. Деякі з цих сполук можуть бути визначені фізико-хімічними методами (спектрофотометрія, хроматографія, титриметрія тощо). Ці методи є високочутливими, але разом із тим – трудомісткими, а іноді вимагають наявності дорогого устаткування та приладів, у зв'язку з чим актуальною є розробка біосенсорного підходу, який дозволить не тільки визначити токсигенну дію однієї речовини, але й дозволить з'ясувати ефект наявності кількох ксенобіотиків [6, 7]. Біосенсорна детекція токсичних сполук може бути використана для оцінки стану об'єктів довкілля на стадії екологічного моніторингу, а також при використанні біотехнологічних підходів ремедіації об'єктів довкілля.

Тому основним завданням дослідження було створення біосенсора та достатньо стійкої біосенсорної композиції для детекції токсичних речовин різної хімічної природи, які є традиційними та емерджентними контамінантами харчових продуктів.

Раціональним є отримання біосенсора шляхом іммобілізації мікроорганізмів або субклітинних структур (наприклад, хлоропластів) у полімерну композицію на основі ПВС, що забезпечує відсутність токсичної дії на біоматеріал. При цьому здійснюється іммобілізація природних компонентів, (тканин і мікроорганізмів) у полімерну плівку. Проведені нами дослідження показали, що можна отримати тонкі, еластичні, не розчинні у воді плівки з іммобілізованими мікроорганізмами або субклітинними структурами, які можуть бути використані для здійснення біосенсорного аналізу на токсичні речовини.

При приготуванні біосенсорів з іммобілізованими мікроорганізмами або природними компонентами (елементами тканин, наприклад, хлоропластами) з використанням розробленої нами композиції для отримання полімерної плівки не потрібно тривале заморожування, що дозволяє спростити процедуру іммобілізації і уникнути втрати чутливості біорецепторних елементів внаслідок згубної дії низької температури на природні компоненти або дії ультрафіолетових променів на мікроорганізми. Отримані з використанням нових композицій полімерні тонкі плівки з іммобілізованими мікроорганізмами або природними компонентами використовують для визначення вмісту токсичних речовин у харчових продуктах біологічним методом.

Численні дослідження в цій галузі свідчать про переваги експресних і чутливих аналітичних методів, заснованих на використанні біологічних індикаторів – живих організмів, здатних тривалий час знаходитися у водному середовищі і зберігати високу активність за відсутності забруднення, проте, як тільки в довкіллі з'являються екотоксиканти, вони відразу ж дають аналітичний сигнал. Серед таких біоіндикаторів ефективними для використання визнані клітини фотобактерій. Основою функціонування біосенсорів із використанням цих мікроорганізмів є вимір інтенсивності їхньої біоломінесценції за наявності екотоксикантів у довкіллі [1-5].

Основним обмеженням для використання фотобактерій в аналітичних цілях є неможливість застосування вільних клітин для проведення аналізу *in situ* в проточних системах. Підходом до подолання цих обмежень є іммобілізація клітин із використанням різноманітних носіїв. Застосування клітин в іммобілізованому вигляді дозволяє здійснити їхнє використання в проточних системах і забезпечити стабільність

аналітичних характеристик клітин упродовж тривалого періоду часу [4, 6-9]. Носій для іммобілізації мікроорганізмів повинен мати механічну міцність і не бути токсичним для клітин.

Розроблений нами новий високочутливий біоіндикатор екотоксикантів на основі клітин біоломінесцентних фотобактерій *Photobacterium phosphoreum* (Cohl) Ford, іммобілізованих в гель полівінілового спирту (ПВС), дозволяє здійснювати безперервний екомоніторинг присутності екотоксикантів як у воді, так і в харчових продуктах. При розробці біоіндикатора рівень аналітичного сигналу препаратів іммобілізованих клітин оцінювався, визначенням величини їхньої біоломінесценції. Були оптимізовані умови формування біоіндикатора і його склад, показана можливість його тривалого зберігання без втрати ефективності дії: для тканин рослин. Композиція для отримання полімерної плівки для іммобілізації мікроорганізмів або субклітинних структур складається з полівінілового спирту (ПВС) і додаткових компонентів, при цьому в якості додаткових компонентів використовують багатоатомні спирти (гліцерин, ксиліт, сорбіт), антиоксиданти (аскорутин, кверцетин, аскорбінова кислота), компоненти, що сприяють процесу полімеризації (перекис водню), або іммобілізація здійснюється без їх участі, а як біосенсори використовують здатні до флуоресценції компоненти рослинних клітин (хлоропласти, хлорофіл) або клітини мікроорганізмів при масовій частці полівінілового спирту від 5 до 16 % до маси гелю, додаткових компонентів від 0,1 до 5,0 %, біосенсорів від 0,1 до 20,0 %. Нижня межа концентрації біомаси клітин, що рекомендується для використання, у складі люмінесцентного біокатализатора визначається необхідним рівнем люмінесценції, що забезпечує тривале використання біокатализатора для визначення токсикантів. Експериментально встановлено, що при використанні меншої 0,1 % за масою концентрації компонентів біосенсора (хлорофілу, хлоропластів, клітин мікроорганізмів) отримуваний іммобілізований біосенсор має помітно менший рівень люмінесценції і це призводить до зменшення точності досліджень. Верхня межа концентрації клітин у біосенсорі визначається тим, що при використанні високих концентрацій відбувається неповне включення всіх клітин, що вводяться в суміш із розчином полімеру, зокрема в гідрогель полівінілового спирту (ПВС), спостерігається їхнє вимивання при використанні отриманих плівок у середовищі для визначення токсикантів. Слід зауважити, що у випадку використання гомогенатів та субклітинних структур рослинних організмів доцільною є їхня кількість, що не перевищує 20,0 %, а у випадку використання як чутливого елемента фотобактерій достатньо 10,0 %. Таким чином, перевищення вказаної верхньої межі концентрації є недоцільним.

Розроблена композиція для іммобілізації природних компонентів, тканин і мікроорганізмів, у якій за рахунок використання денного світла, додаткових компонентів - багатоатомних спиртів (гліцерин, ксиліт, сорбіт), антиоксидантів (аскорутин, кверцетин, аскорбінова кислота), за рахунок люмінесценції при збудженні електронів біосенсорів (хлорофілу, хлоропластів, клітин мікроорганізмів) забезпечується отримання однозначного результату щодо ступеня токсичності неорганічних і органічних речовин та/або їхніх сумішей, підвищується чутливість методу і достовірність результатів, а також досягається спрощення за рахунок того, що спосіб не вимагає використання спеціального складного обладнання. З отриманої плівки завтовшки 0,2–0,5 мм вирізали рецепторні елементи розміром 10 x 3 мм, які зберігали в холодильнику (+4 – +8 °C) в сухому вигляді або у фосфатно-цитратному буферному розчині (pH=6,0).

Для визначення флуоресценції плівку занурювали в 80 % водний розчин ацетону, визначали люмінесценцію хлорофілу при фотозбудженні з використанням ртутно-кварцової лампи в максимумі поглинання  $\lambda = 680$  нм. Визначали інтенсивність флуоресценції контрольного дослідження та після впливу токсикантів, вираховували зміну інтенсивності люмінесценції ( $\Delta I$ ) і виражали її у відсотках від контрольного дослідження (табл. 1).

Застосування гелю ПВС в якості носія для іммобілізованих клітин обумовлене високою пористістю матриці гелю, що утворюється, забезпечує неускладнену дифузію субстратів і продуктів, відповідно, до і від іммобілізованих клітин, а також має гарні експлуатаційні характеристики матеріалу такого гідрогелю. Розмір пор носія обумовлюється концентрацією полімеру в суміші з клітинами, а також температурою полімеризації цієї суміші [10]. Нижня межа концентрації ПВС визначається тим, що при масовій частці ПВС, меншій 5 % у складі біокатализатора помітно знижується стійкість плівки до деформаційних навантажень внаслідок збільшення розміру пор у матриці, що формується. Збільшення розміру пор також сприяє виходу частини іммобілізованих клітин із матриці. При концентрації ПВС вище 16 % у складі біомембрани, яка є верхньою межею у композиції люмінесцентного біосенсора для визначення контамінантів у харчових продуктах, утворюються міцні пружні плівки з дрібнопористою структурою, яка помітно погіршує іммобілізацію природних об'єктів усередині плівки і призводить до зниження максимального рівня люмінесценції. На рис. 1 наведено мікроструктурні особливості плівок із використанням у якості чутливого агента хлоропластних структур рослинних клітин. Як видно з наведених на рис. 1 знімків, розміри цих структур співставні з розмірами пор утворених полімерних структур, і знаходяться в діапазоні 0,2 – 2,0  $\mu\text{m}$ .

Таблиця 1 – Результати дослідження впливу зразків на зміни інтенсивності люмінесценції  $\Delta I$  (%),  $M \pm m$ ,  $n=5$

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

Примітка: ГДК  $Pb^{2+}$  = 0,5 мг/дм<sup>3</sup>; ГДК  $Cd^{2+}$  = 0,03 мг/дм<sup>3</sup>; ГДК о-хлорфенолу = 0,1 мг/дм<sup>3</sup>; ГДК інсектициду «Бульдог» = 0,0002 мг/см<sup>3</sup>; ГДК фунгіциду «Тілт» = 0,0001 мг/см<sup>3</sup>; ГДК інсектициду «Децис» = 0,0001 мг/см<sup>3</sup>

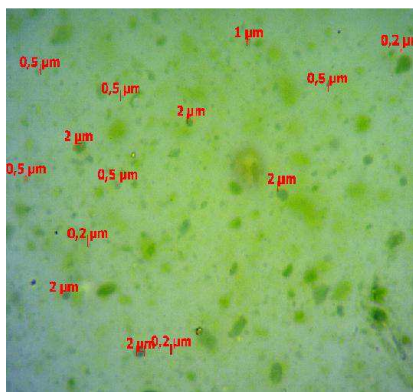


Рис. 1 – Мікроструктурні особливості біосенсорних плівок для визначення токсичних контамінантів харчових продуктів

Зазвичай при визначенні флуоресценції хлорофілу використовують два максимуми поглинання: при  $\lambda_1 = 430-460$  нм і  $\lambda_2 = 660-690$  нм, але більш інтенсивний максимум  $\lambda_2$  дає стабільні значення при повторних замірах, тому визначення флуоресценції здійснювали саме при  $\lambda = 680-690$  нм.

При використанні в якості біосенсора культур *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford та *Vibrio fischeri* визначення флуоресценції здійснюють при максимумі поглинання:  $\lambda = 390-590$  нм.

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 біолюмінесценції. Цинк при концентраціях до 2 мг/100 г підвищує інтенсивність біолюмінесценції на 20-24 %, при збільшенні – починає індукувати. Солі  $Pb^{2+}$  при концентраціях до 0,5 мг/дм<sup>3</sup> (ГДК) збільшують люмінесценцію на 15 %, а починаючи із 2 ГДК – починають зменшувати її. Інсектицид «Бульдог» при концентраціях до 0,2 мг/ дм<sup>3</sup> (ГДК) підвищує інтенсивність біолюмінесценції в середньому на 25 %, при 2 ГДК і більше – зменшує. Дія фенолу в концентраціях 0,00001-1,0 мг/дм<sup>3</sup> в цілому

має схожий вплив на інтенсивність світіння штаму. При концентрації фенолу на рівні 0,001-0,01 мг/дм<sup>3</sup> (ГДК фенолу 0,001 мг/дм<sup>3</sup>) люмінесценція штаму *Vibrio fischeri* індукувалося на 25 %. У концентрації 1 мг/дм<sup>3</sup> люмінесценція зростала на 38 %. Тобто, низькі концентрації токсикантів викликають у бактерій стабільну індукцію біолюмінесценції. Слід зазначити, що помітна індукція люмінесценція 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 біолюмінесценції.

Результати, отримані при використанні розробленого біоіндикатора для визначення наявності загальної токсичності в зразках води і деяких харчових продуктів, свідчать про відсутність негативної дії досліджених зразків на інтенсивність біоломінесценції клітин фотобактерій, що трактується як відсутність токсичності в досліджених зразках.

Ступінь токсичності неорганічних та органічних речовин, що можуть бути визначені запропонованим способом, залежить від їхнього сумарного вмісту, хімічної природи і належності до різних видів токсикантів: важкі метали, органічні речовини, у тому числі, різні групи пестицидів (інсектициди, фунгіциди, гербіциди), глікозиди, речовини білкового походження тощо.

Таким чином, розроблені біосенсори дозволяють швидко виявити потенційно небезпечні об'єкти, які містять контамінанти неорганічного та органічного походження, що важливо для визначення безпеки харчових продуктів і продовольчої сировини та екологічної безпеки, а також моніторингу якості харчових систем.

### Література

1. Капрельянц Л.В., Йоргачова К.Г. Функциональные продукты. – О.: Друк, 2003, – 312 с.
2. Cancino B., Rossier F., Orellana C. Corn starch waste water treatment with membrane technologies: pilot test [Text] / B. Cancino, F. Rossier, C. Orellana // Desalination. – 2006, – Vol. 200, – № 1–3, – P. 750–751.
3. Jawaheer S. Development of a common biosensor format for an enzyme based biosensor array to monitor fruit quality [Text] / S. Jawaheer, S.K. White, S.D. Rughooputh, D.C. Cullen // Biosens. Bioelectron. – 2003, – Vol. 18, – № 12, – P. 1429–1437.
4. D'Soma S.F. Microbial biosensors [Text] / S.F. D'Soma // Biosens. Bioelectron. – 2001, – Vol. 16, – P. 337–353.
5. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование [Текст] / ред. О.П. Мелехова, Е.И. Сарapultцева. – М.: «Академия», 2010, – 288 с.
6. Skladal P. Amperometric biosensors for detection of phenol using chemically modified electrodes containing immobilized bacteria [Text] / P. Skladal, N.O. Morozova, A.N. Reshetilov // Biosens. Bioelectron. – 2002, – Vol. 17, – № 10, – P. 867–873.
7. Shkotova L.V. Amperometric biosensor for ethanol analysis in wines and grape must during wine fermentation [Text] / L.V. Shkotova, E.A. Slast'ia, T.A. Zhyliakova, O.P. Soldatkin, W. Chuhmann, S.V. Dziadevych // Ukr. Biokhim. Zh. – 2005, – Vol. 77, – № 1, – P. 96–103.
8. Nedović V., Willaert R. Applications of cell immobilization biotechnology [Text] / V. Nedović, R. Willaert // Springer Pbs. Ser.: Focus on biotechnol. – 2005, – Vol. 8B, – P. 573.
9. Kim S.K. Continuous water toxicity monitoring using immobilized *Photobacterium phosphoreum* / S.K. Kim, B.S. Lee, J.G. Lee, H.G. Seo, E.K. Kim // Biotechnol Bioproc Eng., – 2003, – Vol 8, – P. 147–150.
10. Лозинский В.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 27. Физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии / В.И. Лозинский, Л.Г. Дамшкалн, Б.Л. Шаскольский, Т.А. Бабусина, И.Н. Курочкин, И.И. Курочкин // Колоидн. журн. – 2007, – Т. 69, – № 6, – С. 798–816.

УДК 346.544.4

## ИНТЕГРАЦИЯ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА С СИСТЕМОЙ НАССР

Осадчук И.В., науч. сотр. ПНИЛ

Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса

*В статье рассмотрены области интеграции международных стандартов ISO 9001 и ISO 22000, на основе которых разработаны элементы интегрированной системы менеджмента качества и безопасности пищевых продуктов.*

*In the article areas of integration the international standards ISO 9001 and ISO 22000 are considered, and elements of the integrated system of a quality management and safety of food products are developed.*

Ключевые слова: ISO 9001, ISO 22000, система менеджмента качества и безопасности.

Система НАССР на сегодняшний день признана во всем мире, как наиболее эффективная система обеспечения безопасности пищевых продуктов. Система признана на мировом уровне и на сегодняшний