УКРАЇНА

(19) UA (11) 121557 (13) C2

(51) МПК (2020.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/22 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)
D06M 16/00
G01N 33/34 (2006.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
D06M 101/06 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2017 05499**

(22) Дата подання заявки: **27.10.2015**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.06.2020**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **1451333-7**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **07.11.2014**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **SE**

(41) Публікація відомостей про заявку: **10.11.2017, Бюл.№ 21**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.06.2020, Бюл.№ 12**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/IB2015/058278, 27.10.2015**

(72) Винахідник(и):
Парті-Пелінен Кірсі (FI),
Рясянен Ярі (FI),
Хярмяля Кієло (FI),
Кетунен Ану (FI),
Рііхінен Кале-Юхані (FI)

(73) Власник(и):
СТОРА ЕНСО ОЙЙ,
P.O 309, FI-00101 Helsinki, Finland (FI)

(74) Представник:
Опанасенко Ольга Сергіївна, реєстр. №471

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 20040014122 A1, 22.01.2004
WO 9747764 A1, 18.12.1997
US 5928875 A, 27.07.1999
WO 2004042082 A1, 21.05.2004
US 20130189152 A1, 25.07.2013
OUTI PRIHA et al. Detection of Bacillus cereus group bacteria from cardboard and paper with real-time PCR. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2004, Vol. 31, no. 4, P. 161 – 169
SUIHKO M.-L. et al. Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products. Journal of applied microbiology, GB, 2004, Vol. 97, no. 6, P. 1228 – 1235

UA 121557 C2

(54) УДОСКОНАЛЕНИЙ СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

(57) Реферат:

Винахід стосується визначення вмісту мікроорганізмів в матеріалі, який включає целюлозу, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості. Матеріал, який включає целюлозу, піддається попередньому ферментативному обробленню, а мікроорганізми визначають за допомогою технологій на основі ПЛР.

Галузь техніки

Даний винахід стосується способу визначення вмісту мікроорганізмів в матеріалі, який включає в себе целюлозу, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості.

Опис попереднього рівня техніки

Папір і картон є важливими пакувальними матеріалами, які застосовуються в багатьох галузях промисловості. Пакувальний папір або картон може забезпечувати фізичний або протихімічний захист запечатаного(-них) предмета(-ів); на ньому також може міститися інформація або за його допомогою може бути підвищений маркетинговий контроль або контроль за розміром порцій предметів. Папір і картон також має довгу історію в харчовій промисловості в широкому спектрі застосування, зокрема як пакування. Як пакувальний матеріал, папір часто вступає в безпосередній контакт з харчовими продуктами. Картонно-паперова тара застосовується для сухих харчових продуктів, рідини та заморожених продуктів. Обгортковий папір зазвичай також застосовується для пакування продуктів швидкого харчування та цукерок, лікарських препаратів, сигарет, предметів розкоші та поліграфічної продукції високого класу. Упаковка захищає вміст від дії небезпечних факторів навколишнього середовища, продовжуючи термін придатності упакованого вмісту. Гігієнічні вимоги до споживчої пакувальної тари з картону є надзвичайно високими.

Зазвичай, папір і картон загалом складається з целюлозних волокон, карбонату кальцію, крохмалю та геміцелюлози. Всі ці компоненти є натуральними, які можуть бути поживним середовищем для забруднювальних мікроорганізмів. Кругообіг води з високим вмістом поживних речовин та крохмалю є поширеною причиною виникнення мікробної інфекції.

Як правило, мікробіологічну чистоту речовини оцінюють за допомогою мікробіологічних методів, що передбачають необхідність культивування зразку матеріалу або поверхні, що підлягає аналізу. Склад та умови культивування (температура, час, середовище) мають вплив на точність способу. Зразок для кількісного аналізу має бути розбавлений до такої міри, щоб можна було визначити кількість одиничних колоній, утворених клітинами. У досліджуваному зразку можуть бути десятки або щонайбільше кілька сотень клітин. Кількість колоній в паралельних зразках може значно змінюватися, отже, відтворюваність є низькою. Таким чином, точність або достовірність є низькою. Крім того, мікробіологічні способи є зазвичай трудомісткими та займають багато часу, отже вони не є оптимальними для подальшого контролю (моніторингу) чистоти картонно-паперових упаковок.

Способи виявлення мікроорганізмів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в процесі паперового виробництва, включаючи паперові аркуші, відомі наприклад в патенті США 8 613 837 та патенті США 2013189152.

Оскільки дані способи є трудомісткими, займають багато часу та їхня точність і чутливість не є достатніми, існує потреба в удосконалених способах визначення мікробіологічної чистоти картонно-паперового матеріалу.

Мета та суть винаходу

Метою даного винаходу є створення удосконаленого способу визначення забруднювальних мікроорганізмів в матеріалі, який включає в себе целюлозу, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості. За даним винаходом, цю мету можна досягти, виходячи з нижчезазначеного опису та формули.

Першим аспектом винаходу є спосіб визначення вмісту мікроорганізмів в матеріалі, який включає в себе целюлозу, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості. Характерні особливості даного способу наведені у відмітній частині пункту формули 1.

Другим аспектом винаходу є застосування целюлази в попередньому обробленні матеріалу з вмістом целюлози, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості, до визначення мікроорганізмів за допомогою кількісної ПЛР.

Спосіб дозволяє просто та точно відстежувати мікробіологічну чистоту матеріалу з вмістом целюлози, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості, а також отриманих паперово-картонних матеріалів, таких як матеріали для споживчої упаковки, зокрема для упаковки харчових продуктів. Таким чином, гігієна пакувального матеріалу підвищується, оскільки можливе забруднення можна виявити на ранньому етапі.

Короткий опис фігур

Фігура 1 показує порівняння аналізу шляхом кількісної ПЛР на наявність бактерій на інокульованому картоні, суспендованому у буферному розчині та підданому фільтруванню за допомогою стиснення та традиційному культивуванню для визначення мікроорганізмів.

Фігура 2 показує порівняння аналізу шляхом кількісної ПЛР на наявність бактерій, на інокульованому картоні, суспендованому у буферному розчині та підданому розділювальному фільтруванню центрифугою та традиційному культивуванню для визначення мікроорганізмів.

Фігури 3a та 3b показують порівняння способу за даним винаходом і традиційного способу на основі культивування щодо визначення мікроорганізмів на двох різних паперах або картонах.

Фігура 4 показує порівняння способу визначення мікроорганізмів на картоні за допомогою кількісної ПЛР без попереднього ферментативного оброблення, за даним винаходом, та за допомогою традиційного способу на основі культивування.

Фігура 5 показує порівняння способу визначення мікроорганізмів за допомогою традиційного культивування, кількісної ПЛР без попереднього ферментативного оброблення, фільтрування за допомогою стиснення як попереднього оброблення, розділювального фільтрування центрифугою як попереднього оброблення та способу за даним винаходом, що передбачає застосування двох різних змішаних комерційних препаратів целюлази.

Детальний опис винаходу

Авторами винаходу несподівано було виявлено, що визначення за допомогою ПЛР мікробіологічної чистоти матеріалу, який включає в себе целюлозу, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості, може значно покращитися за допомогою попереднього ферментативного оброблення зразку. Попереднє ферментативне оброблення надає можливість здійснити кількісне виявлення за допомогою ПЛР, навіть якщо рівні забруднювальних мікроорганізмів є дуже низькими.

За даним винаходом, визначення вмісту мікроорганізмів в матеріалі, який включає в себе целюлозу, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості, включає в себе такі етапи:

(a) отримання суспензії зразку матеріалу з вмістом целюлози; та

(b) оброблення суспензії, отриманої на етапі (a), одним ферментним препаратом або декількома ферментними препаратами з целюлазною активністю; і

(c) відокремлення мікроорганізмів від суспензії, обробленої ферментами на етапі (b); і

(d) виділення нуклеїнових кислот з організмів, відокремлених на етапі (c); і

(e) проведення ПЛР-аналізу нуклеїнових кислот, виділених на етапі (d), де результат ПЛР показує вміст мікроорганізмів зразку.

Як відомо в даній галузі техніки, позитивний результат ПЛР свідчить про наявність певної нуклеїнової кислоти і, таким чином, певного мікроорганізму, а кількісна ПЛР застосовується для визначення рівнів мікроорганізмів.

В зв'язку з цим, термін "вміст мікроорганізмів" слід розуміти як такий, що включає в себе як якісний (наприклад, виявлення штаму мікроорганізму), так і кількісний вміст мікроорганізмів зразку (наприклад, кількість колонієутворювальних одиниць бактерій). Визначення вмісту кількісного та якісного вмісту в матеріалі зразку може здійснюватися окремо або разом. Якісний вміст може бути визначений за допомогою праймерів, специфічних для певних видів. Наявність продукту ПЛР свідчить про наявність мікроорганізму і може визначатися за допомогою гель-електрофорезу або переважно аналітичних даних, використовуючи обладнання для проведення кількісної ПЛР. Кількісне визначення здійснюється за допомогою обладнання для проведення кількісної ПЛР та відомих елементів контролю, по мірі необхідності. Можуть застосовуватися або праймери широкого спектру дії, або специфічні праймери.

За даним винаходом, фраза "матеріал з вмістом целюлози/який включає в себе целюлозу, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості" означає матеріали, які містять в собі целюлозу, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості, в тому числі сировина, целюлозний матеріал, що використовується в процесі виробництва та кінцеві продукти. Приклади таких матеріалів з вмістом целюлози (целюлозних матеріалів) включають в себе, без обмеження, деревні стружки, механічну деревну масу та різні види паперу і картону. Переважними матеріалами є деревна маса, різні види паперу і картону. Споживчий картон є особливо переважним, а картон для пакування їжі та напоїв є найбільш переважним матеріалом з вмістом целюлози.

В зв'язку з цим, термін "споживчий картон" включає в себе загальний пакувальний картон, картон для пакування харчових та нехарчових продуктів, картон для пакування рідини, картон для пакування лікарських засобів, картон для пакування сигарет та графічний картон. Папір або картон, що підлягає перевірці на мікробіологічну чистоту, може бути одношаровим або багатошаровим, а також з покриттям або без покриття. Папір або картон містить в собі целюлозні волокна та, необов'язково, різну кількість геміцелюлози та, необов'язково, інші компоненти і/або покриття. Вміст геміцелюлози або покриття може здійснювати вплив на оптимальний склад ферментного препарату. Переважним картонно-паперовим матеріалом є споживчий пакувальний картон, зокрема пакувальний картон для рідини та продовольчого матеріалу.

Суспензію можна отримати з водної фази виробничого процесу. Проте, коли суспензію отримують з процесу або водного продукту, необхідно переконатися у тому, що розчин

придатний для активності ферментного препарату на наступних етапах. У разі необхідності, буферний розчин має бути змінений.

Зразок потенційно забрудненого матеріалу з вмістом целюлози може бути суспендований у розчині, зазвичай буферному розчині, придатного для активності ферментного препарату, що застосовується. Картонно-паперовий матеріал може бути зрощений до етапу суспендування, наприклад, за допомогою ножиць. Зазвичай, етап суспендування паперового або картонного матеріалу покращується за допомогою механічного подрібнення і/або наприклад перемішування у вихровий спосіб. Один приклад переважного способу суспендування зразку можна знайти в стандартних методах дослідження молочних продуктів, 17-те видання, публікація APHA. Зразки, що отримують шляхом процесу варіння целюлози, можуть піддавати ферментативному обробленню без механічного подрібнення. Проте, у деяких випадках, буфер для суспензії має бути змінений, виходячи з потреб ферментативної активності на наступному етапі.

Потім, вагова кількість переважно гомогенізованої суспензії вступає в контакт з ферментним препаратом з вмістом одного або декількох видів целюлазної та, необов'язково, геміцелюлазної активності. Зазвичай, до суспензії додають ферментний препарат.

Суспензію обробляють целюлолітичними ферментами для посилення відокремлення мікроорганізмів та волокнистого матеріалу. Ферментний препарат за даним винаходом містить в собі щонайменше один фермент з целюлазною активністю. Необов'язково, ферментний препарат додатково має геміцелюлазну активність. Ферментний препарат також може бути сумішшю ферментів з целюлазною активністю та, необов'язково, одним або декількома видами геміцелюлазної активності. Ферментний препарат, що містить в собі декілька видів целюлазної активності, переважно збагачений одним або декількома видами ендоглюканазної активності. Ферменти целюлази можуть бути ендоцелюлази, такі як ендоглюканази (EC 3.2.1.4) або екзоактивні целобіогідролази (EC 3.2.1.91), але не обмежуватися ними, і вони також можуть мати інші види целюлолітичної і/або геміцелюлолітичної активності або будь-яку їхню суміш. Переважними є ендоглюканази. Ендоглюканазна активність сімейства cel5 є особливо корисною. Геміцелюлазами можуть бути наприклад ксиланази (EC 3.2.1.8) або мананази або будь-які їхні суміші. Прикладом комерційно доступної ферментної суміші, що застосовується за даним винаходом, є Екостоун L900 (AB Enzymes, Фінляндія), який є сумішшю целюлази триходерми, збагаченої cel5.

Ферментативне оброблення є м'яким для живих мікроорганізмів та знижує необхідність проведення масштабного механічного подрібнення. Воно посилює відокремлення мікроорганізмів та волокон в паперах-основах або картонах-основах, внаслідок чого збільшується чутливість та точність визначення.

Переважно, ферментний препарат дозується з невеликим надлишком для забезпечення належного відокремлення мікроорганізмів та волокон в матеріалі з вмістом целюлози. Для активності ферментного препарату мають бути створені відповідні умови, включаючи pH, температура та час інкубації для ферментативного оброблення (визначеного як етап (b) вище). Ферментативне оброблення також демонструє кращу повторюваність, ніж механічні способи мацерації. Після ферментативного оброблення, суспензія надає можливість відокремлення мікроорганізмів від матеріалу з вмістом целюлози за допомогою, наприклад, розділювального фільтрування центрифугою.

Кількість забруднювальних мікробіологічних домішок (кількість мікроорганізмів) в деревній масі, що виникли внаслідок відповідного процесу виробництва або через папір або картон, відповідно отриманий в процесі виробництва, є зазвичай дуже малою. Таким чином, необхідно відокремлювати мікроорганізми від решти волокон. В принципі, може застосовуватися будь-який відомий спосіб витягування мікроорганізмів, але найбільш переважним є розділювальне фільтрування центрифугою. Мішок фільтру центрифуги здатний витягувати живі мікроорганізми, але решта волокон видаляється. Фахівцем в даній галузі винаходу може бути підібраний відповідний розмір пор, який може становити, наприклад, 50 мікрометрів.

Потім, відокремлені клітини можуть бути оброблені моноазидом пропідію (МП). МП проникає у мембрани мертвих клітин і вступає в реакцію з нуклеїновими кислотами, внаслідок чого ДНК не може бути ампліфікована ПЛР. Таким чином, ДНК може бути визначена лише із життєздатних клітин.

Потім виділяються нуклеїнові кислоти відокремлених мікроорганізмів. Знову ж, може застосовуватися будь-який відомий спосіб. Один приклад відповідного протоколу описаний у Rinttila та інших.

Зрештою, виділений матеріал нуклеїнової кислоти піддається ПЛР-аналізу, зазвичай кількісної ПЛР (qPCR). Кількісна ПЛР надає можливість як кількісного, так і якісного визначення

мікроорганізму(-ів). Фахівець в даній галузі винаходу здатний вибрати відповідні праймери ПЛР, наприклад для визначення загальної кількості бактерій; наприклад праймери для ампліфікації ділянки 16S рДНК застосовуються при визначенні загального вмісту бактерій. Також можливим є застосування праймерів, специфічних для певних видів мікроорганізмів (якісний аналіз, що необов'язково також має кількісний результат). Зразки з кривою ампліфікації мають перевищувати пороговий цикл, перш ніж контроль без матриці ПЛР та дійсна крива плавлення покаже наявність мікроорганізмів. Підрахунок результату кількісної ПЛР здійснюється за стандартами з відомою кількістю/концентрацією мікроорганізмів.

При порівнянні з традиційними способами культивування, кількісна ПЛР значно швидша і не така трудомістка як культивування. Спосіб за даним винаходом також є дуже чутливим і надає можливість виявлення незначних змін в мікробіологічній чистоті матеріалу. Наприклад, пакувальний матеріал для рідини вважається мікробіологічно чистим, коли загальна кількість бактерій на грам пакувального картону для рідини менша, ніж 250 колонієутворювальних одиниць (КУО/г) (Стандартні методи дослідження молочних продуктів, 17-те видання, публікації APHA). Таким чином, чутливість та низька межа виявлення є суттєвими для зручності застосування способу.

Покращена точність, специфічність та зручність застосування способу визначення дозволяють безперервно слідкувати за виробленим матеріалом на виробничій ділянці та здійснювати просте стеження або проводити вибіркове тестування до застосування пакувального матеріалу. Таким чином, завдяки способу за даним винаходом підвищується безпека та гігієна споживчої упаковки. Крім того, мікробіологічні домішки, що виникають в процесі виробництва є шкідливими для такого процесу і для виготовленого продукту. Раннє виявлення можливого підвищення кількості мікроорганізмів сприяє, наприклад, запобіганню утворенню мікробних відкладень.

Спосіб, описаний в даному документі, є придатним для визначення будь-якого виду мікроорганізму. Цей спосіб особливо підходить для визначення бактерій, зокрема виду Bacillus і видів в групі Bacillus D. Крім того, можна визначити забруднювальні грибки і пліснявy.

Застосування ферменту целюлази у попередньому обробленні матеріалу з вмістом целюлози, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості, до визначення мікроорганізмів за допомогою кількісної ПЛР також входить до обсягу даного винаходу. Фермент целюлази може застосовуватися окремо або разом з іншими ферментами целюлази і/або з одним або декількома ферментами геміцелюлази. В межах даного винаходу можуть застосовуватися як змішані препарати целюлази, так і так звані цільні препарати целюлази, які мають декілька видів гідролітичної активності, а також целюлази з одним або двома основними видами активності. Як відомо в даній галузі винаходу, тип целюлази залежить від типу волокнистого матеріалу. Найбільш переважно, перш, ніж перейти до кількісного визначення мікроорганізмів, матеріал з паперу або картону попередньо обробляють ферментом ендоглюканази.

Даний винахід проілюстрований наступними необмежувальними прикладами. Слід розуміти, що варіанти здійснення винаходу, наведені у вищезазначеному описі, та приклади є лише для пояснювальних цілей, і що в рамках даного винаходу можливі різні зміни та модифікації.

Приклади

Приклад 1: Інокуляція пакувального картону

Бактеріальний штам, що належить до групи Bacillus D, був вирощений у ТСБ (триптичному соєвому бульйоні) протягом ночі при температурі +37 °С. Для забезпечення життєздатності, бактерії брали на аналіз під час експоненційної фази росту. З бульйону первинного росту об'єм 5 мл переливали до свіжого бульйону 500 мл та інкубували при температурі +37 °С протягом 6 годин. Бактеріальні клітини були розподілені по пробірках Falcon 10 × 50 мл та аналізувалися за допомогою центрифугування. Всі 10 бактеріальних гранул були ресуспендовані у 5 мл стерильного буферного розчину лимонної кислоти (0,05 М, pH 5,0) та поєднані разом і заповнені до 200 мл ("бактеріальний запас"). Бактеріальний запас додавали до буферної суміші на картоні ємністю 20 мкл відносно низького інокулянту і 200 мкл відносно середнього низького інокулянту.

Пакувальний картон інокулювали за допомогою двох рівнів штамів Bacillus, що належать до групи Bacillus D (низький і середній низький). Культивування здійснювалося за стандартним протоколом управління з контролю якості харчових продуктів та лікарських засобів (стандартні методи дослідження молочних продуктів, 17-е видання, публікації APHA). Інокулянти піддавалися послідовному розбавленню Bacillus, вирощеного згідно з вищезазначеними поясненнями; Високий рівень передбачав розбавлення у співвідношенні 1:10, і наступні середній високий, середній низький і низький рівень передбачали відповідне розбавлення, отже, інокулянт низького рівня був розбавлений у співвідношенні 1:10 000.

Приклад 2. Оброблення моноазидом пропідію

Для оброблення моноазидом пропідію, гранулу з вмістом бактеріальних клітин розчиняли за допомогою ручного вихрового змішувача до 1980 мкл 0,9 % NaCl. Отриману рідину поміщали у пробірку Еппендорфа 2 мл і додавали 20 мкл реакційного розчину МП (моноазиду пропідію). Пробірки вручну збовтували для перемішування зразків, а потім інкубували на 5 хвилин в темряві при кімнатній температурі без збовтування. Після інкубації, пробірки перевертали для гомогенізації зразків, поміщали збоку на холодних елементах під лампою потужністю 500 Ватт і освітлювали протягом 5 хвилин. Потім, зразки піддавалися центрифугуванню 20000 x г при температурі +4 °C протягом 10 хв. (центрифугою Eppendorf 5804 R) і супернатант виливали. Після центрифугування, гранулу сушили у вакуумному ексикаторі при температурі +45 °C протягом 20 хвилин і розчиняли у 45 мкл Tріс-ЕДТА буферу при температурі +55 °C протягом 1,5-2 годин.

Приклад 3: Екстрагування ДНК та кількісна ПЛР

Екстрагування ДНК відносно клітин, виділених з волокнистого матеріалу по-суті здійснювали згідно з описом Rinttila та інших (2004). Якщо сказати кількома словами, лізуючі реагенти додавали у пробірку зі скляними кульками і гомогенізатор FastPrep Beadbeater застосовувався тричі на швидкості 6,5 м/с на 1 хвилину. Пробірки інкубували при температурі 65 °C протягом 20 хв., перемішуючи у вихровий спосіб термоміксером кожні 2 хвилини. Добавляли та перемішували 800 мкл фенолу-хлороформу-ізоамілового спирту (24:23:1) і цю суміш центрифугували на рівні 10000 × g протягом 5 хвилин. 600 мкл рідкої фази поміщали у нову пробірку та екстрагували за допомогою хлороформу: ізоамілового спирту (24:1). 270 мкл 100 % ізопропанолу застосовувався для преципітації ДНК і рідину видаляли після центрифугування 20000 г при температурі +4 °C протягом 15 хв. Гранулу двічі промивали 1 мл (-20 °C) 70 % етанолу та центрифугували 20000 г при температурі +4 °C протягом 5 хвилин. Після центрифугування, гранулу сушили у вакуумному ексикаторі при температурі +45 °C протягом 20 хвилин і розчиняли у 45 мкл Tріс-ЕДТА буферу при температурі +55 °C протягом 1,5-2 годин.

Зразки ДНК розбавляли у співвідношенні 1:2, 1:4 та 1:8 для проведення аналізу шляхом кількісної ПЛР. Праймери широкого спектру дії, які описані у Nadkarni та інших у 2002 р. застосовувались до 40 циклів при температурі відпалу 60 °C. Результати зразків були підраховані за стандартною кривою, виходячи з 10-кратного розбавлення.

Приклад 4: Фільтрування за допомогою стиснення

Пакувальний картон, інокульований двома рівнями штамів групи Bacillus D. (низький та середній низький), описаний у Прикладі 1, гомогенізували за допомогою гомогенізатора Уорінга у буферний розчин та пресували за допомогою фільтрату для стиснення з метою відокремлення твердої та рідкої фази. Результат кількісної ПЛР з фільтрату, отриманий завдяки фільтруванню за допомогою стиснення, становив лише 21 та 11 % від результату культивування на низькому та середньому низькому рівні інокуляції, див. Фігуру 1 відповідно. Результат, отриманий з фільтрату для стиснення, який є значно нижчим, ніж результат культивування, свідчить про те, що фільтрування за допомогою стиснення не є достатнім способом відокремлення мікробів від пакувального картону.

Приклад 5: Розділювальне фільтрування центрифугою не є достатнім способом відокремлення мікробів

Пакувальний картон (10 г) розрізали на дрібні шматки за допомогою стерильних ножиць, за винятком країв зразку картону. Отримані шматки перемішували 300 мл буферного розчину лимонної кислоти (0,05 М, pH 5) і гомогенізували за допомогою гомогенізатора Уорінга. Відому вагову кількість гомогенізованого мокрого пакувального картону (35±0,1 г) поміщали у пробірку Falcon 50 мл з вмістом фільтрувального мішка (фільтрувального мішка F57 для волокна та дослідження in vitro, Ankom Technology) і фільтрували за допомогою центрифуги. В ідеальному варіанті, нерозчинний матрикс затримувався у фільтрувальному мішку, а бактерії випадали у осад. Проте, результат кількісної ПЛР становив 27 % від результату культивування, що свідчить про те, що лише розділювальне фільтрування центрифугою не є достатнім способом відокремлення мікробів від пакувального картону, суспендованого у розчині. Результат, отриманий шляхом кількісної ПЛР та культивування, показаний на Фігурі 2.

Приклад 6: Ферментативне оброблення

Чотири ферментні препарати з целюлолітичною активністю (так званими "цільними целюлазами" або "змішаними целюлазами") перевіряли на здатність розщеплювати зразки картону, суспендованого у буферному розчині. Ферментами, які піддавались перевірці, були Екостоун L900 (AB Enzymes), Optimase™ CX40L, Optimase™ CX60L та Multifect (Genencor). Основні види активності за інформацією виробників та іншою загальнодоступною інформацією є такими: Екостоун L900 є препаратом целюлази триходерми, збагаченої cel5. Ферментний

препарат OPTIMASE™ CX 40L містить в собі целюлазу та геміцелюлази як основні види ферментної активності. Optimase CX60L містить в собі багато видів ферментної активності і стандартизована на основі своєї активності відносно карбоксиметилцелюлози (КМЦ). Основним видом активності Multifect є ксиланаза.

Для того, щоб активність ферментів не обмежувала розщеплення картону-основи, була виконана низка варіантів випробувань (див. Таблиця 1), де співвідношення об'єму ферментів до маси картону сягало від 5 до 15 × 10^{-5}. Ефективність залишалася незмінною незважаючи на те, що на картон було додано більше ферментів, свідчачи про те, що навіть найменший об'єм містить так багато ферментів, що ферментна активність не обмежує розщеплення картону.

Таблиця 1

Варіанти випробувань	Картон (г)	Буферний розчин (мл)	Об'єм ферментів (мкл)
1	10	300	500
2	10	300	700
3	10	250	850
4	10	150	1500
5	15	150	2200
6	20	250	1700
7	15	250	1300
8	10	250	800

Всі ферменти застосовувалися з максимальним об'ємом, тому ферментна активність не обмежувала розщеплення картону-основи. Температура інкубації, pH та інші умови були доведені до оптимального діапазону щодо кожного ферменту згідно з рекомендаціями виробників. Здатність ферментів до розщеплення картону-основи оцінювали візуально і два ферменти з целюлозою як основною активністю перевершували два інших, що свідчить про те, що целюлоза переважає над геміцелюлазою.

Приклад 7: Аналіз зубчастого пакувального картону за допомогою кількісної ПЛР.

Два різні пакувальні картони інокулювали чотирма рівнями штамів групи Bacillus D (низький, середній низький, середній високий та високий), як описано в Прикладі 1. Культивування здійснювалося за стандартним протоколом управління з контролю якості харчових продуктів та лікарських засобів (стандартні методи дослідження молочних продуктів, 17-е видання, публікації APHA). Для проведення аналізу за допомогою кількісної ПЛР, пакувальні картони (10 г) розрізали на дрібні шматки за допомогою стерильних ножиць, за винятком країв зразку картону. Отримані шматки перемішували 300 мл буферного розчину лимонної кислоти (0,05 М, pH 5) і гомогенізували за допомогою гомогенізатора Уорінга. Відому вагову кількість гомогенізованого мокрого пакувального картону (35±0,1 г) поміщали у пляшку для зберігання та інкубували в шейкері-інкубаторі за допомогою ферменту целюлази (AB Enzymes, Екостоун L900) при температурі 40 °C. Зразок поміщали у пробірку Falcon 50 мл з вмістом фільтрувального мішка та фільтрували за допомогою центрифуги. Нерозчинний матрикс затримувався у фільтрувальному мішку, а бактерії випадали у осад. Зразки, для яких необхідно було визначити життєздатні клітини, піддавалися обробленню моноазидом пропідію на стадії гранул, перш ніж були додані лізуючі реагенти. Результати кількісної ПЛР, зазначені на Фігурах 3a і 3b, показали чудову лінійність та низьке стандартне відхилення між повторними зразками. Вони також відповідали результатам культивування, тобто продемонстрували добре відновлення та точність (90 та 97 %, відповідно). Експеримент повторювався кілька разів з різними видами картонів без інокуляції. Результати, отримані за допомогою ферментативного оброблення та кількісна ПЛР відповідали належним результатам культивування. В зв'язку з дуже низьким рівнем ендогенних мікроорганізмів, статистично значущі відмінності не спостерігалися. Дані непоказані.

Приклад 8: Порівняння способу визначення за допомогою культивування та кількісної ПЛР і без попереднього оброблення целюлазою

Культивування після суспендування зразку картону показало вищий мікробний рівень, ніж кількісна полімеразна ланцюгова реакція, коли попереднє ферментативне оброблення не застосовувалося до екстрагування ДНК та проведення аналізу шляхом кількісної ПЛР. Проте, попереднє оброблення целюлозою до екстрагування ДНК та аналізу шляхом кількісної ПЛР, показує належну відповідність до результатів культивування. Розділювальне фільтрування

центрифугою застосовувалося для відокремлення мікробів до проведення кількісної ПЛР. Результати показані на Фігурі 4.

Приклад 9: Попереднє ферментативне оброблення порівняно з іншими видами попереднього оброблення

Культивування зразків пакувального картону здійснювалося за стандартним протоколом управління з контролю якості харчових продуктів та лікарських засобів (Стандартні методи дослідження молочних продуктів, 17-те видання, публікації APHA). Фільтрування за допомогою стиснення здійснювалося згідно з описом в Прикладі 1, а розділювальне фільтрування центрифугою – згідно з описом в Прикладі 5. Ферментативне оброблення за допомогою комерційного препарату Екостоун L900 здійснювалося згідно з описом в Прикладі 7.

Зразки, попередньо оброблені целюлазою, продемонстрували рівень, що відповідає культивуванню (подібний або дещо вищий), а інші види попереднього оброблення (фільтрування за допомогою стиснення і розділювальне фільтрування центрифугою), а також зразки без попереднього оброблення продемонстрували нижчий рівень порівняно з культивацією. Результати показані на Фігурі 5.

Список використаної літератури

Nadkarni, M.A., F.E. Martin, N.A. Jacques, and N. Hunter. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology 148:257-266.

Rinttila T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantiification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR.

J. Appl. Microbiol. 2004; 97(6):1166-1177.

Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th edition, APHA publications. 2004.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб визначення вмісту мікроорганізмів в матеріалі, який включає целюлозу, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості, включає в себе такі етапи:
(a) отримання суспензії зразка матеріалу з вмістом целюлози; і
(b) оброблення суспензії одним ферментним препаратом або декількома ферментними препаратами з целюлазною активністю; і
(c) відокремлення мікроорганізмів від суспензії, обробленої ферментами; і
(d) виділення нуклеїнових кислот з відокремлених організмів; і
(e) проведення ПЛР-аналізу виділених нуклеїнових кислот,
в якому результат ПЛР показує вміст мікроорганізмів.

2. Спосіб за п. 1, в якому суспензію отримують шляхом суспендування зразка в розчині.

3. Спосіб за п. 1 або 2, в якому целюлазна активність є сукупністю видів целюлазної активності.

4. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому целюлазна активність являє собою щонайменше один вид ендоглюканазної активності.

5. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому ферментний препарат додатково включає в себе геміцелюлазну активність.

6. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому мікроорганізми відокремлюють від суспензії за допомогою розділювального фільтрування центрифугою.

7. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому праймерами для ПЛР є праймери широкого спектра дії проти бактерій та інших мікроорганізмів.

8. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому праймери для ПЛР є специфічними для певного виду або роду мікроорганізмів.

9. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому матеріалом з вмістом целюлози є споживчий картон, переважно картон, що застосовується в харчовій промисловості.

10. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому мікроорганізм належить до бактерій.

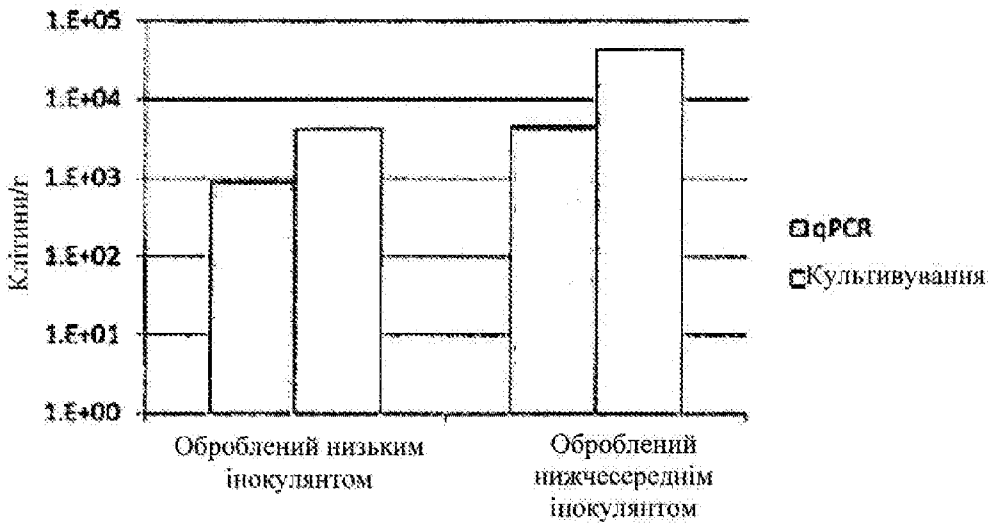
11. Спосіб за п. 10, в якому зазначені бактерії являють собою вид *Bacillus*.

12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, в якому мікроорганізми являють собою грибки або плісняву.

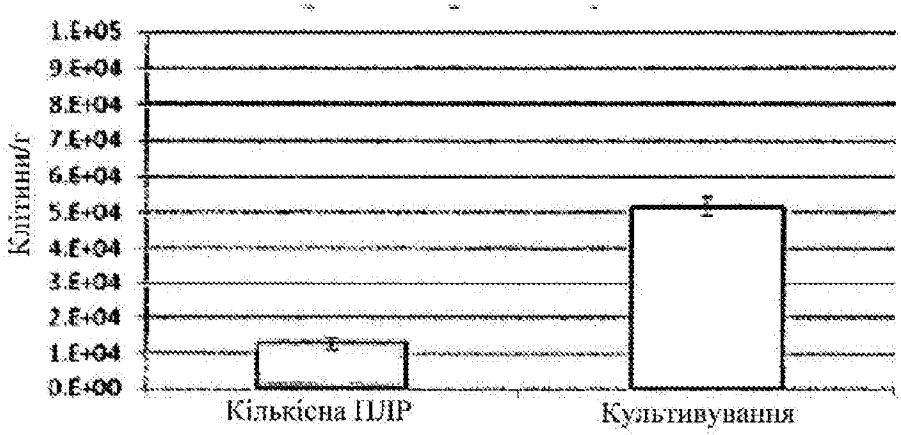
13. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому клітини обробляють моноазидом пропідію.

14. Використання целюлази у попередньому обробленні матеріалу з вмістом целюлози, що застосовується в целюлозно-паперовій промисловості, до визначення мікроорганізмів за допомогою ПЛР.

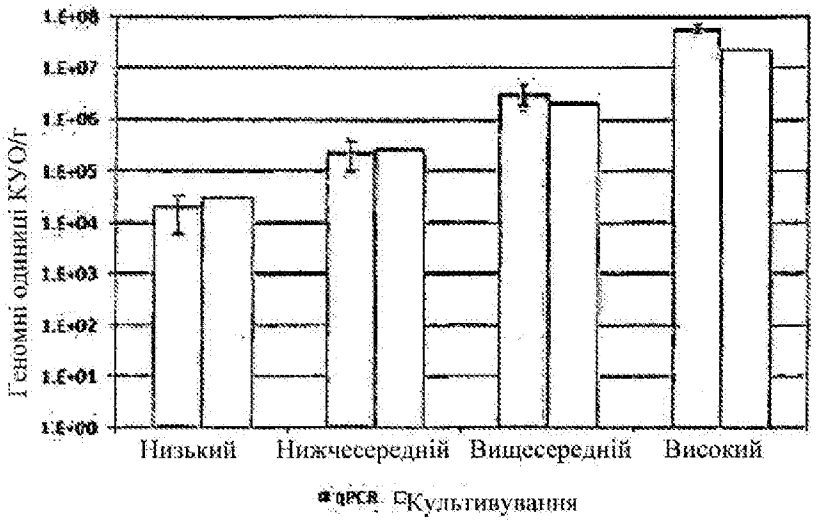
15. Використання за п. 14, в якому матеріал з паперу або картону обробляють ферментом ендоглюканази до кількісного визначення мікроорганізмів.



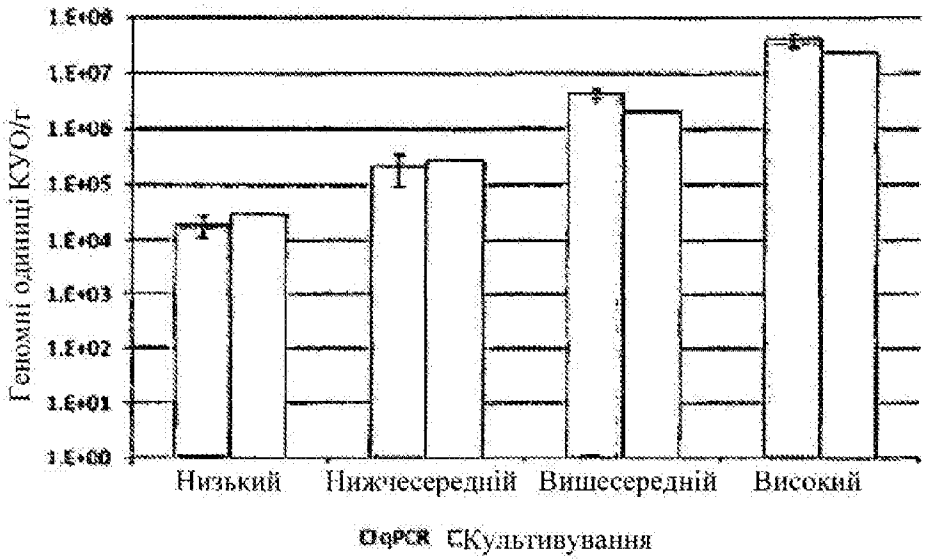
Фіг. 1



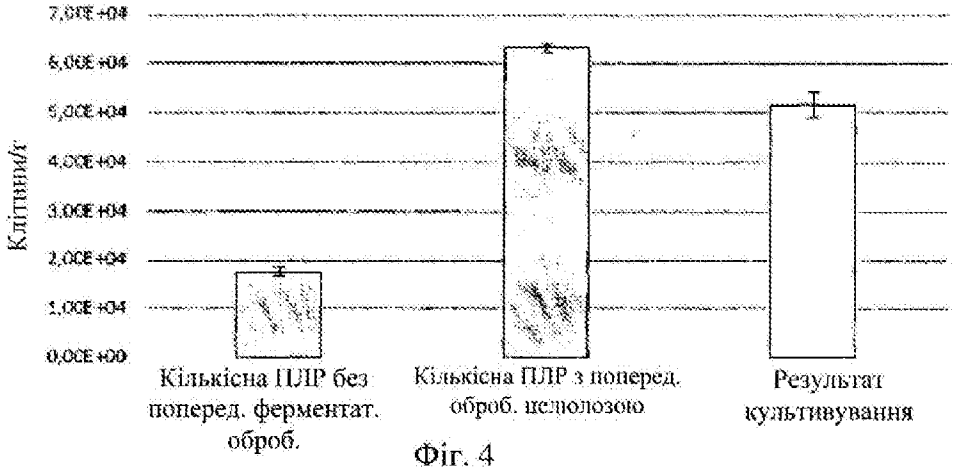
Фіг. 2



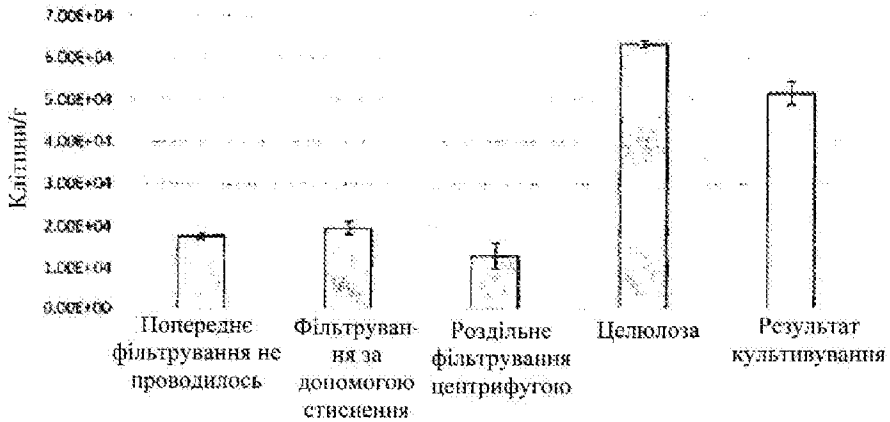
Фіг. 3а



Фіг. 3b



Фіг. 4



Фіг. 5

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601