

НАО «Университет имени Шакарима города Семей»

УДК 637.072

На правах рукописи

УТЕГЕНОВА АСИЯ ОРАЗБЕКОВНА

**РАЗРАБОТКА БИОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КСЕНОБИОТИКОВ В МОЛОКЕ**

6D073500 «Пищевая безопасность»

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант
Какимова Ж.Х., к.т.н., ассоц.
профессор
НАО «Университет имени
Шакарима города Семей»,
Зарубежный научный
консультант
Смирнова И.А., д.т.н.,
профессор
Кемеровский ГУ

Семей, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	3
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КСЕНОБИТИКОВ В СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ	10
1.1 Современные тенденции применения пестицидов в сельском хозяйстве.....	10
1.2 Токсикологическое воздействие химических удобрений и средств защиты растений на организм человека.....	16
1.3 Перспективные направления разработки биосенсорных тест- систем.....	22
1.4 Современные технологические способы понижения токсических веществ в пищевых продуктах.....	27
Выводы по литературному обзору.....	33
2 МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1 Методология и выбор направления исследования.....	37
2.2 Методы и объекты исследования.....	39
3 ИССЛЕДОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРНОЙ ТЕСТ- СИСТЕМЫ	41
3.1 Обоснование выбора ферментов для разработки тест-ситемы с иммобилизованным ферментом.....	41
3.2 Обоснование выбора метода и материала для иммобилизации ферментов.....	52
3.3 Разработка биосенсорной тест-системы на основе иммобилизованного фермента для определения карбофоса в молоке.....	70
4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПОНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КАРБОФОСА В МОЛОКЕ	76
4.1 Исследование изменения содержания карбофоса в процессе фильтрации молока с использованием цеолита.....	76
4.2 Разработка технологии творога с применением системы анализа рисков и критических контрольных точек.....	88
4.3 Определение показателей безопасности, пищевой ценности готового продукта	101
5 РАСЧЕТ СТАТЬИ ЗАТРАТ НА ПОЛУЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФЕРМЕНТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРБОФОСА В МОЛОКЕ	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	109
ПРИЛОЖЕНИЯ	123

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

СТ РК 1623-2007 Пищевые продукты. Отбор проб, анализ и гигиеническая оценка.

ГОСТ 1716-71 Молочная промышленность, производство молочных продуктов. Термины и определения.

ГОСТ 3622 – 68 Молоко и молочные продукты. Отбор проб и подготовка их к испытаниям.

ГОСТ 3624-92 Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности.

ГОСТ 3625-84 Молоко и молочные продукты. Метод определения плотности.

ГОСТ 9225-84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа.

ГОСТ Р ИСО 22935-3-2011 Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 3.

ГОСТ 23327-98 Молоко и молочные продукты. Метод измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка.

ГОСТ 3626-73 Молоко и молочные продукты. Методы определения содержания влаги и сухого вещества.

ГОСТ 3623-73 Молоко и молочные продукты. Методы определения пастеризации.

ГОСТ 26781-85 Молоко. Метод измерения pH.

ГОСТ 26809-86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка проб к анализу.

ГОСТ 28283 – 89 Молоко коровье. Метод органолептической оценки запаха и вкуса.

ГОСТ 30347-97 Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*.

ГОСТ 30518-97 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).

ГОСТ 30519-97 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода *Salmonella*.

ГОСТ 25276-82 (СТ СЭВ 2972-81) Полимеры. Метод определения вязкости ротационным вискозиметром при определенной скорости сдвига

ISO 2446:2008 (IDF 226: 2008) Молоко. Метод определения жирности.

Технический регламент Таможенного Союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». Утвержден решением Комиссии Таможенного Союза от 9 декабря 2011 г. № 880.

Технический регламент Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции" (ТР ТС 033/2013). Принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013 г. № 67.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Тест-система – применяемая в исследованиях биологическая, химическая или физическая система в отдельности или в комбинации.

Иммобилизация – ограничение подвижности молекул фермента, которая позволяет закрепить их активный центр к определенному нерастворимому носителю с сохранением максимальной работоспособности длительный период и не подвергая его структурным изменениям.

Ингибирование – подавление активности вещества.

Биосенсоры – устройства, которые состоят из биологического элемента (фермент, антитела, микроорганизмы и другое) и средств измерения реакции биологического элемента на изменение качественного состава среды.

Инсектициды – химические препараты, которые используются для уничтожения вредных насекомых.

Карбофос (малатион) – широко используемый в сельском хозяйстве фосфорорганический инсектицид для уничтожения вредных насекомых.

Биокатализатор – вещества, в присутствии которых наблюдается увеличение (положительный катализ) или замедление (отрицательный катализ) скорость химических реакций.

Критическая контрольная точка в НАССР – определенный этап производства пищевой продукции, на котором может быть обнаружено нарушение технологического процесса или режима, прямо влияющего на безопасность готового продукта.

Удельная активность фермента – число единиц активности фермента на 1 мг белка.

Адсорбция – процесс накопления одного вещества на поверхности другого, которые протекает на границе раздела фаз.

Цеолит – микропористые алюмосиликатные минералы.

Энтеротоксины – белковый экзотоксин, продукт метаболизма некоторых микроорганизмов, который при попадании в желудочно-кишечный тракт оказывает токсическое действие на макроорганизм кишечника.

Канцерогенность – свойства некоторых химических, физических и биологических факторов самостоятельно или в комплексе с другими факторами вызывать или содействовать развитию злокачественных новообразований.

Ксенобиотики – химические вещества чужеродные для живых организмов, которые естественно не входят в биотический круговорот и порожденные прямо или косвенно в результате хозяйственной деятельности человека.

Пищевая ценность – характеризует степень обеспечения физиологических потребностей человека в сутки в основных пищевых веществах.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

НАССР	- Hazard Analysis and Critical Control Points (Анализ рисков и критические контрольные точки)
ФОП	- фосфорорганические пестициды
ФОС	- фосфорорганические соединения
АХЭ	- ацетилхолинэстераза
АТФ	- аденозинтрифосфата
ФБТФ	- физиобальнеотерапевтический фактор
ГХЦГ	- гексахлорциклогексан
БАД	- биологически активная добавка
БАВ	- биологически активное вещество
ПДК	- предельно-допустимая концентрация
МДУ	- максимально допустимый уровень
БГКП	- бактерии группы кишечной палочки
ФЭК	- фотоэлектроколориметр
ККТ	- критически контрольная точка
ТР ТС	- технический регламент Таможенного Союза
НТД	- нормативно-техническая документация
НаЦЭкС	- национальный центр экспертизы и сертификации
ГОСТ	- межгосударственный стандарт
СТ	- стандарт
ТУ	- техническое условие
СОМО	- сухой обезжиренный молочный остаток
Ккал	- килокалория
Мг	- миллиграмм
Кг	- килограмм
КМАФАиМ	- количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов
КОЕ	- колониеобразующая единица
ВОЗ	- всемирная организация здравоохранения
ФАО	- продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций
АО	- акционерное общество
ТОО	- товарищество с ограниченной ответственностью
ООО	- общество с ограниченной ответственностью

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Одним из главных условий обеспечения национальной безопасности Республики Казахстан и формирования сильного государства, его успешного долгосрочного развития и экономического роста является продовольственная безопасность, которое закреплено на законодательном уровне в законе РК от 6 января 2012 года «О национальной безопасности Республики Казахстан».

В государственной программе развития агропромышленного комплекса РК на 2017-2021 годы, утвержденного Постановлением Правительства Республики Казахстан от 12.07.2018 года № 423 отмечено, что на сегодняшний день действующая система в недостаточной мере позволяет осуществлять контроль достоверности проведения процедур по подтверждению соответствия продукции требованиям технических регламентов, в том числе Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к продукции, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (принятому решением Комиссии Таможенного союза от 06.08.2019 № 132).

В программе особо отмечено, что необходимо сырьевые лаборатории оснащать современными экспресс-методами исследований безопасности сырья и пищевой продукции. Данное направление работы также соответствует выполнению одного из основных показателей Национального проекта по развитию агропромышленного комплекса РК на 2021-2025 годы, а именно, увеличения доли охвата пищевой продукции, подлежащей мониторингу по показателям безопасности.

Известно, что в сельском хозяйстве для повышения урожайности используются различные химикаты - инсектициды, которые обладают высокими токсичными свойствами. При нарушении правил применения пестицидов в сельском хозяйстве возникает угроза попадания этих веществ в пищевые продукты в количестве, превышающего предельно-допустимую концентрацию данных веществ.

В большинстве случаев в сельском хозяйстве применяются фосфорорганические пестициды (ФОП) из-за их невысокой стоимости и относительной простоте применения. Необходимо отметить, что фосфорорганические соединения (ФОС) обладают токсическим действием и способностью угнетать действие ферментов группы холинэстераз [1]. Ингибирование активности ферментов группы холинэстераз приводит к серьезным нарушениям нервной системы организма человека [2]. Среди ФОС наиболее распространенными являются паратион, диазинон, хлорофос, карбофос, дисульфотион.

На основании вышеизложенного необходимо отметить, что разработка ускоренных методов определения остаточного количества фосфорорганических соединений в продукции животноводства, в том числе и в молоке, является актуальной и перспективной. Вместе с тем, исследования по разработке ускоренных методов определения содержания токсичных веществ позволит

решить основные задачи по обеспечению безопасности пищевых продуктов, указанных в Государственной программе развития агропромышленного комплекса РК на 2017-2021 и Национального проекта по развитию агропромышленного комплекса РК на 2021-2025 годы.

Работа выполнялась в рамках научного проекта, финансируемого МОН РК по приоритетному направлению «Устойчивое развитие агропромышленного комплекса и безопасность сельскохозяйственной продукции», предприоритету «Техническое обеспечение модернизации агропромышленного комплекса» по теме «Разработка биосенсора для определения высоко кумулятивных ксенобиотиков в молоке и молочных продуктах на основе регионального мониторинга безопасности пищевых продуктов» (2021-2023 гг.).

Цель: Разработка экспресс-метода определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов – карбофоса в молоке для обеспечения пищевой безопасности молочных продуктов.

Задачи:

- исследование и выбор фермента для разработки тест-систем по результатам определения их удельной активности в молочной среде;
- проведение исследований по подбору метода и материала для иммобилизации фермента;
- разработка способа получения биосенсорной тест-системы;
- разработка технологических параметров очистки молока от ксенобиотика;
- разработка технологии молочного продукта с использованием способа очистки молока от ксенобиотика на основе определения критических контрольных точек;
- разработка и утверждение нормативно-технической документации (стандарта организации и технологической инструкции) на новый молочный продукт.

Объекты исследования – молоко, молочный продукт, фосфорорганический пестицид (карбофос), гидролитические ферменты (ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза), биосенсорная тест-система.

Методы исследования. В данной работе были применены теоретические и экспериментальные исследования. Экспериментальные исследования были проведены на основе общепринятых, модифицированных и стандартных методов исследований физико-химических, органолептических, реологических, гигиенических показателей безопасности объектов исследований, а также удельной активности ферментов.

Математическая обработка результатов экспериментальных исследований проводилась методом математической статистики с расчетом коэффициента детерминации.

Экспериментальные исследования были проведены на базе лабораторий научного центра «Пищевая биотехнология» Государственного университета имени Шакарима г. Семей, испытательной лаборатории филиала АО «НаЦЭКС» города Семей.

Научная новизна.

Впервые разработан ускоренный биометрический метод определения остаточных количеств фосфорорганического пестицида – карбофоса в молоке на основе тест-системы с ингибированием ацетилхолинэстеразы:

- исследован и выбран фермент для иммобилизации в тест-системы;
- разработаны биосенсорные тест-системы на стеклянной поверхности и бумажной основе для определения фосфорорганического пестицида (карбофоса) в молоке;
- разработаны технологические параметры очистки молока от карбофоса с применением цеолита в качестве фильтрующего материала;
- разработана технология и схема контроля технологического процесса производства творога, выработанного из молока с повышенным содержанием карбофоса на основе определения критических контрольных точек.

Новизна основных технических решений подтверждена патентом на полезную модель РК №4295 «Биосенсорные тест-системы на основе иммобилизованного фермента для определения карбофоса в молоке», 13.09.2019, бюл. № 37 (Приложение А).

Практическая значимость работы. Результаты научных исследований имеют практическое значение, поскольку разработана тест-система для ускоренного метода определения содержания остаточного количества фосфорорганического пестицида (карбофоса) в молоке, доказана возможность применения гидролитического фермента (ацетилхолинэстеразы) для его иммобилизации в тест-систему, разработаны технологические параметры очистки молока от карбофоса с применением цеолита в качестве фильтрующего материала, разработана технология творога с применением процесса фильтрации для очистки молока от карбофоса, разработана схема контроля технологического процесса производства творога, выработанного из молока с повышенным содержанием карбофоса на основе определения критических контрольных точек.

Разработан и утвержден стандарт организации и технологическая инструкция для производства творога с применением процесса фильтрации для очистки молока от фосфорорганического пестицида.

Проведена промышленная апробация технологии творога с применением процесса фильтрации для очистки молока от карбофоса в молочном цехе крестьянского хозяйства «Нұр».

Апробация работы. Основные положения и результаты исследования обсуждены на VII международной научно-технической конференции «КАЗАХСТАН-ХОЛОД 2018» (Алматы, 2018 г.); Международной научно-практической конференции, посвященной памяти Василия Матвеевича Горбатова, «Инновационно-технологическое развитие пищевой промышленности - тенденции, стратегии, вызовы» (Москва, 2018 г.).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 10 работ, в том числе 3 статьи в журналах, входящие в базу Scopus (1 статья с процентилем 9; 1 статья с процентилем 51 и 1 статья с процентилем 56); 4 статьи в журналах,

рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан; 3 статьи в материалах Международной научно-практической конференции.

Положения, выносимые на защиту:

- разработка биосенсорной тест-системы на основе иммобилизованного фермента для качественного определения карбофоса в молоке;
- разработка технологических параметров очистки молока от карбофоса;
- разработка технологии творога с использованием очищенного от карбофоса молока и исследование пищевой ценности, показателей безопасности и качества готового продукта;
- управление качеством творога на основе принципов НАССР на основе системы анализа рисков и критических контрольных точек.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы и приложений. Работа изложена на 121 страницах, включает 17 таблиц, 37 рисунков и 8 приложений, список использованных источников включает 162 источника.

1 СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КСЕНОБИТИКОВ В СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

1.1 Современные тенденции применения пестицидов в качестве инсектицида и акарицида в сельском хозяйстве

На современном этапе развития сельского хозяйства пестициды применяются для борьбы с вредителями и болезнями растений, для уничтожения сорных трав. Соблюдение санитарно-гигиенических норм использования пестицидов регламентируется нормативно-правовыми актами РК для предупреждения отравлений ядохимикатами и профилактики загрязнений объектов окружающей среды [3].

Применение пестицидов и гербицидов для повышения урожайности сельскохозяйственных культур является всемирным явлением. Так как их использование в соответствии с рекомендациями Codex Alimentarius в области распространения и применения пестицидов считается безопасным при соблюдении правил их безопасного использования и хранения.

В современной практике во всем мире пестициды применяются для улучшения урожайности сельскохозяйственных культур и способствуют более быстрому росту растений, вместе с тем неправильное применение пестицидов приводит к нарушению биотических и абиотических факторов окружающей среды, тем самым повышая биомагнификацию в почве и в воде. В большей степени применяются пестициды в сельском хозяйстве в таких странах, как Китай (1 806 млн кг в год), США (386 млн кг/год), Аргентина (265 млн кг в год), Тайланд (87 млн кг в год), Бразилия (76 млн кг в год), Италия (63 млн кг в год), Франция (62 млн кг в год), Канада (54 млн кг в год), Япония (52 млн кг в год) и Индия (40 млн кг в год) [4].

Таким образом, как отмечают зарубежные исследователи около трех миллиардов килограмм пестицидов применяют каждый год во всем мире. Активное применение пестицидов в сельском хозяйстве, прежде всего, связано с повышением урожайности и защиты сельскохозяйственных культур, что способствует экономическому росту производителей сельскохозяйственных культур. Несмотря на то, что применение пестицидов оказывает неблагоприятное воздействие на биоразнообразие растений и животных, на почву, подземные воды общий объем их продажи в странах Евросоюза не уменьшается. Как отмечают исследователи, общий объем продажи пестицидов остаются относительно постоянными в течении 2011-2016 годов. Вместе с тем существуют огромные различия в уровне продаж пестицидов среди стран Евросоюза. В более чем в половине стран средний объем продажи пестицидов увеличился, особенно, в таких странах, как Болгария, Эстония и Финляндия. Отмечается тенденция увеличения использования пестицидов в Восточной и Южной Европе и снижения в Западной Европе. Все это связано с политикой

страны, проводимой странами Западной Европы для улучшения экологической ситуации [5].

Анализ текущей ситуации в агропромышленном комплексе показывает, что применение пестицидов для повышения урожайности сельскохозяйственных культур и их защиты от вредителей, сорняков и болезней растений не теряет своей актуальности, несмотря на негативное влияние их на объекты окружающей среды. Повышение урожайности с одной стороны и биологическая безопасность при применении пестицидов для человека и природы с другой стороны являются двумя глобальными, противоположными экономическими и научно-техническими конфликтами современности.

Необходимо отметить, что также существует проблема использования контрафактных, запрещенных или просроченных пестицидов, которые негативно влияют на растения и почву. По мнению специалистов, длительное хранение некоторых пестицидов приводит к образованию метаболитов, которые являются наиболее опасными для здоровья человека и окружающей среды [6].

Для регулирования правильного применения пестицидов в 2002 году была предложена Европейская рамочная директива по их устойчивому использованию, и его проект был опубликован в 2006 году. 13 января 2009 года Европейский парламент, а также 24 сентября 2009 года Совет Европы одобрили окончательный текст директивы.

Целью принятой директивы являлась выработка технологической политики, которая приводит к уменьшению объема используемых пестицидов, к повышению эффективности их применения и к понижению вредного воздействия на человека и объекты окружающей среды. В директиве предложены концептуальные положения и конкретные рекомендации по использованию пестицидов в агропромышленном комплексе.

К основным задачам при реализации Европейской рамочной директивы относятся:

- реализация стратегии концепции, которая позволит снизить и оптимизировать применение пестицидов на основе принципов интегрированной защиты растений;
- обучение сельскохозяйственных работников нормам применения пестицидов в сельском хозяйстве;
- совершенствование технологии и техники опрыскивания растений пестицидами для достижения максимального эффекта и минимизации токсического воздействия на людей и окружающую среду[7].

Во всех развитых странах применение пестицидов в агропромышленном комплексе регламентируется соответствующими законами. В настоящее время для регулирования правил применения и обращения пестицидов существуют две международные конвенции – Стокгольмская Конвенция о Стойких Органических загрязнителях (POPs) и Роттердамская Конвенция о процедуре Предварительного обоснованного согласия (PIC).

Основой Стокгольмской Конвенции о Стойких органических загрязнителях (POPs) является принцип принятия мер предосторожности, которая провоз-

глашена в Рио-де-Жанейрской декларации. Основная цель Стокгольмской Конвенции – защита здоровья людей и экосистем от стойких органических загрязнителей, которая направлена на решение глобальных экологических проблем.

Для достижения цели конвенцией предполагалась устранить или ограничить 12 стойких органических загрязнителей, из них 9 пестицидов. В результате в США и Европе были запрещены к применению некоторые стойкие органические загрязнители.

В соответствии с Роттердамской Конвенцией экспорт химических веществ подпадает под процедуру предварительного обоснованного согласия импортирующей стороны [8].

Для регулирования применения пестицидов в агропромышленном комплексе в Республике Казахстан приняты ряд законодательных актов:

- Закон РК «О безопасности химической продукции», в котором установлены основные требования к обеспечению безопасности химических веществ и процессов их жизненного цикла, которые впоследствии могут оказать негативное влияние на здоровье человека и объекты окружающей среды. Согласно закону необходимо в обязательном порядке проводить паспортизацию и регистрацию химической продукции, выполнять требования безопасности и проводить оценку риска химикатов;

- Экологический кодекс РК, который устанавливает запрет производства и использования пестицидов, содержащие стойкие органические загрязнители, особо отмечается, использование пестицидов в заповедных зонах, в местах массового скопления животных в период миграции и размножения, на участках, которые представляют среду обитания для диких животных, а также в зонах искусственного разведения редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных;

- Закон РК «О защите растений» основной задачей которого является предупреждение и предотвращение вредного влияния пестицидов на людей и объекты окружающей среды;

- Технический регламент «Требования к безопасности пестицидов (ядохимикатов)», регулирующий требования к безопасности использования, транспортировки, обезвреживания, нейтрализации, хранения и производства пестицидов.

Также в Казахстане Приказом Председателя Комитета государственной инспекции в агропромышленном комплексе Министерства сельского хозяйства РК № 143 от 27.12.2012 года утвержден «Перечень пестицидов (ядохимикатов), разрешенных к применению на территории Республики Казахстан на 2013-2022 годы» [9].

Несмотря на действующие законодательные документы, принятые в РК, как отмечают многие исследователи, даже при соблюдении всех установленных норм в РК, проблемы из-за применения пестицидов в агропромышленном комплексе существуют до настоящего времени. Как показывают результаты исследования, пестициды адсорбируются органическими и веществами и минеральными коллоидами почв. Гумусовые вещества адсорбируют до 80 % пестицидов,

а избытки пестицидов мигрируют и попадают в грунтовые воды. В результате накопления в почве и в грунтовых водах, пестициды, мигрируя, попадают по пищевой цепи в организм людей и животных, тем самым вызывая различные заболевания [10].

В Казахстане в агропромышленном комплексе применяется 74 действующих веществ пестицида, которые относятся к особо опасным химикатам, 25 из них запрещены в других странах, но используется в Казахстане. Среди разрешенных к применению на территории Казахстана 14 химикатов отечественного производства содержат вещества, которые относятся к особо опасным химическим веществам из списка PAN, что приводит к загрязнению окружающей среды и наносит существенный вред здоровью человека и животных.

В связи с этим, как отмечают ученые, в Казахстане необходимо внедрить законодательные акты, запрещающие применение особо опасных пестицидов в агропромышленном комплексе, также необходимо регулирование вопросов о безопасном обращении с отходами пестицидов, включая утилизацию тары из под ядохимикатов. Комплекс проблем, вызываемых с использованием разрешенных пестицидов, дополняются проблемами незаконного импорта и нарушение норм применения пестицидов в агропромышленном комплексе, а также отсутствием достоверной информации об устаревших и непригодных к использованию пестицидов [9].

Пестициды оказывают сильное воздействие на нецелевые виды и влияют на биоразнообразие животных и растений, а также на водные и наземные пищевые системы и экосистему. Как отмечают ученые, около 80-90 % применяемых пестицидов могут испаряться в течение нескольких дней после их использования, что приводит к загрязнению объектов окружающей среды химическими веществами до токсичных уровней. Пестициды попадают в организм при приеме пищи, вдыхании или проникают через кожный покров человека, вызывая различные заболевания. Особенно отмечается восприимчивость некоторых людей и детей к токсическому действию пестицидов. Всемирная организация здравоохранения регистрируют ежегодно около 3 000 000 случаев отравления пестицидами и 220 000 смертельных исходов в развивающихся странах [11].

Современное состояние применения пестицидов показывают, что во всем мире проводятся исследования по развитию органического земледелия, которое основано на минимизации применения химических средств в сельском хозяйстве и является перспективным направлением, требующим поддержки со стороны государства. Органическое земледелие будет способствовать не только получению экологически чистой продукции, но и будет являться альтернативой для интенсивного развития сельского хозяйства [12].

К перспективным направлениям в развитии органического земледелия относятся исследования, направленные на разработку экологически чистых инсектицидов на основе лекарственных и ароматических растений для борьбы с насекомыми-вредителями. Так, Российскими учеными были проведены исследования по использованию терпенового спирта (линалоол) для борьбы с насекомыми-вредителями. Результаты исследования показали, что линалоол обла-

дает высокой инсектоарцидной активностью в сравнении с синтетическими пестицидами [13].

Во многих странах в последние годы были применены природные энтомопатогенные пестициды, бакуловирусные препараты, созданные на основе биотехнологических исследований [14].

Таким образом, необходимо отметить, что биологизация, то есть процесс максимального или полного замещения синтетических пестицидов является перспективным и актуальным направлением для развития органического земледелия. Так, были исследованы биологически активные компоненты растений, как заменители синтетических пестицидов, для борьбы за выживаемость личинок колорадского жука сорта картофеля «Невский». В качестве заменителей синтетических пестицидов были апробированы фитонциды чеснока, флавоноиды чистотела, фенольные соединения папоротника, гликоалкалоиды томата и картофеля. Результаты исследования показали, что наибольшей инсектицидной эффективностью по отношению к личинкам колорадского жука обладают фитонциды чеснока и фенольные соединения папоротника [15].

Научно-производственной компанией ООО «Петербургские Биотехнологии» созданы препараты «Ризобакт» и «Микобакт» на основе жидкого микробиологического удобрения. Принцип действия данных препаратов заключается в том, что препараты активизируют полезную почвенную микрофлору, в частности ризосферные бактерии. Размножаясь и выделяя антибиотики на поверхности корней и почвы, вытесняют патогенные грибы, бактерии и заменяют химические препараты [16].

Биологизированные технологии в органическом земледелии активно применяются в таких развитых странах, как США, Франция, Швеция и Швейцарии. В современном мире развиваются по нескольким направлениям: органическая, биологическая и органо-биологическая системы. Основой данных систем является стремление к формированию живой и здоровой почвы за счет поддержания активной деятельности микрофлоры [17].

Зарубежные ученые отмечают, что органическое земледелие не является парадигмой устойчивого развития сельского хозяйства и продовольственной безопасности, поэтому предлагается разумно сочетать органические и традиционные методы, которые будут способствовать повышению производительности в сельском хозяйстве. Так как, органическое земледелие, на долю которого в настоящее время приходится всего 1% мировых сельскохозяйственных угодий, в среднем показывает более низкую урожайность сельскохозяйственных культур. Вместе с тем, развитие органического земледелия приведет к росту цен на продукцию за счет использования более большой обрабатываемой площади земельных угодий, а также к дополнительным выбросам парниковых газов и утрате биоразнообразия [18].

В связи с этим, расширение органического земледелия будет определяться, прежде всего, его конкурентоспособностью в сравнении с традиционным ведением сельского хозяйства [19].

Традиционное ведение сельского хозяйства предусматривает применение химических веществ, в том числе и пестицидов. Пестициды повышают урожайность сельскохозяйственных культур, которая позволяет в меньшей степени использовать земельные угодья в сравнении с органическим земледелием. Однако, пестициды оказывают неблагоприятное воздействие на объекты окружающей среды и наносят вред здоровью человека [20].

Органическое земледелие предусматривает применение экологически чистых инсектицидов на основе лекарственных и ароматических растений для борьбы с насекомыми-вредителями. К главному его преимуществу относится экологически чистая окружающая среда, и как следствие здоровье будущего поколения. Недостатком же является рост цен на продукцию за счет использования более большой обрабатываемой площади земельных угодий, а также к дополнительным выбросам парниковых газов и утрате биоразнообразия. Вместе с тем, как отмечают зарубежные ученые, для перехода и дальнейшего развития отечественного органического земледелия необходимы нормативно-правовые акты. Подобные нормативные документы уже разработаны и действуют в США и Европе, на основе которых проводится их сертификация [21].

Для защиты окружающей среды и здоровья человека от негативного воздействия пестицидов проводятся исследования, направленные на разработку и применение в сельском хозяйстве биологических пестицидов.

Так, российскими учеными разработан биологический пестицид «Нигор», который получен на основе микробных и растительных компонентов и состоит гриба рода *Trichoderma*, лектинов пшеницы, биофлавоноидов гречихи и вытяжки из биогумуса. В результате проведенных исследований установлено, что применение данного биопрепарата способствовало экономии пестицидов в 1,5 раза, увеличению эффективности защиты томатов сорта «Санька» и «Сердцеед» на 20-30 %, тем самым увеличив чистую прибыль от дохода в 2 раза в сравнении с традиционными технологиями обработки овощей [22].

Для смягчения проблемы загрязнения окружающей среды химическими веществами разработана полимерная матрица, в которую помещают пестицид. В качестве материала для матрицы был использован полимер – полигидроксиалканоаты. Данные полимеры медленно разлагаются в почве микробными ферментами, предотвращая выброс включенных в полимер химических веществ в окружающую среду, и тем самым, обеспечивая эффективное действие пестицидов в течение всего вегетационного периода без повторных обработок растений. Полученные результаты зарубежными учеными свидетельствуют о том, что использование данных полимеров в качестве разлагаемой матрицы является эффективным подходом к созданию пролонгированных рецептур агрохимикатов [23].

Таким образом, использование пестицидов для увеличения сельскохозяйственного производства является всемирным явлением. Неправильное применение пестицидов влияет на экосистему из-за их накопления в пищевой цепи и в грунтовых водах, а их долгосрочное применение могут привести к серьезным последствиям. В связи с этим

проводятся исследования по замене традиционного земледелия органическим земледелием.

1.2 Токсикологическое воздействие химических удобрений и средств защиты растений на организм человека

Для того, чтобы продукты сельскохозяйственного производства были доступны для всех слоев населения в современном мире традиционная технология обработки земельных угодий с применением ядохимикатов остается актуальной, в том числе и в Казахстане.

Для того, чтобы понизить негативное воздействие ядохимикатов, в том числе и пестицидов, на объекты окружающей среды и людей необходимо соблюдать нормативно-правовые акты по их обороту и применению.

При нарушении санитарных норм использования пестицидов в агропромышленном комплексе может привести к нарушению экосистемы и к необратимым последствиям. Так как, пестициды оказывают токсикологическое действие на организм людей и животных.

Существуют 4 вида пестицидов по воздействию на живые организмы:

- контактные, которые оказывают воздействие при соприкосновении с поверхностью объекта;
- кишечные, попадая в организм с продуктами питания оказывают губительное действие;
- системные, которые проникают в сосудистую систему организма;
- фумигационные, которые попадают в организм при вдыхании.

По составу пестициды классифицируются на органические, неорганические, растительные, грибковые или бактериальные препараты. Из всех видов пестицидов наименьший вред окружающей среде оказывают органические пестициды: хлорорганические, фосфорорганические, металлоорганические, алкалоиды и пиретроиды.

По степени опасности пестициды подразделяются на очень опасные, опасные, среднеопасные и малоопасные вещества [24].

В Республике Казахстан в агропромышленном комплексе применяются органические пестициды, в том числе хлорорганические, фосфорорганические, которые относятся к опасным ядохимикатам.

Необходимо отметить, что не только нарушение норм применения пестицидов в агропромышленном комплексе негативно влияет на объекты окружающей среды и на здоровье человека. Как показывают исследования зарубежных и отечественных ученых пестициды обладают способностью накапливаться в живых организмах, длительное время сохраняются в почве и в растениях после их обработки, а также при длительном и многократном применении пестицидов у вредных объектов вырабатывается устойчивость к их воздействию. Длительное время вредное воздействие пестицидов рассматривалось без учета их взаимоотношений в системе «почва – вода – растение – продукция». Многие пестициды сохраняются в почве, из-за

медленного разложения и попадают в грунтовые и поверхностные воды. В результате длительного применения пестициды по биогеохимической цепи накапливаясь в тканях животных попадают в организм человека. Даже при низкой дозе, но при многократном использовании пестицидов, они могут представлять серьезную опасность для здоровья человека и окружающей среды [25, 26].

Пестициды в экосистеме проявляют себя по разному. Так, в воздушную среду пестициды попадают при наземном и авиационном опрыскивании земельных угодий. В зависимости от розы ветров пестициды попадают за пределы обрабатываемой территории. Водная среда является основным источником загрязнения открытых водоемов, подземных вод, в которые пестициды поступают через грунтовые и поверхностные стоки, что приводит к загрязнению сырья и пищевых продуктов. Внесение пестицидов в почву приводит к гибели полезной почвенной биоты, в результате понижается микробиологическая активность, которые влияют на мобилизационные процессы. Пестициды загрязняют растения, адсорбируясь почвой [27].

Скорость разложения пестицидов зависит от рН среды, температуры и других факторов обрабатываемой почвы, в связи с этим рекомендуется подбирать наиболее эффективные и безопасные ядохимикаты в зависимости от объектаобработки [28].

Пестициды также применяются для обработки лесных угодий, что приводит к загрязнению огромных площадей и воздействуют на состояние дикорастущих лекарственных растений, многие из которых составляют основу для получения лекарственных препаратов и БАД. Как показывают результаты исследования в таких растениях, как крапива двудомная, аир болотный, подорожник большой, зверобой продырявленный, василька синего и др. обнаружено максимальная концентрация пестицидов: ГХЦГ – 0,46 мг/кг; линдан – 0,6 мг/кг; фозалон – 0,5 мг/кг; карбофос – 0,75 мг/кг; полихлоркамфен – 0,92 мг/кг. В наибольшей степени выявлено содержание пестицидов в васильке синем, которое произрастает с сельскохозяйственными культурами[29]. Значительное загрязнение пестицидами дикорастущих лекарственных растений отмечают и иностранные исследователи [30, 31].

Проблема загрязнения пестицидами объектов окружающей среды даже при низкой дозе, но при многократном использовании пестицидов, является актуальной и масштабной во всем мире. Так как органические пестициды воздействуют на живой организм, ингибируя активность фермента ацетилхолинэстеразы в нервной системе, вследствие чего повышается уровень ацетилхолина, что вызывает повышенное возбуждение, мышечный паралич, блокировку дыхательного центра и повышает сердцебиение у человека. Пестициды при попадании в пищеварительный тракт, могут вызвать несколько видов рака за счет воздействия на организм канцерогенных веществ.

Кроме того, неблагоприятное воздействие пестицидов можно наблюдать на уровне аденозинтрифосфата (АТФ) в головном мозге человека,

который вызывает спутанность сознания, кровоизлияния, раздражительность и бессоницу.

Длительное воздействие пестицидов также может воздействовать на нейроны головного мозга, что приводит к повышенной восприимчивости к болезни Альцгеймера.

Многие ученые отмечают, что пестициды могут распадаться на неизвестные, но вредные остатки, которые невозможно обнаружить с помощью стандартных методов. При этом, каждая категория пестицидов имеют различную токсичность для человека в зависимости от способа их воздействия, метаболических путей, липофильного характера соединения, дозы и продолжительности воздействия [32, 33, 34, 35].

Зарубежные ученые отмечают, что ряд пестицидов могут вызвать репродуктивную токсичность в живых организмах, а некоторые соединения (хлордекон) влияет на репродуктивную функцию человека. Данные научных исследований свидетельствуют о том, что многие пестициды повреждают иммунную систему. Исследования на животных показали, что пестициды изменяют нормальную структуру иммунной системы, тем самым нарушая иммунные реакции и снижая устойчивость животных к антигенам и инфекционным заболеваниям. Даже карбафос, который считается соединением с очень низкой токсичностью, не регулирует иммунную систему, особенно, влияя на неспецифические иммунные механизмы.

В отчетах, опубликованных учеными, указывается, что за счет фосфорорганических соединений было госпитализировано около миллиона людей со случайными отравлениями, в том числе ежегодно страдают от отравления сельскохозяйственные работники. По оценкам экспертов во всем мире ежегодно происходят случаи отравления пестицидами около трех миллионов отравлений, в том числе со смертельным исходом 220 000 случаев [36, 37, 38, 39, 40].

Таким образом, пестициды и токсические продукты и их трансформации попадая в организм человека с пищей, являются причиной многих известных тяжелых заболеваний.

Есть предположение, что карбофос может влиять негативно на беременных женщин и на плод. Так, для женщин, кормящих грудью и беременных, отравление пестицидами представляет особую опасность. Поскольку, попадая в утробу женщины пестициды и токсические продукты их трансформации способны оказывать эмбриотоксическое и тератогенное действие, а также вызывает тяжелую интоксикацию, сопровождаемые судорогами, нарушением функции дыхания и подавлением центральной нервной системы.

При рождении детей, которые подверглись воздействию пестицидов в утробе матери, наблюдаются врожденные пороки развития, в том числе с пороками сердца и с нарушенной центральной нервной системой [41, 42, 43].

Особенно различным заболеваниям, от негативного воздействия, как уже отмечалось выше, подвергаются сельскохозяйственные работники, в том числе

онкологическим заболеваниям. Для более подробного изучения влияния пестицидов на здоровье сельскохозяйственных работников был создан международный консорциум сельскохозяйственных когортных исследований «AgricoH», работа которого была направлена на сравнении заболеваемости раком между сельскохозяйственными работниками и населения в целом.

Информация о заболеваемости раком была взята для сравнительного анализа из 6 разных стран: Австралия, Дания, Франция, Норвегия, Южная Корея и США. Из каждой группы сельскохозяйственных работников этих стран была получена информация о возникших онкологических заболеваниях в зависимости от возраста, пола и национальности. Результаты анализа полученной информации показали, что уровень заболеваемости раком зависит от возраста и вида деятельности.

Рак молочной железы и простаты наиболее распространенные виды онкологического заболевания среди женщин и мужчин соответственно.

Также отмечалось, что у женщин наблюдается наиболее низкий уровень заболеваемости раком легких, у мужчин же – рак мочевого пузыря, гортани, печени, пищевода и поджелудочной железы.

В настоящее время зарубежными учеными проводится дальнейший анализ связи между видами пестицидов и уровнем онкологического заболевания.

Как отмечают зарубежные исследователи онкологические заболевания людей также были связаны с загрязнением водных источников пестицидами. При этом наблюдаются различные виды онкологических заболеваний, особенно, рак крови.

Вопросу изучения воздействия пестицидов на возникновение онкологических заболеваний стали уделять внимание с 2016 года [44, 45, 46, 47].

Основные пути отравления организма человека пестицидами осуществляется посредством потребления продуктов питания, воду, органов дыхания или через кожу.

При поступлении ядохимикатов в организм человека через органы дыхания или через кожу пестициды оказывают психотропное и нейротоксическое действие. Ученые отмечают три стадии отравления:

1) психомоторное возбуждение, одышка, появление влажных хрипов в легочных тканях, появляется потливость и повышается артериальное давление;

2) на следующем этапе появляются судороги, нарушается дыхание, в результате нарушения работы кишечного тракта появляется жидкий стул, учащенное мочеиспускание;

3) на третьем этапе наблюдается полная остановка дыхания, может возникнуть паралич конечностей, значительное понижение артериального давления и проводимость сердца [48].

Также известны поражения, которые соответствуют типу аллергического дерматита, астматического бронхита и других заболеваний.

Отдельные пестициды такие, как карбосульфат, как показали исследования в условиях *in vivo*, проявляли мутагенное и генотоксическое действие при проведенных исследованиях на рыбах *Channapustatus* и на птицах.

Как отмечают ученые, в настоящее время появляются данные, полученные по результатам экспериментальных исследований, мутагенное действие повышается за счет синергетического взаимодействия действующих веществ, которые входят в состав препарата-пестицида. Особо, необходимо обращать внимание на препараты, которые содержат два или более действующих веществ [49].

Как отмечают ученые, пестициды поступают в организм человека через продукты питания и воду. При этом, отмечается, что при повседневном употреблении продуктов питания, с содержанием различных видов пестицидов ниже предельно-допустимой концентрации, возникает риск отравления человека ксенобиотиками. Содержащиеся в продуктах питания и в воде остаточные количества различных видов пестицидов, оказывают комбинированное канцерогенное и мутагенное действие на организм человека, вызывая нарушение работы эндокринной системы [50, 51].

Действующие вещества пестицидов могут накапливаться в организме человека с течением времени, что приводит к биоаккумуляции и является серьезной проблемой. Тем более, как отмечают зарубежные ученые не поддаются расщеплению, попадая в организм, накапливаются в тканях мозга, почки, кожи, печени, легких, селезенки, а также в желудочно-кишечном тракте. Последствия их воздействия могут варьироваться от легкого раздражения кожи до врожденных дефектов, опухолей, генетических изменений, заболевания крови и нервной системы, эндокринных нарушений, комы или смерти человека.

Рост заболеваемости раком у детей в Северной Америке, например лейкемией, является результатом мутаций соматических клеток организма под воздействием действующих веществ пестицидов. Однако, определить грань между заболеваниями, которые возникли в результате токсического воздействия действующих веществ пестицидов и других факторов, значительно усложняет оценку состояния здоровья населения. Вместе с тем, как указано в литературных источниках нет групп населения, которые бы полностью не подвергались вредному воздействию пестицидов [52, 53, 54, 55].

Таким образом, отравление организма человека действующими веществами пестицидов происходит за счет потребления продуктов питания, воды, через воздух, почву и грунтовых вод. Как отмечают ученые, из всех продуктов питания основным источником поступления в организм человека пестицидов являются зерновые продукты, свежие овощи и фрукты, которые проявляют антигенную активность и вызывают значительное повышение титров специфических антител. В связи с чем остро стоит проблема обеспечения безопасности сырья и готовой пищевой продукции [56, 57].

Для лечения последствий отравления человека действующими веществами пестицидов, как отмечают зарубежные ученые, рекомендуется

эффективное включение в рацион питания человека таких биологически активных веществ, как витамин С, куркумин, витамин Е, селен, хризин, экстракт чеснока. Особенно, применение витамина С показало значительное улучшение состояния здоровья человека при отравлении пестицидами в широком диапазоне токсичности.

Флавоноиды также могут защищать клетки живых организмов от токсичности пестицидов благодаря антиоксидантным, противовоспалительным, антимуtagenным, антистрессовым свойствам, а также влияет на улучшение функции органов, способствует активизации иммунной системы, стимулирует выведение ксенобиотиков из организма, модулируя уровни нейротрансмиттеров и гормонов и регулируя липидный и энергетический обмены.

В связи с этим, актуальным направлением является исследование и разработка пищевых продуктов, обогащенных нутрицевтиками [58, 59].

Для повышения показателей безопасности пищевых продуктов проведены исследования по изучению способности 10 молочнокислых бактерий кисломолочных продуктов разлагать пестициды. Установлено, что отдельные молочнокислые бактерии способны выживать в присутствии фосфорорганических соединений и значительно разрушать их за короткое время. Среди них наибольшую способность к инаktivации пестицидов проявляют такие культуры, как *Lactiplantibacillus plantarum subsp. Plantarum*. Продуцируемый фермент фосфатаза также может быстро разлагать пестициды *in vitro*. Кроме того, как показали результаты исследования, молочнокислые бактерии оказывают защитный эффект против окислительного повреждения, вызванного пестицидами *in vivo*, за счет своей антиоксидантной способности и толерантности к желудочному и кишечному соку [60].

В современной науке ведутся исследования по применению микроорганизмов для удаления ксенобиотиков с загрязненного участка или промышленных отходов. Этот метод называется биоремедиация и основан на том, что микроорганизмы продуцируют фермент органофосфатгидролазу, который обладает способностью разлагать широкий спектр фосфорорганических соединений [61].

Вместе с тем, учеными проводятся исследования по снижению концентрации действующих веществ пестицидов за счет удаления верхнего слоя почвы, в котором наблюдается самая высокая концентрация ядохимикатов при атмосферном их загрязнении. Предлагается проводить известкование почвы, оптимизацию минерального питания растений, а также регулировать состав и дозу пестицидов для уменьшения токсического действия отдельных действующих веществ ядохимикатов [62].

На основании вышеизложенного необходимо отметить, что проблема загрязнения пестицидами объектов окружающей среды даже при низкой дозе, но при многократном использовании пестицидов, является актуальной и масштабной во всем мире. Так как органические пестициды воздействуют на живой организм, ингибируя активность фермента ацетилхолинэстеразы в нервной системе, вследствие чего повышается уровень ацетилхолина, что

вызывает повышенное возбуждение, мышечный паралич, блокировку дыхательного центра и повышает сердцебиение у человека. Пестициды при попадании в пищеварительный тракт, могут вызвать несколько видов рака за счет воздействия на организм канцерогенных веществ.

Кроме того, неблагоприятное воздействие пестицидов можно наблюдать на уровне аденозинтрифосфата (АТФ) в головном мозге человека, который вызывает спутанность сознания, кровоизлияние, раздражительность и бессоницу.

1.3 Перспективные направления разработки биосенсорных тест-систем

Учитывая, негативное воздействие пестицидов на объекты окружающей среды и здоровье человека, исследования остаточного содержания пестицидов в объектах окружающей среды и в живых организмах является актуальными в современном мире.

В настоящее время ведутся множество исследований по разработке ускоренного метода пестицидов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах. Такие экспресс-методы необходимы для ускоренного определения уровня содержания ядохимикатов даже в полевых условиях. Хотя до сих пор применяются классические аналитические методы (газовая хроматография, жидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез и масспектрометрия) для анализа пестицидов в загрязненных образцах. Данные методы имеют свои недостатки такие, как трудоемкость пробоподготовки, сложность методики определения, наличие дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала. В связи с этим возрастает потребность в аналитических методах, которые способны обеспечить простое, быстрое, чувствительное, селективное, и самое главное, недорогой и надежный метод определения остаточных количеств пестицидов [63].

Основой для создания экспресс-методов определения пестицидов являются физико-химические, микробиологические, биохимические, молекулярно-биологические и иммунологические способы и они постоянно совершенствуются. Так, разработана методика определения фосфорорганических соединений в пищевых продуктах с помощью тест-системы AbraxisOP/C, которая основывается на ингибировании ацетилхолинэстеразы. Еще одним инновационным методом определения остаточных количеств пестицидов является иммуномикрочиповый метод, основанный на иммунологической реакции. Также перспективным методом определения остаточных количеств пестицидов является тест-система для контроля ксенобиотиков, основанный на реакции антиген-антитело, которая проходит с участием наночастиц коллоидного золота на мембране с образованием окрашенной полосы в тестовой зоне при получении положительных результатов [64, 65].

Одним из перспективных направлений ускоренных аналитических методов являются иммуносенсоры, основными элементами, которых являются биологические элементы, представляющие ферменты, микроорганизмы, ткани, антитела и целые клетки. Иммуносенсоры, основанные на высокоселективной и чувствительной реакции антиген-антитело, позволяют идентифицировать определенный пестицид.

Биосенсоры на основе ферментов позволяют обнаруживать большое количество загрязняющих веществ. Генно-инженерные ацетилхолинэстеразы широко используются в биосенсорах на основе ингибирования ферментов при обнаружении пестицидов. Некоторые генно-инженерные микроорганизмы также находят применение для разработки микробных биосенсоров при обнаружении пестицидов. В последние годы аптамеры использовались в качестве новых элементов молекулярного распознавания при разработке биосенсоров, хотя они не были использованы для анализа содержания пестицидов.

Нанотехнологии также играют важную роль в разработке эффективных биосенсоров для обнаружения пестицидов. При этом используются различные наноматериалы (наночастицы и нанотрубки) с различными свойствами [66, 67, 68, 69].

Биосенсоры классифицируются по нескольким признакам – по биочувствительности элемента и преобразователя, которые имеют такие преимущества, как измерение загрязняющего вещества с минимальными пробами, миниатюрность, компактность и удобность для перевозки устройства. То есть, классификация проводится на основе типа элементов биораспознавания (например, фермент, антитело, нуклеиновая кислота, цельная клетка и др.) и методом передачи сигнала (оптический, электрохимический, пьезоэлектрический и др.), используемые для обнаружения пестицидов.

Разработка биосенсора с применением биологического элемента с преобразователем открывает возможность для быстрого и качественного определения широкого спектра пестицидов. В то время как традиционные устройства позволяют определять обнаруживать количественное содержание пестицидов. Быстрый прогресс в развитии биосенсоров отмечается в течение 21 века. Зарубежными учеными разработаны биосенсоры для определения пестицидов с применением различных биосенсорных элементов и множества различных методов иммобилизации.

Иммуносенсорные технологии также обладают большим потенциалом для быстрого обнаружения остаточных количеств пестицидов в продуктах питания и объектах окружающей среды [63, 70, 71].

Как отмечают ученые, микробные биосенсоры применяются в определении пестицидов и их свойства аналогично ферментным биосенсорам. Но, в сравнении с ферментными биосенсорами одним из их недостатков является длительность анализа и низкая селективность. Так, российскими учеными разработан БПК-биосенсор с иммобилизацией бактерии *Pseudomonas veronii* методом капсулирования в диализную мембрану. Как показали результаты исследования, разработанный БПК-биосенсор определяет

остаточное количество пестицидов с высокой точностью в образцах воды [72, 73].

В последние годы большое внимание зарубежными учеными уделяется разработке биосенсоров для определения различных ксенобиотиков, на основе ферментов. Для разработки биосенсоров проводятся исследования по усовершенствованию методов иммобилизации ферментов, различных методик измерения, электрохимических преобразователей сигналов. Как отмечают ученые, ферментативное обнаружение пестицидов основано на ингибировании отдельных групп ферментов таких, как органофосфатгидролаз, холинэстераз, аскорбатоксидаз, щелочной и кислой фосфатаз, альдегиддегидрогеназ, ацетолактатсинтаз. Все эти исследования направлены на создание высокочувствительных, селективных и стабильных биосенсоров для обнаружения пестицидов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды [74, 75].

В настоящее время одним из направлений исследования ученых является иммобилизация биоматериалов в многофункциональные носители, которые характеризуются хорошей селективностью, специфичностью, стабильностью, резистентностью, иницирующей активностью, эффективностью реакции, универсальностью, высоким каталитическим оборотом, простой извлечения и невысокой стоимостью.

Существует множество исследований зарубежных ученых по иммобилизации, например, внутримолекулярному химическому (ковалентному) присоединению, адсорбцией, инкапсуляцией, захвату и сшиванию.

Адсорбция один из самых простых методов иммобилизации, основанный на слабых связях, таких как силы Ван-дер-Вальса, электростатические и гидрофобные взаимодействия. Преимуществом адсорбции является простота и дешевизна из-за отсутствия необходимости в дополнительном реагенте и менее разрушительна для ферментативной активности. Однако ферменты иммобилизованные данным методом легко депонируются при изменении условий эксперимента таких, как температура, pH или ионная сила, из-за их слабой связи. Кроме того, неспецифическая адсорбция других субстратов на поверхности может привести к загрязнениям и помехам для сигнала.

Ковалентное связывание является одним из наиболее широко используемых методов и позволяет получить устойчивые комплексы между ферментами и носителями. Ковалентно иммобилизованные ферменты обладают более сильным связыванием по сравнению с адсорбцией, поэтому этот метод может обеспечить более стабильно иммобилизованные ферменты. Высокая однородность S-аденозилметионин и контроль количества иммобилизованного фермента также являются преимуществами ковалентной иммобилизации. Несмотря на ряд сильных сторон, образование ковалентной связи влияет на активность иммобилизованных ферментов, и для этого метода требуется большое количество биоматериала.

Захват не прекрепляется напрямую, а захватывается полимерами, что сохраняет пространство, в котором субстраты и продукты свободно диспергируются. Полимеризацию проводят в смеси ферментов и мономеров для улавливания ферментов. Захват не является химическим взаимодействием, в отличие от ковалентной связи, и придает ферментам высокую стабильность и минимизацию выщелачивания.

Межмолекулярная поперечная связь между ферментами также образуют трехмерный ферментный комплекс за счет ковалентной связи. Для образования поперечных связей между ферментами свободные аминокислотные остатки лизина в ферментах реагируют с таким реагентом, как глутаровый альдегид. Такой подход к иммобилизации ферментов путем перекрестного связывания повышает эффективность и стабильность из-за очень прочной и стабильной связи между ферментами. Как отмечают, зарубежные ученые, что такая связь, которая образует трехмерный ферментный комплекс за счет ковалентной связи является наиболее перспективной и приемлемой для определения пестицидов в объектах исследований.

То есть, из-за преимуществ иммобилизации, биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов широко используются в различных областях применения, таких как биомедицинские приложения, обнаружения загрязнителей окружающей среды, мониторинг безопасности пищевых продуктов, промышленный мониторинг биопроцессов.

Таким образом, зарубежные ученые уделяют большое внимание разработке биосенсоров с применением различных методов иммобилизации и конструированию биосенсоров. Все эти исследования направлены на взаимодействие между вспомогательными материалами в целом и интересующими биоматериалами (ферменты, ткани, клетки, микроорганизмы и др.)

Для иммобилизации молекулы биоматериала важными составляющими является молекула-мишень, матрица и процедура связывания. Прикрепление может происходить посредством взаимодействия, варьирующихся от физической адсорбции до стабильных связующих связей. Для этого применяются различные методы [76, 77, 78, 79, 80].

В биосенсорах для определения пестицидов на основе ингибирования ферментов биологическими рецепторами обычно являются ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза или уреазы. Фосфорорганические и карбаматные пестициды селективно ингибируют холинэстеразу, блокируя серин в активном центре посредством нуклеофильной атаки с образованием фосфоэфирасерина.

Общий принцип разрабатываемых биосенсоров основан на корреляции между токсичностью пестицидов и снижением активности ферментов. Следовательно, разработка ферментных биосенсоров основывается на качественном и количественном измерении активности фермента до и после воздействия целевого аналита.

Биосенсор на основе ингибирования ферментов включает следующие этапы:

- определение начальной удельной активности фермента;
- инкубация биосенсоров в растворе, содержащем пестициды;
- измерение остаточной удельной активности фермента после воздействия пестицида [81, 82, 83].

Так, зарубежными учеными на данной основе разработан мультибиосенсор с матрицей ISFET и нескольких биоселективных элементов ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы, глюкозооксидазы и уреазы. Разработанный мультибиосенсор предназначен для экспресс-интегрального и селективного определения загрязнителей объектов окружающей среды [84].

Еще одним современным достижением в разработке биосенсора является применение нанотехнологий. Применение наноматериалов при разработке биосенсоров улучшает специфичность, чувствительность и пределы обнаружения токсичных элементов за считанные минуты. Новые материалы, такие как углеродсодержащие вещества (углеродные нанотрубки, графен, технический углерод и другие) и неуглеродсодержащие вещества в виде наночастиц, стержней или пористых материалов применяются для получения наноканалов и для объединения наноканалов с наночастицами, что позволяет расширить область их применения и повышает их чувствительность. При этом при разработке биосенсоров с применением нанотехнологии необходимо подбирать pH-среду и температуру, поскольку эти параметры являются ключевыми аспектами при проектировании и оптимизации сенсорных систем.

Как отмечают, зарубежные ученые неорганические наноматериалы получили широкое распространение в производстве пищевых продуктов, вместе с тем остаются неизвестными риски для здоровья при использовании неорганических материалов при проектировании биосенсоров [85, 86, 87, 88].

В современной практике уделяется применению нанокompозитов на основе серебра при проектировании биосенсоров. Так, зарубежными учеными был спроектирован новый амперометрический АХЭ-биосенсор на основе сопряженного полимера и нанокompозита Ag-rGO-NH₂. Вначале на поверхности электрода электрохимически полимеризовали 4,7-ди (фуран-2-ил) бензотиадиазол (ФБТФ). Затем на поверхности полимерной мембраны модифицируют нанокompозит Ag-rGO-NH₂ и ацетилхолинэстеразу (АХЭ). Свежеприготовленный биосенсор обладал отличной проводимостью, каталитической активностью и биосовместимостью, что объяснялось синергетическим действием 4,7-ди (фуран-2-ил) бензотиадиазола и нанокompозита Ag-rGO-NH₂ и обеспечивало гидрофильную поверхность для адгезии ацетилхолинэстеразы. Расчетный предел обнаружения для карбофоса составил 0,099-9,9 мкг/л, для трихлорфона – 0,0206-2,06 мкг/л [89].

Как отмечают зарубежные ученые, проектирование биосенсоров для контроля содержания токсичных элементов в пищевых продуктах на основе нанотехнологии является актуальным направлением. Вместе с тем актуальными

остаются также научные разработки определения пестицидов с применением ферментных биосенсоров.

Уделяется большое внимание применению ферментов для определения пестицидов как в растворимой, так в иммобилизованной форме. Ферментные биосенсоры обладают свойством, которые могут обеспечить удобное, быстрое, чувствительное и дешевое обнаружение пестицидов с помощью ацетилхолинэстеразы в полевых условиях [88, 90, 91, 92].

Разработка ферментных биосенсоров основывается на качественном и количественном измерении активности фермента до и после воздействия целевого аналита. При этом разработка диагностических платформ для определения пестицидов на основе изменения цвета, особенно важна, в местах с ограниченными ресурсами.

Разработанные биосенсоры с иммобилизованным ферментом ацетилхолинэстераза можно применять для постановки ферментативной реакции в молоке для определения остаточного количества фосфорорганических пестицидов [93, 94].

1.4 Современные технологические способы понижения токсических веществ в пищевых продуктах

Пестициды, применяемые в агропромышленном комплексе, при многократном их использовании даже при низкой дозе наносят вред не только объектам окружающей среды, но и в конечном итоге, здоровью человека. Действие отдельных пестицидов на организм человека изучен не до конца, но как отмечают зарубежные и отечественные ученые их накопление в живом организме может привести к возникновению различных заболеваний таких, как онкологические, сердечно-сосудистые заболевания, поражения нервной системы, внутренних органов человека и другое [95].

Основными путями поступления пестицидов в организм человека являются вода, воздух, пищевые продукты растительного и животного происхождения.

В настоящее время применяются различные способы детоксикации пестицидов в объектах окружающей среды, в пищевых продуктах и сырье животного и растительного происхождения. Так, для детоксикации малатиона применяют щелочной гидролиз, в результате которого получают диэтиловый эфир малеиновой (фумаровой) кислоты, то есть очень токсичный малаоксон не образуется. Детоксикацию малатиона проводят путем опрыскивания объектов его производства и хранения, а также плодоовощной продукции водным раствором щелочи при температуре 25 °С [96].

Для обнаружения и удаления остаточного количества пестицидов с объектов окружающей среды проводятся исследования по применению нанотехнологии. С этой целью применяются различные типы наноматериалов: то есть наночастицы металлов, биметаллические наночастицы и наночастицы

оксидов металлов; нанотрубки, такие как углеродные нанотрубки и галлуазитовые нанотрубки [97].

Для защиты сельскохозяйственных почв от различных пестицидов, учеными, выявлена возможность эффективной их детоксикации гербицидами совместно с активированным углем. Выбор активированного угля обоснован тем, что во-первых, он не оказывает вредного воздействия на рост и развитие растений и деятельность почвенной биоты, во-вторых – его способность эффективно связывать различные токсины экзогенного и эндогенного происхождения [98].

Для защиты сельскохозяйственных почв применяется также биоремедиационная технология, основанная на использовании микроорганизмов-деструкторов пестицидных препаратов. На основании проведенных исследований установлено, что из 20 тыс. промышленных и генетически-модифицированных штаммов микроорганизмов Национального биоресурсного центра (Министерства образования и науки РФ) только один штамм микроорганизма депонирован как деструктор пестицидных препаратов. В связи с этим, данный способ не получил широкого распространения [99].

Как отмечают многие ученые, микробная деградация как стратегия химического обеззараживания представляет собой новый биотехнологический подход, который считается безопасным и недорогим методом удаления пестицидов как с объектов окружающей среды, так и в пищевых продуктах. Деконтаминирующая активность пробиотических микроорганизмов связана с ферментацией, антибиозом и способностью клеточной стенки связываться с токсичными элементами. Применение потенциала микроорганизмов для химического обеззараживания перспективно и для молочной отрасли [100, 101].

В последние годы проводятся различные исследования по удалению пестицидов из сырья и пищевых продуктов животного и растительного происхождения.

С этой целью применяются различные технологические способы обработки сырья.

Так, для понижения содержания пестицидов в сельскохозяйственных культурах, как отмечают зарубежные ученые, влияют различные виды термической обработки, как пастеризация, стерилизация, бланширование, кипячение, варка, приготовление на пару и т.д. в зависимости от типа пестицида и продолжительности обработки. Однако, методы консервации, такие как сушка или обезвоживание во много раз увеличивают содержание пестицидов за счет увеличения сухих веществ. Такие методы технологической обработки сырья, как рафинация, ферментация и выдержка, в разной степени влияют на изменение содержания пестицидов в продуктах питания. Помол, виноделие, сололожение, пивоварение приводят к понижению содержания пестицидов в готовом продукте. В результате технологической обработки сырья растительного и животного происхождения возможно понижение содержания пестицидов в готовом продукте до 99%. Вместе с тем, требуется проведение предварительных экспериментальных исследований о степени

влияния технологического процесса на понижение содержания пестицидов, поскольку из-за физико-химических свойств различных пестицидов может наблюдаться их увеличение в готовом продукте [102, 103, 104].

В связи с этим, зарубежные ученые для очистки пищевых продуктов от пестицидов применяют различные инновационные технологии обработки сырья такие, как обработка высоким давлением, импульсные электрические поля, холодная плазма, сверхкритическая двуокись углерода, ультразвук, которые показывают очень хорошие результаты по понижению содержания микотоксинов и пестицидов в готовом продукте. Однако, механизмы действия инновационных технологий изучены в недостаточной степени и могут негативно повлиять на пищевую и биологическую ценность пищевых продуктов [105].

Среди продукции животного происхождения молоко и молочные продукты являются продуктами повседневного спроса. Загрязнение молока и молочных продуктов остатками пестицидов представляет серьезную опасность для потребителей. Молоко и продукты его переработки представляют собой хорошую среду для накопления хлорорганических и фосфорорганических пестицидов. Из-за своей устойчивости в окружающей среде и липофильных свойств данные пестициды и их метаболиты, как отмечают зарубежные ученые, обладают способностью накапливаться в молочном жире. Скорость экскреции пестицидов из вымени животного в молоко зависит от стадии лактации, массовой доли жира молочного сырья. В связи с этим, возникает необходимость не только строгого контроля за содержанием пестицидов в молоке и молочных продуктах, но и разработке различных технологических процессов, способствующих их устранению [106].

Такие технологические процессы переработки молока, как стерилизация, пастеризация, ферментация, обработка под высоким давлением приводит к значительному понижению диметоата и малатиона. При стерилизации молока наблюдается полное удаление малатиона, содержание диметоата снизилось до 73,42 %. Пастеризация понизило содержание в молоке диметоата на 75,72 %, малатиона на 95,99 %. При ферментации молока содержание диметоата понизилось на 86,5 %, малатиона – на 97,17 %.

Из изученных инсектицидов наиболее устойчивым к термической обработке, которые применяются при переработке молока, оказался метоксихлор.

Как отмечают зарубежные ученые, несмотря на проведенные научные исследования, для оценки влияния технологической обработки на уровне остаточных количеств пестицидов в продуктах питания, возникает необходимость в разработке систематического подхода для понимания механизма влияния различных технологических процессов и режимов на изменение содержания пестицидов и их метаболитов в пищевых продуктах, в том числе и молочных продуктах. Необходимо в зависимости от типа пестицида научно обосновать технологический процесс, который может обеспечить безопасность продуктов питания [107, 108, 109].

Также на процесс понижения пестицидов в молочных продуктах большое влияние оказывают процессы ферментации и коагуляции. Как показывают результаты экспериментальных исследований зарубежных ученых молочнокислые микроорганизмы могут принимать участие в процессе разложения пестицидов в молоке и молочных продуктах. При производстве йогурта содержание малатиона в первый день после сквашивания молочной смеси его концентрация составляла 0,220 мг/кг, через 7 дней – 0,098 мг/кг, через 14 дней – 0,015 мг/кг, соответственно процент снижения малатиона составила 56, 80 и 97 %.

Как показывают результаты исследования зарубежных ученых, из трех фосфорорганических пестицидов менее стабилен малатион в процессе ферментации молока и более стабильны диметоат, метилпаратион.

При производстве сыра процесс коагуляции, который сопровождается воздействием температуры, также влияет на понижение концентрации малатиона в готовом продукте. Остаточные уровни малатиона составляли 0,235 мг/кг и 0,195 мг/кг в первый и в седьмой день после обработки сырной массы, соответственно. В процессе созревания сыра содержание малатиона понизилось на 52 и 60%. Понижение концентрации малатиона в процессе производства сыра, как отмечают зарубежные ученые, наблюдается во время коагуляции и созревания сыров. Все это связано, предположительно, влиянием температуры нагревания, химической природой самого пестицида и связыванием их с сычужным ферментом и микроорганизмами. Также необходимо отметить, что процесс снижения концентрации малатиона продолжается во время хранения. Это объясняется тем, что в процессе хранения сыров развиваются микроорганизмы, которые могут разрушать некоторые фосфорорганические пестициды, в частности малатион [106, 110].

В последние годы уделяется большое внимание понижению концентрации токсичных элементов в молоке с применением природного минерала – цеолита.

Так, для понижения содержания тяжелых металлов и радионуклидов в молоке, отечественными учеными, были проведены ряд экспериментальных исследований. Для проведения исследования был разработан экспериментальный стенд для фильтрации молока. В качестве фильтрующего материала был применен природный цеолит Тарбагатайского месторождения Восточно-Казахстанской области.

Как показали результаты исследований фильтрации молока на экспериментальном стенде при температуре 18-20 °С и частоте оборотов насоса 5 с⁻¹ при содержании в фильтрующей колонке 200 г цеолита концентрация кадмия в молоке понизилась от 0,024 до 0,006 мг/л, свинца же – от 0,116 до 0,066 мг/л. Содержание радионуклидов (цезия и стронция) в молоке также понизилась в процессе фильтрации на экспериментальном стенде. Так, содержание цезия изменилось от 7,7 Бк/кг до 0,6 Бк/кг, стронция же - от 13,3 Бк/кг до 0,05 Бк/кг.

На основании проведенных исследований, отечественными учеными, было установлено, что природные цеолиты обладают хорошей адсорбционной способностью в отношении солей тяжелых металлов и радионуклидов [111, 112, 113, 114].

На основании сорбционных свойств природных цеолитов зарубежными учеными был разработан электрохимический метод, созданный на основе цеолит-модифицированных электродов из углеродной пасты, для определения пестицидов в молоке, в овощах и фруктах. Показатели извлечения остаточного количества пестицидов в молоке находились в диапазоне 98,6-99,8%, в образцах овощей и фруктов диапазон извлечения пестицидов для восьми пестицидов составил 0,003-0,033 мг/кг, что указывает на то, что данный метод применим для количественного определения пестицида [115, 116, 117].

В мировой практике природный цеолит нашел широкое применение для удаления токсичных элементов из воды, почвы, растений, сырья животного и растительного происхождения и пищевых продуктов, благодаря его адсорбирующим и ионообменным свойствам. Также цеолит применяется в медицине, как сорбент. Так, при проведении зарубежными учеными преclinical испытаний на подопытных крысах, предварительно отравленных пестицидом, установлено, что после перорального введения крысам 1г/кг клиноптилолита наблюдается значительное ингибирование холинэстеразы.

Адсорбирующие и ионообменные свойства цеолита объясняются наличием полостей, каналов в кристаллической структуре цеолита и достаточно большой свободой движения катионов. Цеолит адсорбирует молекулы различных веществ, размер которых не превышает диаметр входных пор-окон. Ионообменные свойства цеолита проявляются в результате химико-физического процесса, при котором катион в кристаллической структуре цеолита заменяется ионами раствора аналогичного размера и электростатических свойств.

Наибольшее практическое применение во всех областях человеческой деятельности нашли такие виды цеолита, как клиноптилолит, гейландит, морденит, шабазит и филлипсит [118, 119, 120, 121].

Учитывая уникальные свойства цеолитов зарубежные ученые проводят исследования по их применению не только для определения пестицидов, но и для удаления остатков пестицидов с объектов окружающей среды и пищевых продуктов.

В природе остатки пестицидов подвергаются химическому, физическому и биохимическому разложению, но из-за их повышенной стабильности и в некоторых случаях растворимости в воде остатки пестицидов сохраняются в экосистеме. Для удаления остатков пестицидов применяются различные методы, которые варьируются от биоремедиации с использованием микроорганизмов, глины, активированного угля и полимерных материалов до химической обработки на основе процессов окисления. Но, данными методами удаляются только некоторые типы пестицидов. Вместе с тем основным недостатком применения указанных технологий удаления пестицидов является

длительность проведения исследования из-за высокой сложности биологических систем, привлечение к проведению экспертизы специалистов в области биологии, химии и инженерии, высокая стоимость применяемых методов.

В связи с этим, научные исследования, направленные на удаление остатков пестицидов из объектов окружающей среды, сырья животного и растительного происхождения, пищевых продуктов с применением природных цеолитов являются актуальным направлением [122].

Так, для удаления трех видов фосфорорганических пестицидов (ацефата, омтозата, метилпаратиона) из воды синтезирован композит хитозан/цеолит-А, который охарактеризован как многофункциональный, экологически чистый и усиленный адсорбент.

Синтезированный композит на основе природного цеолита достиг максимальной емкости адсорбирования для ацефата 650,7 мг/кг, для омтозата – 506,5 мг/кг, для метилпаратиона – 560,8 мг/кг. Таким образом, адсорбционные свойства композита в виде неподвижного слоя (6 см) в колоночных системах и скорости потока 5мл/мин позволили удалить из воды 78 % ацефата, 57,6% омтозата и 74,3% метилпаратиона. При этом, композит на основе природного цеолита продемонстрировал значительную стабильность и возможность повторного их применения при удалении данных пестицидов [123].

Для удаления фосфорорганического пестицида из сточных вод был применен природный цеолит. Адсорбционные свойства цеолита в отношении пестицида были исследованы в сравнении с активированным углем. Определение процесса и свойств адсорбции проводили методом фильтрации в периодической адсорбционной колонке при рН раствора от 3 до 11, начальной концентрации пестицидов от 5 до 20 мг/л, температуре 25-55 °С и времени контакта с адсорбентом 10-350 мин. Результаты исследования показали, что при всех режимах фильтрации содержание пестицида в сточной воде уменьшалось за счет применения в качестве адсорбента цеолита в большей степени, чем при применении активированного угля. Зарубежные исследователи отмечают перспективность применения цеолита для удаления пестицидов из объектов окружающей среды за счет их местной доступности и низкой стоимости проведения процесса очистки [124]. Вместе с тем отмечается, что дополнительная щелочная обработка цеолита повышает эффективность адсорбции пестицидов [125].

Как отмечают зарубежные ученые к основным факторам понижения содержания пестицидов в объектах исследования относятся адсорбция и каталитическое разложение малатиона. При каталитическом разложении малатиона образуются экологически безопасные малатион монокарбоновая, малатион дикарбоновая кислота и диметилдитиофосфат. Также отмечается, что при применении цеолита в процессе разложения малатиона более токсичный малоксон не обнаружен.

На скорость процесса удаления малатиона влияют как адсорбционная, так и каталитическая активность цеолита. Вместе с тем, на скорость удаления

малатиона влияют соотношение Si/Al цеолита, количество обменных ионов Na⁺ в каркасе цеолита и концентрация малатиона в исследуемых объектах. Так, при низких концентрациях малатиона от 5000 до 10000 мкг/кг в воде они полностью поглощались цеолитом.

Таким образом, зарубежные ученые отмечают, что как адсорбция на каркасе цеолита, так и процессы каталитического разложения способствуют диссипативному поведению малатиона и продуктов его разложения [126].

Как отмечают зарубежные ученые цеолит может найти широкое практическое применение во многих отраслях науки и промышленности, а также могут быть использованы в качестве альтернативы активированному углю – природными минеральному адсорбенту при очистке воды. Эффективность применения цеолита обусловлена широким спектром уникальных свойств (абсорбционные, каталитические, антиоксидантные, регенерирующие, антибактериальные), высокой экологической безопасностью и относительно низкой стоимостью фильтров на основе цеолита, а также наличием обширной отечественной сырьевой базы месторождения цеолита. Все эти факторы способствуют дальнейшему расширению использования цеолита [127, 128].

Таким образом, для удаления остатков пестицидов применяются различные методы, которые варьируются от биоремедиации с использованием микроорганизмов, глины, активированного угля и полимерных материалов до химической обработки на основе процессов окисления. Но, данными методами удаляются только некоторые типы пестицидов. Вместе с тем основным недостатком применения указанных технологий удаления пестицидов является длительность проведения исследования из-за высокой сложности биологических систем, привлечение к проведению экспертизы специалистов в области биологии, химии и инженерии, высокая стоимость применяемых методов. В связи с этим, наиболее перспективным направлением понижения содержания пестицидов в объектах окружающей среды, в сырье растительного и животного происхождения и в пищевых продуктах наиболее актуальным является применение цеолитов в качестве адсорбента. Как отмечают зарубежные и отечественные ученые к основным факторам понижения содержания пестицидов с помощью цеолита в объектах исследования относятся адсорбция и каталитическое разложение пестицидов.

Выводы по литературному обзору

На современном этапе развития сельского хозяйства пестициды применяются для борьбы с вредителями и болезнями растений, для уничтожения сорных трав. Соблюдение санитарно-гигиенических норм использования пестицидов регламентируется нормативно-правовыми актами РК для предупреждения отравлений ядохимикатами и профилактики загрязнений объектов окружающей среды [3].

Применение пестицидов и гербицидов для повышения урожайности сельскохозяйственных культур является всемирным явлением. Так как их

использование в соответствии с рекомендациями Codex Alimentarius в области распространения и применения пестицидов считается безопасным при соблюдении правил их безопасного использования и хранения. Неправильное применение пестицидов влияет на экосистему из-за их накопления в пищевой цепи и в грунтовых водах, а их долгосрочное применение, даже при малых дозах могут привести к серьезным последствиям. В связи с этим проводятся исследования по замене традиционного земледелия органическим земледелием.

Вместе с тем для того, чтобы продукты сельскохозяйственного производства были доступны для всех слоев населения в современном мире традиционная технология обработки земельных угодий с применением ядохимикатов остается актуальной, в том числе и в Казахстане.

В Республике Казахстан в агропромышленном комплексе применяются органические пестициды, в том числе хлорорганические, фосфорорганические, которые относятся к опасным ядохимикатам.

Необходимо отметить, что не только нарушение норм применения пестицидов в агропромышленном комплексе негативно влияет на объекты окружающей среды и на здоровье человека. Как показывают исследования зарубежных и отечественных ученых пестициды обладают способностью накапливаться в живых организмах, длительное время сохраняются в почве и в растениях после их обработки, а также при длительном и многократном применении пестицидов у вредных объектов вырабатывается устойчивость к их воздействию.

Проблема загрязнения пестицидами объектов окружающей среды даже при низкой дозе, но при многократном использовании пестицидов, является актуальной и масштабной во всем мире. Так как органические пестициды воздействуют на живой организм, ингибируя активность фермента ацетилхолинэстеразы в нервной системе, вследствие чего повышается уровень ацетилхолина, что вызывает повышенное возбуждение, мышечный паралич, блокировку дыхательного центра и повышает сердцебиение у человека. Пестициды при попадании в пищеварительный тракт, могут вызвать несколько видов рака за счет воздействия на организм канцерогенных веществ.

Учитывая, негативное воздействие пестицидов на объекты окружающей среды и на здоровье человека, исследования остаточного содержания пестицидов в объектах окружающей среды и в живых организмах является актуальными в современном мире.

В настоящее время ведется множество исследований по разработке ускоренного метода определения пестицидов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах. Такие экспресс-методы необходимы для ускоренного определения уровня содержания ядохимикатов даже в полевых условиях. Хотя до сих пор применяются классические аналитические методы (газовая хроматография, жидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез и масспектрометрия) для анализа пестицидов в загрязненных образцах. Данные методы имеют свои недостатки такие, как трудоемкость пробоподготовки, сложность методики определения,

наличие дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала. В связи с этим возрастает потребность в аналитических методах, которые способны обеспечить простое, быстрое, чувствительное, селективное, и самое главное, недорогой и надежный метод определения остаточных количеств пестицидов [63].

Одним из таких методов является проектирование ферментных биосенсоров для определения остаточного количества пестицидов. Ферментные биосенсоры обладают свойством, которые могут обеспечить удобное, быстрое, чувствительное и дешевое обнаружение пестицидов с помощью ацетилхолинэстеразы в полевых условиях [88, 90, 91, 92].

Разработка ферментных биосенсоров основывается на качественном и количественном измерении активности фермента до и после воздействия целевого аналита. При этом разработка диагностических платформ для определения пестицидов на основе изменения цвета, особенно важна, в местах с ограниченными ресурсами.

Разработанные биосенсоры с иммобилизованным ферментом ацетилхолинэстераза можно применять для постановки ферментативной реакции в молоке для определения остаточного количества фосфорорганических пестицидов [93, 94].

Как было описано выше основными путями поступления пестицидов в организм человека являются вода, воздух, пищевые продукты растительного и животного происхождения.

В настоящее время применяются различные способы детоксикации пестицидов в объектах окружающей среды, в пищевых продуктах и сырье животного и растительного происхождения.

В связи с этим, зарубежные ученые для очистки пищевых продуктов от пестицидов применяют различные инновационные технологии обработки сырья, как обработка высоким давлением, импульсные электрические поля, холодная плазма, сверхкритическая двуокись углерода, ультразвук, которые показывают очень хорошие результаты по понижению содержания микотоксинов и пестицидов в готовом продукте. Однако, механизмы действия инновационных технологий изучены в недостаточной степени и могут негативно повлиять на пищевую и биологическую ценность пищевых продуктов [105].

Также для удаления остатков пестицидов применяются различные методы, которые варьируются от биоремедиации с использованием микроорганизмов, глины, активированного угля и полимерных материалов до химической обработки на основе процессов окисления. Но, данными методами удаляются только некоторые типы пестицидов. Вместе с тем основным недостатком применения указанных технологий удаления пестицидов является длительность проведения исследования из-за высокой сложности биологических систем, привлечение к проведению экспертизы специалистов в области биологии, химии и инженерии, высокая стоимость применяемых методов.

В связи с этим, наиболее перспективным направлением понижения содержания пестицидов в объектах окружающей среды, в сырье растительного и животного происхождения и в пищевых продуктах наиболее актуальным является применение цеолитов в качестве адсорбента. Как отмечают зарубежные и отечественные ученые к основным факторам понижения содержания пестицидов с помощью цеолита в объектах исследования относятся адсорбция и каталитическое разложение пестицидов.

2 МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Методология и выбор направления исследования

В диссертационной работе для достижения поставленной цели исследования проводились с применением теоретических и эмпирических уровней познания.

В теоретической части диссертационной работы рассмотрены современные аспекты различных методов определения ксенобитиков в сырье и пищевых продуктах, а именно:

- современные тенденции применения пестицидов в качестве инсектицида и акарицида в сельском хозяйстве;
- токсикологическое воздействие химических удобрений и средств защиты растений на организм человека;
- актуальные направления совершенствования методов определения пестицидов в объектах окружающей среды и пищевых продуктах;
- перспективные направления применения биологических материалов при разработке биосенсорных тест-систем.

Результаты теоретических исследований позволили определить основные направления экспериментальных исследований.

Экспериментальные исследования диссертационной работы, как один из методов эмпирического уровня познания, были проведены по следующим направлениям:

- исследование для обоснования выбора ферментов для разработки тест-системы с иммобилизованным ферментом;
- исследование для обоснования выбора метода и материала для иммобилизации ферментов;
- исследование и разработка биосенсорной тест-системы на основе иммобилизованного фермента для определения карбофоса в молоке;
- исследование изменения содержания карбофоса в процессе фильтрации молока с использованием цеолита;
- разработка технологии творога и исследование показателей безопасности и качества готового продукта.

Экспериментальные исследования были проведены на базе лабораторий научного центра «Пищевая биотехнология» Государственного университета имени Шакарима г. Семей, испытательной лаборатории филиала АО «НаЦЭкС» города Семей.

В качестве объектов исследования были использованы молоко, ферменты, фосфорорганический пестицид (карбофос), биосенсорная тест-система, творог.

Математическая обработка данных экспериментальных исследований проведены с помощью метода математической статистики.

Экспериментальные исследования были проведены по схеме, показанной на рисунке 1.

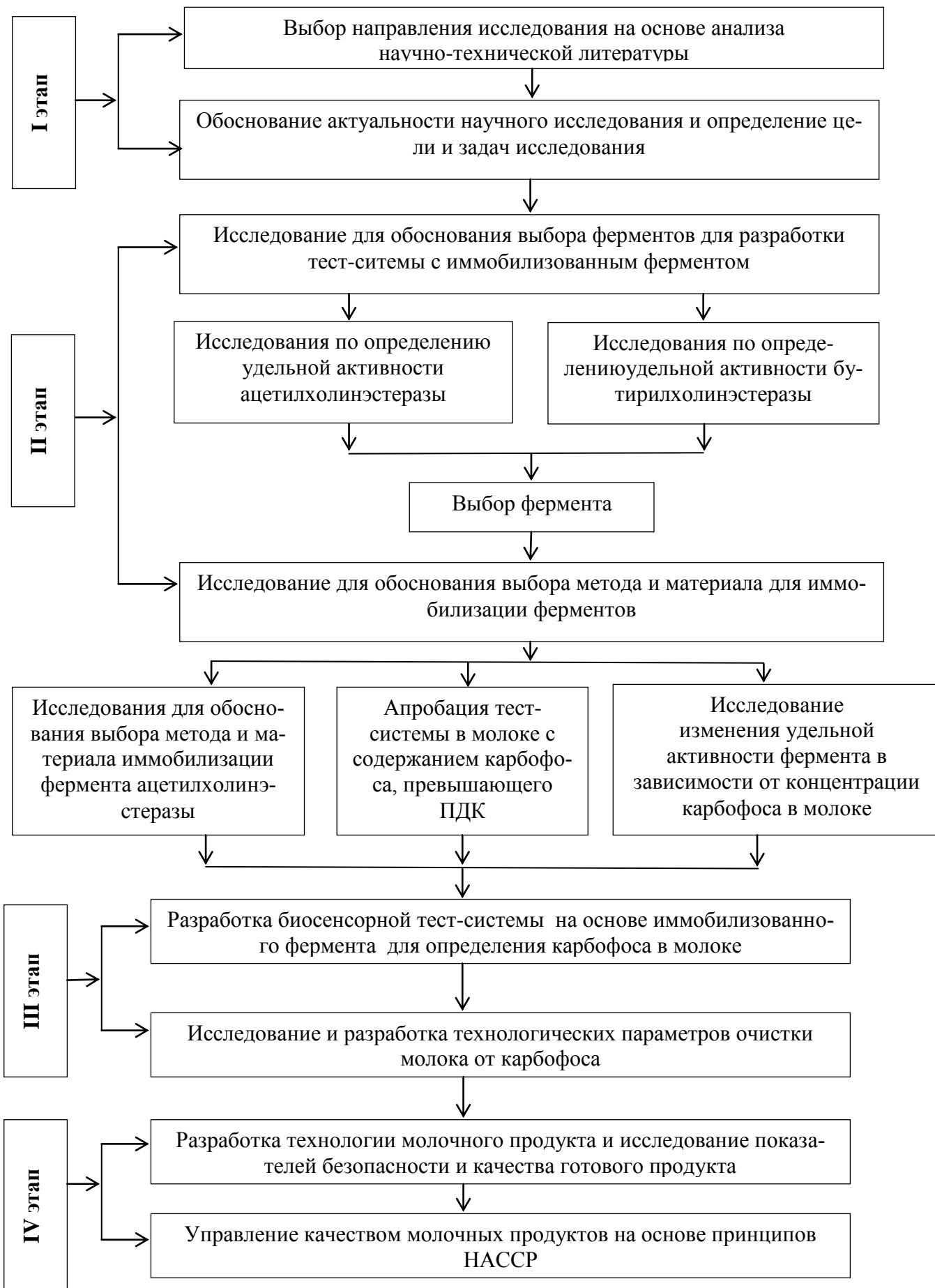


Рисунок 1 – Схема проведения эксперимента

2.2 Методы и объекты исследования

2.2.1 Физико-химические и органолептические методы исследования:

- массовая доля влаги и сухих веществ по ГОСТ 3626-73;
- массовая доля жира по ISO 2446:2008 (IDF 226: 2008);
- массовая доля белка по ГОСТ 23327-98;
- титруемая кислотность по ГОСТ 3624-92;
- определение фосфатазы и пероксидазы по ГОСТ 3623-73;
- микробиологические показатели по ГОСТ 9225-84.

2.2.2 Методы исследования показателей безопасности:

- свинца - по ГОСТ 26932. ГОСТ 30178. ГОСТ 30538;
- мышьяка - по ГОСТ 30538;
- кадмия - по ГОСТ 26933, ГОСТ 30178. ГОСТ 30538;
- ртути - по ГОСТ 26927;
- пестицидов - по ГОСТ 23452;
- микотоксинов (афлатоксина М1) - по ГОСТ 30711;
- бактерий группы кишечных палочек - по ГОСТ 9225, 30518;
- staphylococcus aureus - по ГОСТ 30347;
- бактерий рода Salmonella - по ГОСТ 30519;
- молочнокислых микроорганизмов - по ГОСТ 10444.11.

2.2.3 Спектрофотометрическим методом определена удельная активность ферментов с помощью фотоколориметра КФК-5 на основании методики Филипповой А.М., Воробьевой О.В. [131].

К 0,1 мл водного раствора фермента ацетилхолинэстеразы добавляли 2 мл буферного раствора с рН 8,4 и термостатировали в течение 30 минут при температуре 37⁰С. Параллельно термостатировали подготовленный 2%-ный водный раствор ацетилхолинхлорида, используемого в качестве субстрата.

Для постановки ферментативной реакции к исследуемому раствору ацетилхолинэстеразы добавляли 0,5 мл 2%-ого раствора ацетилхолин хлорида, далее смесь подвергали инкубированию в течение 30 минут при температуре 37⁰С. По окончании реакции в пробирку вносили 2,1 мл дистиллированной воды и 0,3 мл индикатора фенолового красного (0,02%-ый водный раствор). Оптическую плотность образца оценивали по малиновой окраске на ФЭК - КФК – 5 при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Количество выделившейся уксусной кислоты определяли по калибровочному графику.

Расчет удельной активности холинэстеразы произведен по формуле (1):

$$A = \frac{V_{(HAc)}}{V_{(ChE)}} \quad (1)$$

где: $V_{(HAc)}$ – моль уксусной кислоты, моль;

$V_{(ChE)}$ – объем раствора фермента, мл.

2.2.4 Потенциометрическим методом определена активная кислотность полученных гелей на основе желатина, низкометилованного пектина и альгината натрия.

2.2.5 Эффективная вязкость полимеров на основе желатина, низкометилованного пектина и альгината натрия определена на ротационном вискозиметре по ГОСТ 25276-82.

2.2.6 Апробация тест-системы в образцах молока.

- к 10 мл дистиллированной воды добавляли 0,1 г карбофоса с получением раствора с процентной концентрацией 0,99 %. Концентрацию полученного раствора рассчитываем по формуле (2):

$$\omega = \frac{m_{в-в}}{m_{р-р}} \times 100 \%, \quad (2)$$

где: $m_{в-в}$ - масса вещества, г;

$m_{р-р}$ - масса полученного раствора, г.

- 0,1 мл полученного раствора разбавили водой до объема 100 мл для уменьшения концентрации карбофоса в растворе до $99 \times 10^{-6} \%$;

- для получения образцов молока с содержанием в нем карбофоса 0,03 мг/кг в молоко добавляли 3 мл $99 \times 10^{-6} \%$ раствора; для 0,05 мг/кг - в молоко добавляли 5 мл $99 \times 10^{-6} \%$ раствора; для 0,07 мг/кг - в молоко добавляем 7 мл $99 \times 10^{-6} \%$ раствора; для 0,09 мг/кг - в молоко добавляли 9 мл $99 \times 10^{-6} \%$ раствора; для 0,12 мг/кг - в молоко добавляли 12 мл $99 \times 10^{-6} \%$ раствора.

2.2.7 Математическая обработка результатов экспериментальных исследований проводилась методом математической статистики с расчетом коэффициента детерминации.

3 ИССЛЕДОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

3.1 Обоснование выбора ферментов для разработки тест-системы с иммобилизованным ферментом

При создании биосенсорной системы типа тест-системы основное значение приобретает иммобилизация ферментов.

На основании анализа литературных источников установлено, что основным преимуществом применения иммобилизованных ферментов при формировании биокатализаторов в виде гелей, капсул, мембран и других является сохранение их удельной активности при длительном хранении в сравнении с растворимым ферментом [129,130].

Для иммобилизации ферментов при создании биосенсорных тест-систем определения фосфорорганических пестицидов в объектах окружающей среды исследователями в качестве биокатализатора использовались в основном ферменты из класса гидролаз, а именно, ацетилхолинэстеразы или бутирилхолинэстеразы [130, 1, 131, 132].

Поскольку, молоко является сложной полидисперсной системой, то важным фактором является выбор фермента с более высокой удельной активностью. По данным литературных источников гидролитические ферменты (ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы) обладают высокой чувствительностью к ингибирующим свойствам карбофоса, которая проявляется в понижении удельной активности фермента. В связи с этим в данной работе при разработке биосенсорной тест-системы предполагается использовать, именно данные гидролитические ферменты, для определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов, в частности, карбофоса в молоке.

На основании вышеизложенного в данном разделе поставлена задача – исследование и выбор фермента для разработки тест-систем по результатам определения их удельной активности в молочной среде.

Для обоснования выбора фермента при разработке тест-системы проведены исследования по определению удельной активности двух гидролитических ферментов: ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы.

Анализ литературных источников показал, что для исследования по определению остаточных количеств фосфоорганического пестицида в объектах окружающей среды, разработана методика Филипповой А.М., Воробьевой О.В., которая основано на количественном определении уксусной кислоты, образующейся из ацетилхолинхлорида в результате ферментативной реакции с ацетилхолинэстеразой [131].

Необходимо отметить, что для определения остаточных количеств фосфоорганического пестицида в молоке данная методика может быть не специфичной, так как оценка содержания пестицида определяется по снижению удельной активности фермента. Удельная же активность фермента по данной

методике оценивается по концентрации выделившейся уксусной кислоты, которая, в свою очередь определяется по содержанию ионов водорода, в результате изменения окраски индикатора - фенолового красного на ФЭК - КФК – 5 при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Вместе с тем необходимо отметить, что в молоке содержатся ионы водорода, которые возможно могут повлиять на результаты исследования.

В связи с этим, для оценки достоверности полученных результатов определения удельной активности ацетилхолинэстеразы по методике Филипповой А.М., Воробьевой О.В. параллельно были проведены ряд исследований по подбору реактива для проведения качественной реакции на ацетат-анион, которая позволит определить количество выделившейся уксусной кислоты.

На основании проведенных исследований в качестве реагента для определения концентрации уксусной кислоты по ацетат-аниону был выбран хлорид трехвалентного железа (FeCl_3).

На начальном этапе исследования было проведено исследование определения удельной активности фермента ацетилхолинэстеразы по методике Филипповой А.М., Воробьевой О.В. в водной среде.

Методика проведения эксперимента заключается в следующем:

- подготовка буферного раствора (рН 8,4), (6,2 мл раствора тетрабората натрия с концентрацией 0,05 моль/л смешивали с 3,8 мл раствора соляной кислоты с концентрацией 0,1 моль/л);
- подготовка водного раствора фермента ацетилхолинэстеразы (15 мг в 10 мл дистиллированной воды);
- подготовка 2%-ого водного раствора ацетилхолин хлорида, (4 г ацетилхолина растворяли в 10 мл дистиллированной воды);
- подготовка водного раствора хлорида трехвалентного железа (1 г сухого FeCl_3 растворяли в 100 мл дистиллированной воды).

К 0,1 мл водного раствора фермента ацетилхолинэстеразы добавляли 2 мл буферного раствора с рН 8,4 и термостатировали в течение 30 минут при температуре 37⁰С. Параллельно термостатировали подготовленный 2%-ый водный раствор ацетилхолинхлорида, используемого в качестве субстрата.

Для постановки ферментативной реакции к исследуемому раствору ацетилхолинэстеразы добавляли 0,5 мл 2%-ого раствора ацетилхолин хлорида, далее смесь подвергали инкубированию в течение 30 минут при температуре 37⁰С. По окончании реакции в пробирку вносили 2,1 мл дистиллированной воды и 0,3 мл индикатора фенолового красного (0,02%-ый водный раствор). Оптическую плотность образца оценивали по малиновой окраске на ФЭК - КФК – 5 при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Количество выделившейся уксусной кислоты определяли по калибровочному графику (рисунок 2).

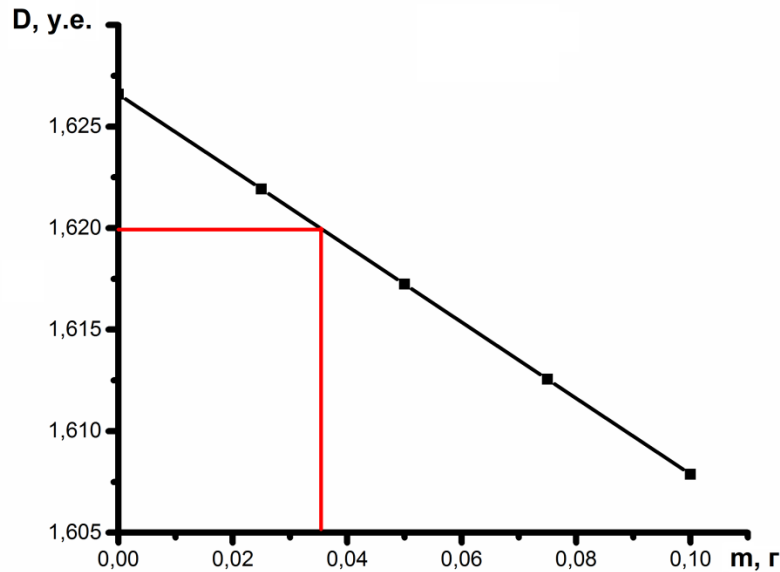


Рисунок 2 – Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от массы уксусной кислоты в растворе с индикатором феноловым красным

На основе анализа калибровочного графика рисунка 2 установлено, что при оптической плотности раствора субстрата с ферментом 1,62 условных единиц масса уксусной кислоты в растворе составила 0,035 г.

Для расчета количества молей уксусной кислоты необходимо массу образовавшейся кислоты разделить на молярную массу уксусной кислоты - 60:

$$0,035/60=0,58*10^{-3} \text{ моль} = 0,58 \text{ ммоль}$$

Далее производим расчет удельной активности холинэстеразы по формуле:

$$A = \frac{V_{(HAc)}}{V_{(ChE)}} \quad (3)$$

где: $V_{(HAc)}$ – моль уксусной кислоты;

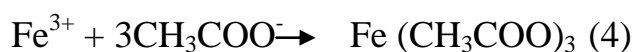
$V_{(ChE)}$ – масса фермента, мл.

Удельная активность фермента ацетилхолинэстеразы, рассчитанная по формуле (1), составила:

$$A = \frac{0,58 \text{ ммоль}}{0,1 \text{ мл}} = 5,8 \text{ ммоль/мл}$$

Для доказательства полученных результатов наличия в растворе продуктов разложения субстрата ацетилхолина, а именно концентрации

уксусной кислоты, нами было предложено в методике Филипповой А.М., Воробьевой О.В. заменить индикатор феноловый красный на реагент (хлорид трехвалентного железа (FeCl_3)), который позволил бы определить содержание уксусной кислоты по ацетат-аниону:



Исследования были проведены по вышеуказанной методике, однако вместо индикатора фенолового красного был применен реагент хлорид трехвалентного железа (FeCl_3).

Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от массы уксусной кислоты в растворе представлен на рисунке 3.

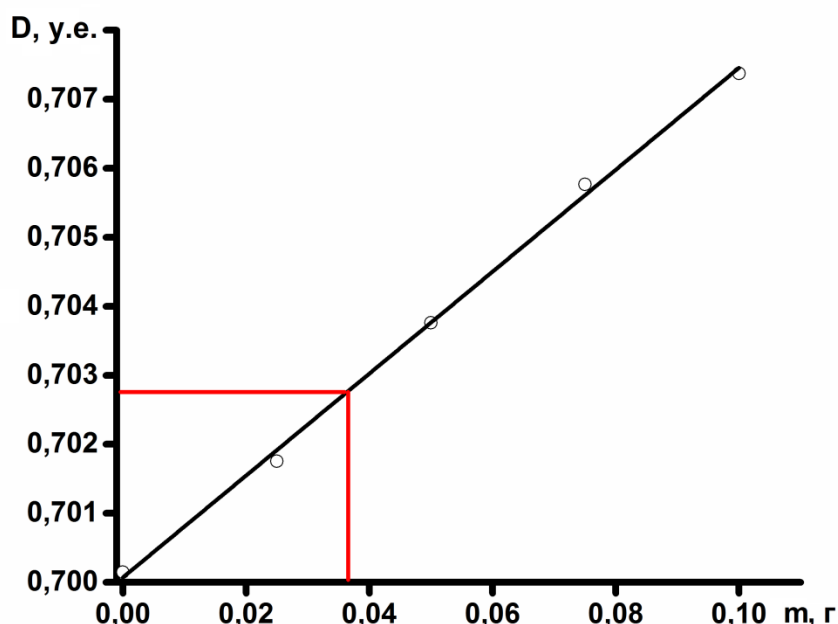


Рисунок 3 – Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от массы уксусной кислоты в растворе с индикатором хлорид трехвалентного железа

На основе анализа калибровочного графика рисунка 3 установлено, что при оптической плотности раствора субстрата с ферментом 0,7028 условных единиц масса уксусной кислоты в растворе составила 0,036 г.

Для дальнейшего расчета удельной активности фермента необходимо массу уксусной кислоты перевести в моль, для этого делим массу уксусной кислоты на молярную массу кислоты – 60:

$$0,036/60=6 \cdot 10^{-4} \text{ моль} = 0,6 \text{ ммоль}$$

Далее рассчитываем удельную активность по формуле (1)

$$A = \frac{0,60}{0,1 \text{ мл}} = 6,0 \text{ ммоль/мл(5)}$$

где 0,60 – моль уксусной кислоты,
0,1 – объем раствора фермента, мл.

В результате проведенных исследований установлено, что применение реагента хлорида трехвалентного железа для проведения качественной реакции вместо индикатора фенолового красного позволило получить показатель удельной активности фермента ацетилхолинэстеразы идентичный показателю, полученного по методике Филипповой А.М., Воробьевой О.В.

На втором этапе были проведены исследования по определению удельной активности бутилхолинэстеразы по методике (Филипповой А.М., Воробьевой О.В.) в объектах окружающей среды (в процессе ферментативной реакции субстрата бутирилхолина с ферментом).

Необходимо отметить, что для определения остаточных количеств фосфоорганического пестицида в молоке данная методика может быть также не специфичной, так как оценка содержания пестицида определяется по снижению удельной активности фермента. Удельная же активность фермента по данной методике оценивается по концентрации выделившейся масляной кислоты, которая, в свою очередь определяется по содержанию ионов водорода, в результате изменения окраски индикатора - фенолового красного на ФЭК - КФК – 5 при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Вместе с тем необходимо отметить, что в молоке содержатся ионы водорода, которые возможно могут повлиять на результаты исследования.

В связи с этим, для оценки достоверности полученных результатов определения удельной активности бутирилхолинэстеразы по известной методике также параллельно были проведены исследования с применением реагента хлорида трехвалентного железа (FeCl_3) вместо индикатора фенолового красного, который позволит определить количество выделившейся масляной кислоты.

Первоначально по нижеописанной методике была определена удельная активность бутирилхолинэстеразы в водной среде:

методика проведения эксперимента заключается в следующем:

- подготовка буферного раствора (рН 8,4), (6,2 мл раствора тетрабората натрия с концентрацией 0,05 моль/л смешивали с 3,8 мл раствора соляной кислоты с концентрацией 0,1 моль/л);
- подготовка водного раствора фермента бутилхолинэстеразы (15 мг в 10 мл дистиллированной воды);
- подготовка 2%-ого водного раствора бутирилхолин, (0,2 г бутирилхолина растворяли в 10 мл дистиллированной воды);
- подготовка водного раствора хлорида трехвалентного железа (1 г сухого FeCl_3 растворяли в 100 мл дистиллированной воды).

Ход работы:

К 0,1 мл водного раствора фермента бутирилхолинэстеразы добавляли 2 мл буферного раствора с рН 8,4 и термостатировали в течение 30 минут при температуре 37 °С. Параллельно термостатировали подготовленный 2%-ый водный раствор бутирилхолина, используемого в качестве субстрата.

Для проведения ферментативной реакции к раствору бутирилхолинэстеразы добавляли 0,5 мл 2%-ого раствора бутирилхолина, далее смесь подвергали инкубированию в течение 30 минут при температуре 37 °С. После чего в пробирку вносили 2,1 мл дистиллированной воды и 0,3 мл индикатора феноловый красный (0,02%-ый водный раствор). Для определения концентрации масляной кислоты измеряли оптическую плотность раствора на ФЭК - КФК – 5 при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Количество выделившейся масляной кислоты определяли по калибровочному графику (рисунок 4).

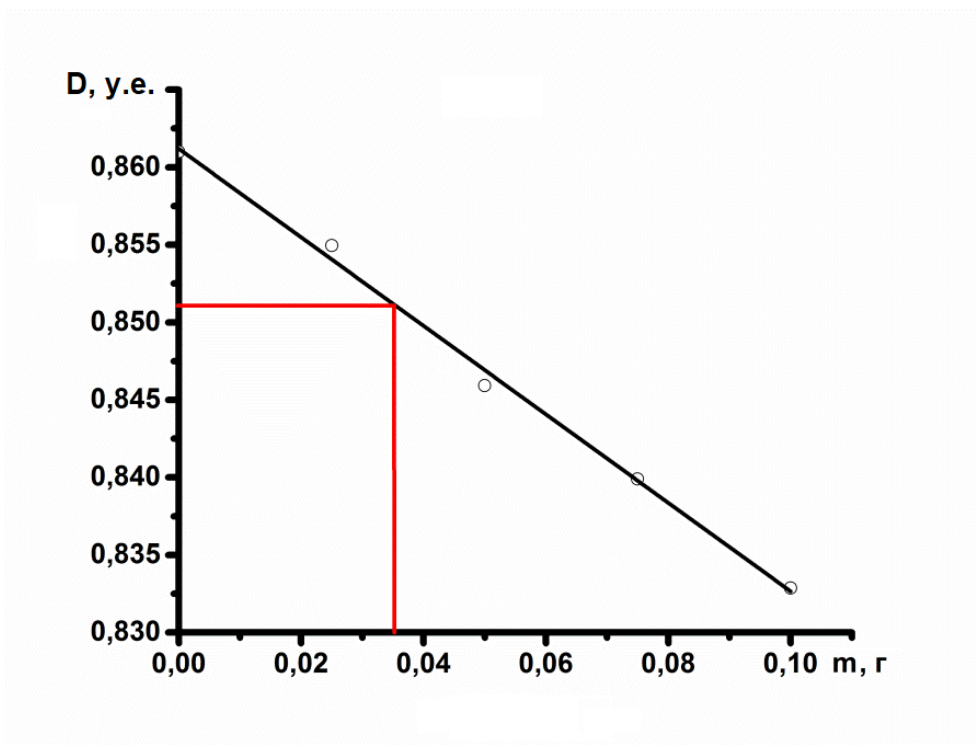


Рисунок 4 – Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от массы масляной кислоты в растворе с индикатором феноловым красным

Анализ калибровочного графика рисунка 4 показал, что при оптической плотности раствора субстрата с ферментом равной 0,851 условных единиц масса масляной кислоты в растворе составила 0,035 г.

Для определения количества молей масляной кислоты массу образовавшейся кислоты необходимо разделить на молярную массу масляной кислоты - 88:

$$0,035/88=0,397 \cdot 10^{-3} \text{ моль} = 0,397 \text{ ммоль}$$

По формуле 1 рассчитали удельную активность фермента:

$$A = \frac{0,397 \text{ ммоль}}{0,1 \text{ мл}} = 3,97 \text{ ммоль/мл} \quad (6)$$

На основании проведенных исследований по вышеуказанной методике установлено, что удельная активность бутирилхолинэстеразы составила 3,97 ммоль/мл.

Для доказательства полученных результатов наличия в растворе продуктов разложения субстрата бутирилхолина, а именно концентрации масляной кислоты, нами было предложено в данной методике заменить индикатор феноловый красный на реагент хлорид трехвалентного железа (FeCl_3), который позволил бы определить содержание масляной кислоты по бутират-аниону:



Исследования были проведены по вышеуказанной методике, однако вместо индикатора фенолового красного был применен реагент хлорида трехвалентного железа (FeCl_3).

Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от массы масляной кислоты в растворе представлен на рисунке 5.

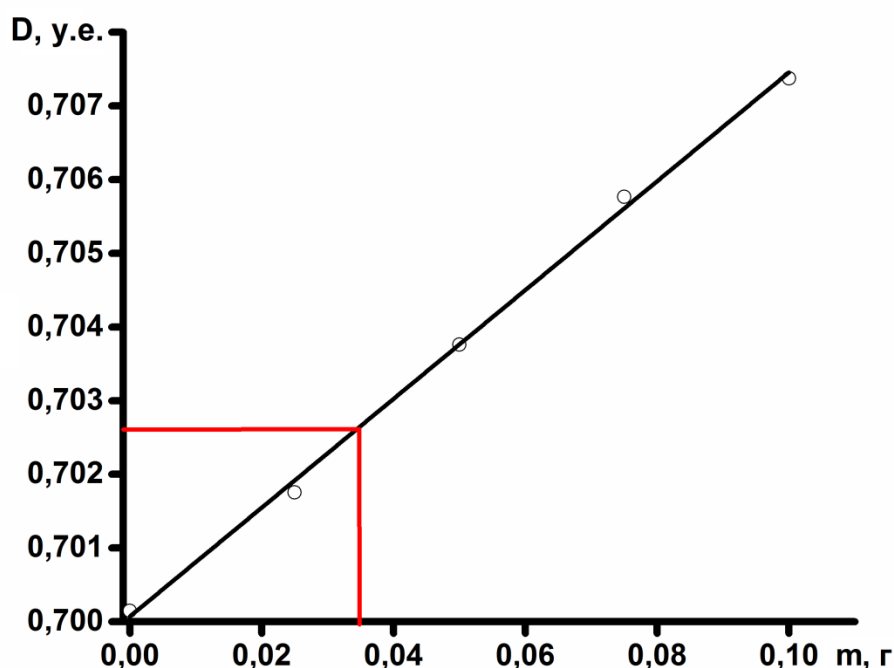


Рисунок 5 – Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от массы масляной кислоты в растворе с индикатором хлорид трехвалентного железа

Как видно из рисунка 5 при оптической плотности раствора субстрата с ферментом равной 0,7027 условных единиц масса масляной кислоты в растворе составило 0,036 г.

Для определения количества молей масляной кислоты массу образовавшейся кислоты необходимо разделить на молярную массу масляной кислоты - 88:

$$0,036/88=4,09 \cdot 10^{-4} \text{ моль} = 0,409 \text{ ммоль}$$

По формуле 1 рассчитали удельную активность фермента:

$$A = \frac{0,409 \text{ ммоль}}{0,1 \text{ мл}} = 4,09 \text{ ммоль/мл} \quad (8)$$

На основании проведенных исследований по вышеуказанной методике установлено, что удельная активность бутирилхолинэстеразы составила 4,09 ммоль/мл.

На основании вышеизложенного необходимо отметить, что проведенные качественные реакции с применением реагента хлорида трехвалентного железа (FeCl_3) для определения удельной активности двух гидролитических ферментов: ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы позволили получить показатели удельной активности исследуемых ферментов идентичные показателям, полученным по известным методикам, что подтверждает достоверность экспериментальных исследований.

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что в процессе ферментативной реакции двух гидролитических ферментов: ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы с субстратами ацетилхолина и бутирилхолина в водном растворе наибольшую удельную активность проявил фермент ацетилхолинэстераза. Удельная активность которой составила 5,8 ммоль/мл, в свою очередь удельная активность бутирилхолинэстеразы составила 3,97 ммоль/мл.

На следующем этапе проведены исследования по подбору из двух гидролитических ферментов (ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы), фермента, обладающего более высокой удельной активностью, который в конечном итоге будет обладать наиболее высокой чувствительностью к ингибирующим свойствам карбофоса в молоке.

В связи с этим, на первом этапе в сравнительном аспекте исследована удельная активность двух гидролитических ферментов (ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы) в молоке.

Для определения удельной активности фермента ацетилхолинэстеразы в молоке были проведены исследования по разработанной нами методике: к 0,1 мл водного раствора фермента ацетилхолинэстеразы добавляли 2 мл буферного раствора с pH 8,4 и термостатировали в течение 30 минут при температуре 37 °С. Параллельно в пробирке 0,5 мл (0,4; 0,3; 0,2; 0,1)мл ацетилхолина смешивали с 2,0 (2,1; 2,2; 2,3; 2,4) мл молока и 0,3 мл раствора индикатора фенолового красного и выдерживали также в термостате при 37 °С. Через 30

минут подготовленные растворы смешивали и определяли оптическую плотность полученного раствора. Для этого в кювете в 1 мл раствора добавляли 1 мл дистиллированной воды и определяли оптическую плотность спектрофотометрически. В качестве раствора сравнения использовали раствор исследуемого молока в воде в соотношении 1:1.

Количество выделившейся уксусной кислоты определяли по калибровочному графику (рисунок б).

Анализ калибровочного графика показал, что при оптической плотности раствора субстрата с ферментом равной 1,92 условных единиц масса уксусной кислоты в растворе составила 0,066 г.

Далее находим количество молей уксусной кислоты для этого массу образовавшейся кислоты делим на молярную массу уксусной кислоты - 60:

$$0,066/60=1,1 \cdot 10^{-3} \text{ моль} = 1,1 \text{ ммоль}$$

По формуле 1 рассчитывали удельную активность ацетилхолинэстеразы:

$$A = \frac{1,1 \text{ ммоль}}{0,1 \text{ мл}} = 11 \text{ ммоль/мл} \quad (9)$$

На основании проведенных исследований установлено, что удельная активность ацетилхолинэстеразы составила 11 ммоль/мл.

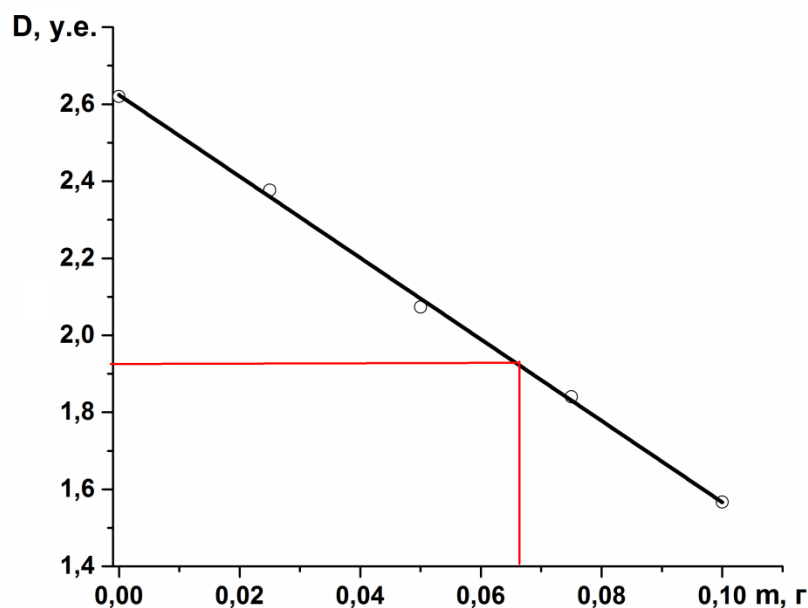


Рисунок б - Калибровочный график для определения массы уксусной кислоты в молоке

Для обоснованного выбора фермента проведены исследования по определению удельной активности бутирилхолинэстеразы в молоке по

разработанной нами методике: к 0,1 мл фермента добавляли 2 мл буферного раствора при рН 8,4 и термостатировали при 37 °С в течение 30 минут. Параллельно в пробирке 0,5 мл (0,4; 0,3; 0,2; 0,1) мл бутирилхолина смешивали с 2,0 (2,1; 2,2; 2,3; 2,4) мл молока и 0,3 мл раствора индикатора фенолового красного и выдерживали также в термостате при 37 °С. По истечении 30 минут растворы смешивали и определяли оптическую плотность полученного раствора. Для этого в кювете к 1 мл раствора добавляли 1 мл дистиллированной воды и определяли оптическую плотность спектрофотометрически. В качестве раствора сравнения использовали раствор исследуемого молока в воде в соотношении 1:1.

Количество выделившейся масляной кислоты определяли по калибровочному графику (рисунок 7).

Как видно из рисунка 7, при оптической плотности 1,69 условных единиц масса масляной кислоты составило 0,07 мг. Далее определяем количество молей масляной кислоты, для этого массу образовавшейся масляной кислоты делим на ее молярную массу - 88:

$$0,07/88=0,795*10^{-3} \text{ моль} = 0,795 \text{ ммоль}$$

По формуле 1 рассчитываем удельную активность бутирилхолинэстеразы:

$$A = \frac{0,795 \text{ ммоль}}{0,1 \text{ мл}} = 7,95 \text{ ммоль/мл} \quad (10)$$

На основании проведенных исследований установлено, что удельная активность бутирилхолинэстеразы в молоке составила 7,95 ммоль/мл.

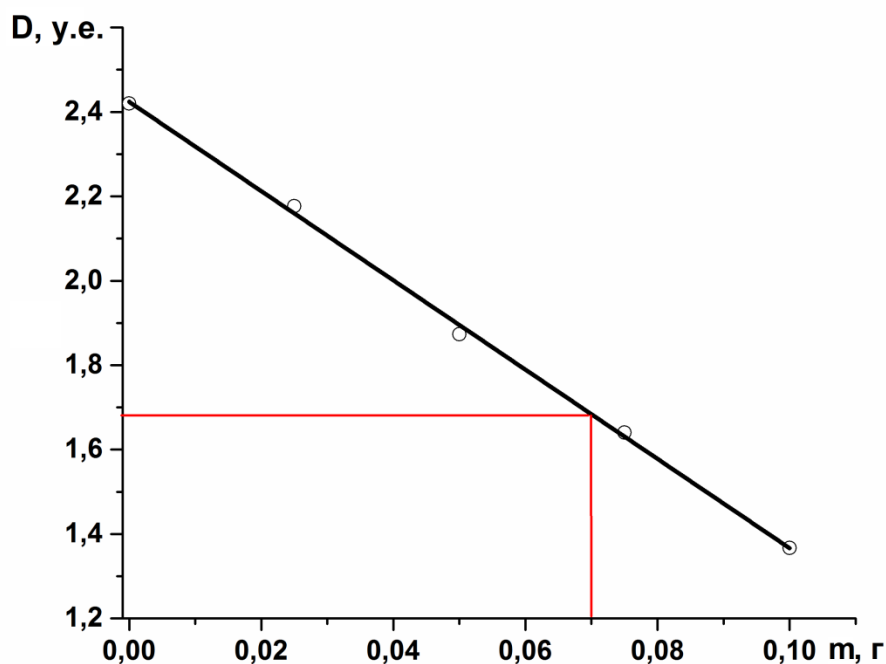


Рисунок 7 - Калибровочный график для определения массы масляной кислоты в молоке

Таким образом, результаты проведенных экспериментальных исследований показали, что из двух гидролитических ферментов наибольшую удельную активность показывает ацетилхолинэстераза в сравнении с бутирилхолинэстеразой как в водной среде, так и в молоке. В водном растворе удельная активность ацетилхолинэстеразы составило 5,8 ммоль/мл, в молоке же 11 ммоль/мл. В свою очередь удельная активность бутирилхолинэстеразы в водном растворе составило 6,0 ммоль/мл, а в молоке 7,9 ммоль/мл.

Как видно из анализа результатов экспериментальных исследований для разработки тест-систем нами выбран ацетилхолинэстераза, как гидролитический фермент с наиболее высокой удельной активностью, и соответственно, проявляющий высокую чувствительность к ингибирующим свойствам карбофоса в молоке.

Как известно на процесс получения биосенсорной тест-системы влияют такие показатели, как количество фермента, рН буферного раствора, температура и время ингибирования. На основе анализа теоретических исследований установлено, что при построении тест-системы оптимальным количеством фермента ацетилхолинэстеразы является 0,2 мг; рН буферного раствора – 8,4; температура термостатирования – 37 °С и время ингибирования 30 минут [1]. В связи с этим в данной работе при получении биосенсорной тест-системы были применены именно эти параметры, которые были использованы при исследовании объектов окружающей среды.

На основании вышеизложенного необходимо отметить, что при проведении экспериментальных исследований по обнаружению содержания фосфорорганического пестицида в молоке были применены вышеуказанные параметры создания биосенсорной тест-системы, при этом для обнаружения карбофоса в молоке при данных параметрах нами выбран гидролитический фермент ацетилхолинэстераза.

3.2 Обоснование выбора метода и материала для иммобилизации ферментов

Для разработки тест-системы по определению фосфорорганических соединений в молоке на основании проведенных исследований нами выбран гидролитический фермент с наиболее высокой удельной активностью, и соответственно, проявляющий высокую чувствительность к ингибирующим свойствам карбофоса в молоке, а именно, ацетилхолинэстераза.

Как отмечают ряд ученых для разработки биосенсорной тест-системы необходимо проводить иммобилизацию ферментов, поскольку иммобилизованный фермент в сравнении с нативным ферментом довольно длительное время сохраняет максимальную работоспособность, при этом, не подвергаясь структурным изменениям. То есть, иммобилизованные ферменты более устойчивые и не уступают по эффективности нативным ферментам [133, 134, 135].

На основании вышеизложенного в данной работе поставлена задача – проведение исследований по подбору метода и материала для иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы.

На первом этапе работы обоснован выбор метода и материала иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы.

Как известно, существуют несколько методов иммобилизации ферментов, которые подразделяются согласно классической классификации на физические и химические методы иммобилизации.

К физическим методам иммобилизации относятся адсорбция и включение в гель, к химическим же методам – ковалентное связывание и сшивание [133, 136].

На основании проведенного литературного обзора установлено, что метод адсорбции иммобилизации ферментов относится к одному из простых и недорогих методов иммобилизации и ему присущи ряд недостатков. К одному из основных недостатков данного метода относится низкая прочность связывания фермента с носителем [133, 137, 138].

Химический же метод иммобилизации ферментов, как указывают исследователи, применяются в основном для проведения лабораторных исследований. Для серийного производства наиболее приемлемы физические методы иммобилизации ферментов, поскольку данные методы более доступны и экономически целесообразны [133, 137, 138, 139, 140].

Учитывая, что в данной работе предусмотрена разработка биосенсорной тест-системы для определения фосфорорганических пестицидов для серийного выпуска, то для иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы был выбран физический метод - метод включения в гель, а также второй способ - метод включения в гель с дополнительным применением одного из способа химического метода - кроссшивание.

Для иммобилизации фермента в работе были применены два способа: получение полимерного геля с включенными в него молекулами фермента, а также добавление в реакционную смесь бифункциональных сшивающих агентов [135, 138].

При первом способе фермент вносится в раствор готового полимера, тщательно перемешивается для равномерного распределения фермента в носителе и оставляется в покое до перехода полимера в гелеобразное состояние при температуре 18-20°C.

Во втором же способе фермент вносится в раствор готового полимера, тщательно перемешивается для равномерного распределения фермента в носителе. Готовый полимер наносится на поверхность подложки тест-системы с выдержкой 5 секунд, затем подложку тест-системы погружаем в раствор кросс-сшивающего агента на 5 секунд. В качестве кросс-сшивающего агента для желатина выбран глутаровый альдегид, для низкометилированного пектина и альгината натрия - хлористый кальций (CaCl_2).

Экспериментальные исследования по иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы проведены методом включения в гель двумя способами.

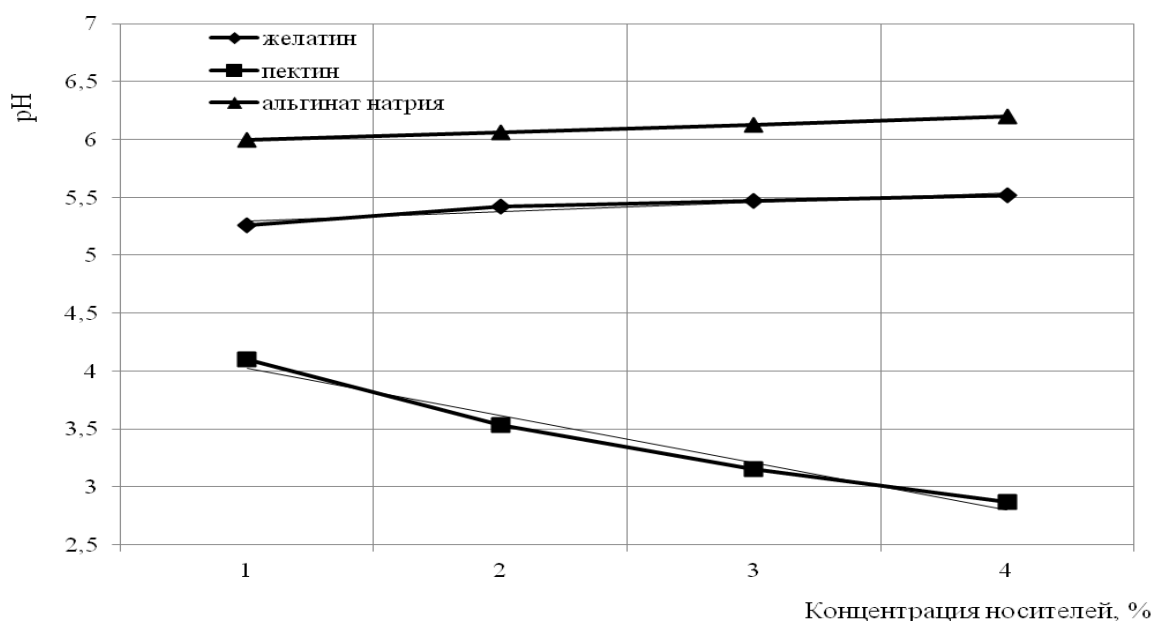
В качестве носителя для иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы, были выбраны желатин, низкометилированный пектин и альгинат натрия. Известно, что в качестве носителей в основном для разработки биосенсорных тест-систем используют природные вещества, а именно, животные белки и растительные полисахариды. Из белковых веществ применяют желатин, из растительных полисахаридов пектин и альгинат натрия, как наиболее доступные и экономически целесообразные [137, 138, 141].

На следующем этапе работы проведены исследования по апробации первого способа физического метода иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы основанного на его включении в носитель.

С этой целью были получены полимерные гели на основе желатина, низкометилированного пектина и альгината натрия с включенными в него молекулами фермента при оптимальной температуре гелеобразования 18-20°C и при разных концентрациях носителей [142, 143].

На первом этапе было исследовано изменение активной кислотности при получении гелей в зависимости от концентрации желатина, пектина и альгината натрия. Анализ литературных источников показал, что к одним из факторов, влияющих на активность фермента, относится рН среды, то есть каждый фермент проявляет максимальную активность при оптимальном значении рН среды. Данные исследования проведены для обоснования активности ацетилхолинэстеразы, иммобилизованного на разных носителях.

Результаты исследований представлены на рисунке 8.



$$y = 0,067x + 5,93 (R^2 = 0,9987)$$

$$y = 0,083x + 5,21 (R^2 = 0,9047)$$

$$y = -0,407x + 4,43 (R^2 = 0,9748)$$

Рисунок 8 - Изменения pH носителей при их различных концентрациях

Как видно из рисунка 8 с повышением концентрации желатина и альгината натрия в растворе активная кислотность увеличивается постепенно и незначительно. Вместе с тем, в растворе на основе пектина с включенными в него молекулами фермента ацетилхолинэстеразы активная кислотность понижается с 4,1 до 2,87, то есть увеличивается кислотность раствора. Вероятнее всего это связано с тем, что карбоксильные группы, входящие в состав низкометилизованного пектина при диссоциации снижают pH.

На основании математической обработки полученных экспериментальных данных получено уравнение линейной регрессии:

$$Y = bx + a \quad (11)$$

где b и a - коэффициенты регрессии;

x - концентрация носителей, %.

В результате анализа коэффициентов регрессии установлено, что абсолютная величина коэффициента регрессии b для желатина и альгината натрия имеет положительную величину и определяет незначительную зависимость изменения активной кислотности от их концентрации. Абсолютная величина коэффициента регрессии b для пектина имеет отрицательное значение, что показывает наибольшую зависимость изменения активной кислотности от его концентрации. Необходимо отметить, что коэффициент детерминации (R^2) как видно из рисунка 8 близок к единице, что означает достоверность полученных результатов.

Таким образом, на основании экспериментальных исследований по иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы методом включения в гель желатина, пектина и альгината натрия при оптимальной температуре гелеобразования 18-20 °С и при разных концентрациях носителей установлено, что с повышением концентрации желатина и альгината натрия в растворе активная кислотность увеличивается постепенно и незначительно. Вместе с тем в растворе на основе пектина с включенными в него молекулами фермента ацетилхолинэстеразы активная кислотность понижается с 4,1 до 2,87, то есть увеличивается кислотность раствора.

На втором этапе исследований был проведен анализ внешнего вида полученных гелей на используемых носителях. Результаты анализа приведены в таблицах 1,2,3.

Таблица 1 - Оценка внешнего вида полимерного геля на основе желатина

Концентрация,%	Характеристика внешнего вида
1	Консистенция однородная, текучая, цвет слегка розовый
2	Консистенция однородная, текучая, цвет слегка розовый
3	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый
4	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый

Как видно из таблицы 1, полимерный гель, полученный на основе желатина с концентрацией 1 % характеризуется однородной и текучей консистенцией, цвет слегка розовый.

С увеличением концентрации до 2 % желатина консистенция приобретает однородную консистенцию, текучую, цвет слегка розовый.

Дальнейшее увеличение концентрации до 3 % желатина приводит к получению геля с однородной и густой консистенцией, не текучей, цвет розовый.

Увеличение же концентрации желатина до 4 % приводит к получению геля с плотной и однородной консистенцией, не текучей, цвет розовый.

Таким образом, наиболее оптимальным является полимерный гель, полученный при содержании желатина в концентрации 3 %.

Таблица 2 - Оценка внешнего вида и консистенция полимерного геля на основе низкометилованного пектина

Концентрация,%	Характеристика внешнего вида
1	Консистенция однородная, текучая, цвет слегка розовый
2	Консистенция однородная, не текучая, цвет слегка розовый
3	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый
4	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый

Как видно из таблицы 2, полимерный гель, полученный на основе пектина с концентрацией 1 % характеризуется однородной и густой консистенцией, цвет слегка розовый.

Увеличение концентрации до 2 % пектина не повлияло на изменение внешнего вида геля в сравнении с концентрацией пектина 1%.

При дальнейшем увеличении концентрации до 3 % пектина наблюдается уплотнение консистенции полимерного геля и не текучести, цвет розовый.

С увеличением концентрации пектина до 4 % приводит к получению полимерного геля с не текучей консистенцией, цвет розовый.

Таким образом, наиболее оптимальным является полимерный гель, полученный при содержании пектина в концентрации 1 и 2 %.

Таблица 3 - Оценка внешнего вида полимерные гели на основе альгината натрия

Концентрация, %	Характеристика внешнего вида
1	Консистенция однородная, не текучая, цвет слегка розовый
2	Консистенция однородная, не текучая, цвет слегка розовый
3	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый
4	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый

Как видно из таблицы 3, внешний вид полимерного геля, полученного на основе альгината натрия, характеризуется при разных его концентрациях также как и при получении полимерного геля на основе пектина. Также, наиболее оптимальным является полимерный гель, полученный при содержании альгината натрия в концентрации 1 и 2 %.

В результате оценки внешнего вида полимерных гелей, полученных на основе различных носителей, установлено, что оптимальным являются гели на основе 3 % желатина, 2 % низкометирированного пектина и 2 % альгината натрия. При вышеуказанных концентрациях получены гели с однородной и густой консистенцией, не текучей, розового цвета.

На дальнейшем этапе исследования полимерные гели были нанесены на стеклянную поверхность тест-системы. С этой целью стеклянную палочку опускали в полученный раствор полимера с ферментом, затем вынимали стеклянную палочку и оставляли в покое до образования на ее поверхности твердого геля розового цвета.

Полимерный гель, полученный на основе желатина с концентрацией 3 %, нанесенный на стеклянную поверхность тест-системы был распределен неравномерно на стеклянной поверхности тест-системы и при этом наблюдались значительные разрывы.

Полученная тест-система была апробирована в подготовленных образцах молока с содержанием карбофоса от 0,01 до 0,12 мг/кг.

Результат исследования представлен на рисунке 9.

Как видно из рисунка 9 тест-система окрасилась в желтый цвет при содержании карбофоса в молоке свыше 0,05 мг/кг, что свидетельствует о том, что данная тест-система позволяет определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке. Вместе с тем, необходимо отметить, что нанесенная на поверхность стеклянной палочки, полимер желатина с

концентрацией 3 % распределен неравномерно и наблюдаются значительные разрывы.

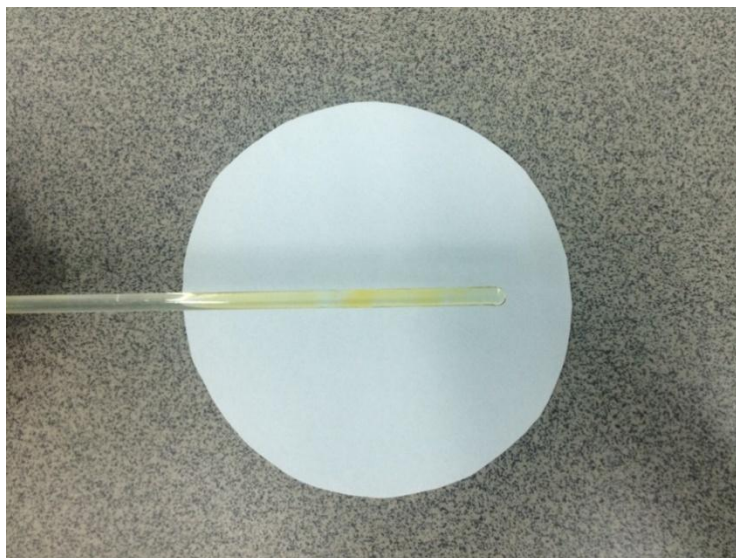


Рисунок 9 - Апробированная тест-система в молоке с карбофосом ($>0,05$ мг/кг) на основе желатина (3%)

Полимерный гель, полученный на основе пектина с концентрацией 2%, нанесенный на стеклянную поверхность тест-системы также был неравномерно распределен на стеклянной поверхности тест-системы и при этом основная масса полимерного геля скапливалась на кончике стеклянной палочки.

Полученная тест-система была апробирована в подготовленных образцах молока с содержанием карбофоса от 0,01 до 0,12 мг/кг. Результат исследования представлен на рисунке 10.

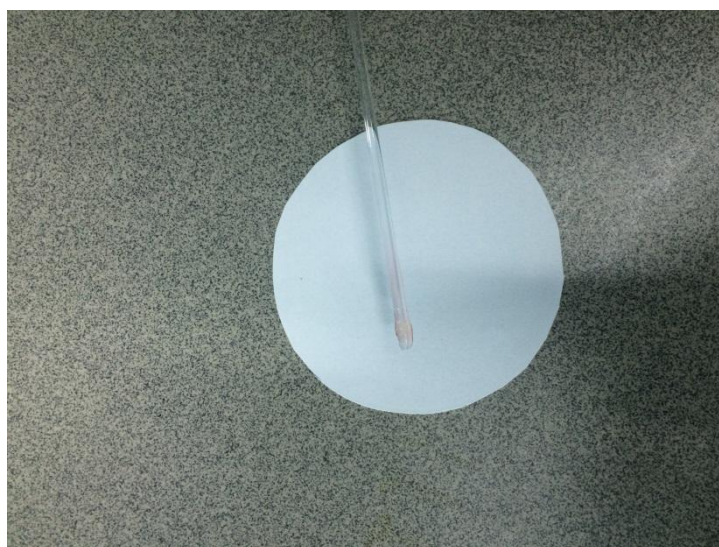


Рисунок 10 - Апробированная тест-система в молоке с карбофосом ($>0,05$ мг/кг) на основе пектина (2 %)

Как видно из рисунка 10, при апробировании данной тест-системы в образце молока с повышенным содержанием карбофоса свыше 0,05 мг/кг цвет тест-системы не изменился, что свидетельствует о том, что данная тест-система не позволяет определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке. По-видимому, это связано с тем, что в растворе на основе пектина с включенными в него молекулами фермента ацетилхолинэстеразы активная кислотность понижается с 4,1 до 2,87, то есть увеличивается кислотность раствора. Вместе с тем, как видно из рисунка 3, полимерный гель, полученный на основе пектина, неравномерно распределен на стеклянной поверхности тест-системы и при этом основная масса полимерного геля скапливается на кончике стеклянной палочки.

Полимерный гель, полученный на основе альгината натрия с концентрацией 2 %, нанесенный на стеклянную поверхность биосенсорной тест-системы полимерный гель, полученный на основе альгината натрия, практически не закрепился на стеклянной поверхности биосенсорной тест-системы.

Полученная тест-система была апробирована в подготовленных образцах молока с содержанием карбофоса от 0,01 до 0,12 мг/кг.

Результат исследования представлен на рисунке 11.



Рисунок 11 - Апробированная тест-система в молоке с карбофосом (>0,05 мг/кг) на основе альгината натрия (2 %)

Как видно из рисунка 11, при апробировании данной тест-системы в образце молока при содержании карбофоса в молоке свыше 0,05 мг/кг цвет тест-системы изменился слегка в желтый, что свидетельствует о том, что данная тест-система позволяет определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке. Вместе с тем как видно из рисунка 11 полимерный гель, полученный на основе альгината натрия, практически не закреплен на стеклянной поверхности тест-системы.

На основании проведенных исследований установлено, что при разработке тест-системы для определения карбофоса по первому способу, то есть при внесении фермента в раствор готового полимера с дальнейшим гелеобразованием при температуре 18-20°C, наблюдается неравномерное распределение исследуемых полимерных гелей, с неплотной структурой и со значительными разрывами на поверхности стеклянной палочки.

При апробировании же тест-систем, полученных на основе желатина и альгината натрия, на образцах молока с содержанием карбофоса свыше 0,05 мг/кг цвет тест-систем изменился, что свидетельствует о том, что данные тест-системы позволяют определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке.

При апробировании же тест-системы, полученной на основе низкометилированного пектина, на образцах молока с содержанием карбофоса свыше 0,05 мг/кг цвет тест-системы не изменился, что свидетельствует о том, что данная тест-система не позволяет определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке. По-видимому, это связано с тем, что в растворе на основе пектина с включенными в него молекулами фермента ацетилхолинэстеразы карбоксильные группы, входящие в состав низкометилированного пектина при диссоциации снижают рН. При этом активная кислотность понижается с 4,1 до 2,87, то есть увеличивается кислотность раствора. Понижение же величины рН в свою очередь, не дает возможности наблюдать переход окраски индикатора фенолового красного от розового в желтый, что и объясняет полученный результат.

Исходя из результатов исследования, можно отметить, что при оптимальной температуре гелеобразования 18-20°C максимальную активность ацетилхолинэстераза проявляет при оптимальной величине рН среды для полимерного геля, полученного на основе желатина 6,1; для среды для полимерного геля, полученного на основе альгината натрия – 5,4.

На следующем этапе полимерные гели, полученные на основе желатина, пектина и альгината натрия, и нанесенные на поверхность стеклянной палочки и хроматографической бумажной полоске были исследованы на их хранимоспособность. Однако при хранении стеклянных палочек при температуре 5-6°C по истечению 30 дней на их поверхности были обнаружены микротрещины. При хранении же на хроматографической бумажной полоске при той же температуре по истечению 20 дней на ее поверхности также были обнаружены микротрещины. В связи с этим дальнейшие исследования на хранимоспособность полимерных гелей, полученных на основе желатина, пектина и альгината натрия, и нанесенных на поверхность стеклянной палочки не проводились. Соответственно, оптимальный срок хранения полученных биосенсорных тест-систем на основе стеклянной палочки составил не более 30 дней, а на бумажной основе – 20 дней.

На следующем этапе были проведены исследования с получением биосенсорной тест-системы вторым способом, предусматривающий добавление в реакционную смесь бифункциональных сшивающих агентов, которые

позволят получить трехмерные гели. Как показывают исследования литературных источников полученные гели обладают способностью поглощать большое количество воды и набухать, при этом сохраняя свою сетчатую структуру [135, 141, 144].

Данные исследования были проведены в связи с тем, что при первом способе иммобилизации фермента в полимерные гели на основе желатина, низкометилированного пектина и альгината натрия с включенными в него молекулами фермента при нанесении их на стеклянную поверхность наблюдалось неравномерное распределение геля на подложке тест-системы с неплотной структурой.

В качестве кросс-сшивающего агента для желатина был выбран глутаровый альдегид, для низкометилированного пектина и альгината натрия - хлористый кальций (CaCl_2). Известно, что для желатина наиболее изученным бифункциональным сшивающим агентом является 25 %-ный раствор глутарового альдегида, для низкометилированного пектина и альгината натрия - 4 %-ный раствор хлористого кальция. Сшивающие агенты добавляли в реакционную смесь в количестве 0,2 % раствора глутарового альдегида для реакционной смеси с желатином и 0,1 % раствора хлористого кальция для низкометилированного пектина и альгината натрия [141, 144, 145, 146, 147, 148].

На следующем этапе данных исследований был проведен анализ внешнего вида полученных гелей на используемых носителях с кросс-сшивающими агентами. Результаты анализа приведены в таблицах 4,5,6.

Таблица 4 - Оценка внешнего вида полимерного геля на основе желатина с глутаровым альдегидом

Концентрация, %	Характеристика внешнего вида
1	Консистенция однородная, не текучая, цвет слегка розовый
2	Консистенция однородная, не текучая, цвет слегка розовый
3	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый
4	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый

Как видно из таблицы 4, полимерный гель, полученный на основе желатина с концентрацией 1 % и глутаровым альдегидом характеризуется однородной консистенцией, текучий, цвет слегка розовый. С увеличением концентрации до 2 % желатина консистенция приобретает однородную консистенцию, не текучую, цвет слегка розовый.

Дальнейшее увеличение концентрации до 3 % желатина приводит к получению геля с однородной и густой консистенцией, цвет розовый. Увеличение же концентрации желатина до 4 % приводит к получению геля с однородной консистенцией, не текучая, цвет розовый. То есть, наиболее оптимальным является полимерный гель, полученный при содержании желатина в концентрации 3 %. Как видно из полученных результатов добавление в реакционную смесь бифункционального сшивающего агента -

глутарового альдегида - позволяет получить полимерный гель с однородной консистенцией, не текучей уже при 1 % желатина.

Таблица 5 - Оценка внешнего вида полимерного геля на основе низкометилированного пектина с ионами Ca^{2+}

Концентрация, %	Характеристика внешнего вида
1	Консистенция однородная, текучая, цвет розовый
2	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый
3	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый
4	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый

Как видно из таблицы 5, полимерный гель, полученный на основе пектина с концентрацией 1 % с ионами Ca^{2+} , характеризуется однородной и густой консистенцией, цвет розовый. Увеличение концентрации до 2 % пектина не повлияло на изменение внешнего вида геля в сравнении с концентрацией пектина 1%.

При дальнейшем увеличении концентрации до 3 % пектина наблюдается уплотнение консистенции полимерного геля, цвет розовый. Увеличение же концентрации пектина до 4 % приводит к получению полимерного геля с очень плотной и не текучей структурой, цвет розовый.

Таким образом, наиболее оптимальным является полимерный гель, полученный при содержании пектина в концентрации 1 и 2 %.

Таблица 6 - Оценка внешнего вида полимерного геля на основе альгината натрия с ионами Ca^{2+}

Концентрация, %	Характеристика внешнего вида
1	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый
2	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый
3	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый
4	Консистенция однородная, не текучая, цвет розовый

Как видно из таблицы 6, внешний вид полимерного геля, полученного на основе альгината натрия с ионами Ca^{2+} , характеризуется при разных его концентрациях также как и при получении полимерного геля на основе пектина. Также, наиболее оптимальным является полимерный гель, полученный при содержании альгината натрия в концентрации 1 и 2 %.

Анализ оценки внешнего вида полимерного геля, предусматривающие добавление в реакционную смесь бифункциональных сшивающих агентов, показал, что при добавлении глутарового альдегида в качестве кросс-сшивающего агента в 3 % желатин получен гель с однородной и густой консистенцией, розового цвета.

При применении же в качестве кросс-сшивающего агента хлористого кальция (CaCl_2) в 2% низкометилированный пектин и 2 % альгинат натрия также получаем гель с однородной и густой консистенцией, розового цвета.

В дальнейшем полимерные гели были нанесены на стеклянную поверхность тест-системы.

Полимерный гель, полученный на основе желатина с концентрацией 3 % и сшивающим агентом глутарового альдегида, нанесенного на поверхность подложки тест-системы, представлен на рисунке 12.



Рисунок 12 - Тест-система, полученная на основе 3% желатина и глутарового альдегида

Как видно из рисунка 12, полимерный гель, полученный на основе 3 % желатина с 0,2 % сшивающим агентом глутаровым альдегидом, характеризуется эластичной структурой и при нанесении на поверхность подложки тест-системы распределена равномерно плотным слоем и менее хрупкой текстурой. То есть, внесение в реакционную смесь бифункционального сшивающего агента (глутарового альдегида), позволило получить трехмерную гель, которая обладает способностью поглощать большое количество воды и набухать, при этом сохраняя свою сетчатую структуру.

Полимерный гель, полученный на основе низкометилированного пектина с концентрацией 2 % и сшивающим агентом хлористого кальция, нанесенного на поверхность подложки тест-системы, представлен на рисунке 13.

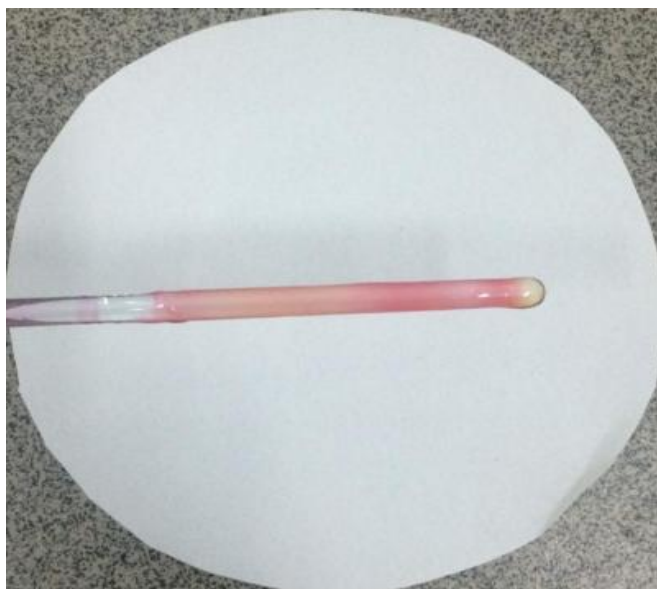


Рисунок 13 - Тест-система, полученная на основе 2% низкометилированного пектина и Ca^{2+}

Как видно из рисунка 13 полимерный гель, полученный на основе 2 % низкометилированного пектина с внесением 0,1 % хлористого кальция в качестве сшивающего агента, при нанесении на поверхность подложки тест-системы характеризуется также эластичной структурой и при нанесении на поверхность подложки тест-системы распределена равномерно плотным слоем и менее хрупкой текстурой.

Внесение в реакционную смесь бифункционального сшивающего агента (хлористого кальция), также позволило получить трехмерную гель, которая обладает способностью поглощать большое количество воды и набухать, при этом сохраняя свою сетчатую структуру.

Полимерный гель, полученный на основе альгината натрия с концентрацией 2 % и сшивающим агентом хлористого кальция, нанесенного на поверхность подложки тест-системы, представлен на рисунке 14.



Рисунок 14 - Тест-система, полученная на основе 2% альгината натрия и Ca^{2+}

Как видно из рисунка 14 полимерный гель, полученный на основе 2% альгината натрия с внесением 0,1 % хлористого кальция в качестве сшивающего агента, при нанесении на поверхность подложки тест-системы также характеризуется однородной и эластичной структурой и при нанесении на поверхность подложки тест-системы распределена равномерно плотным слоем и менее хрупкой текстурой. То есть, внесение в реакцию смесь бифункционального сшивающего агента (хлористого кальция), позволило получить трехмерный гель, который обладает способностью поглощать большое количество воды и набухать, при этом сохраняя свою сетчатую структуру.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что добавление в реакцию смесь бифункциональных сшивающих агентов (для желатина - глутаровый альдегид, для низкометилованного пектина и альгината натрия - хлористый кальций) позволило получить полимерные гели равномерной и плотной эластичной текстурой розового цвета. При этом полимерные гели равномерно и плотно закрепились на поверхности подложки тест-системы.

На следующем этапе исследований полученные полимерные гели, нанесенные на поверхность подложки тест-системы, были апробированы в подготовленных образцах молока с содержанием карбофоса свыше 0,05 мг/кг.

Результаты исследования представлены на рисунках 15, 16, 17.

Полимерный гель, полученный на основе желатина с концентрацией 3 %, нанесенный на стеклянную поверхность тест-системы и апробированный в молоке представлен на рисунке 15.

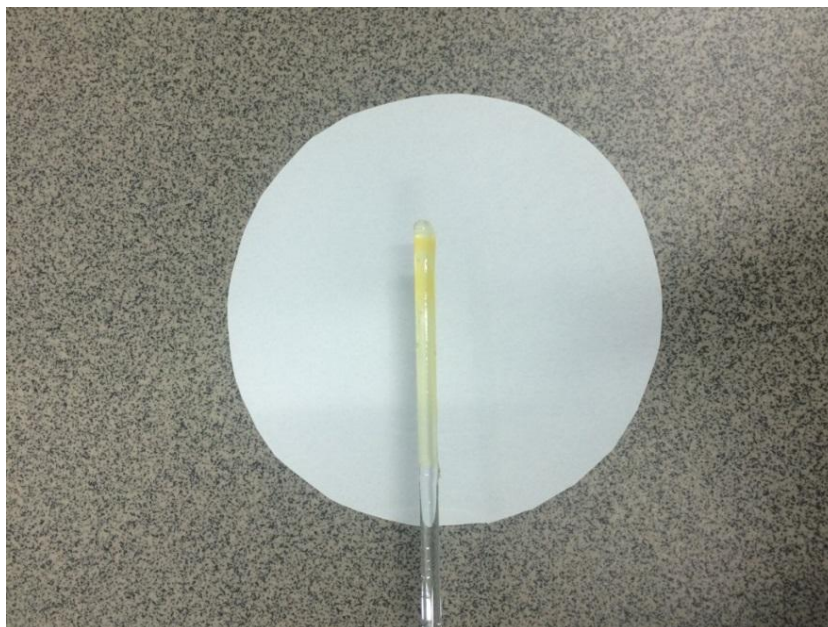


Рисунок 15 - Апробированная тест-система в молоке с карбофосом ($>0,05$ мг/кг) на основе желатина (3%) и глутарового альдегида (0,2 %)

Как видно из рисунка 15 тест-система окрасилась в желтый цвет, что подтверждает присутствие в молоке фосфорорганического пестицида карбофоса.

Полимерный гель, полученный на основе низкометилированного пектина с концентрацией 2 % и хлористым кальцием (0,1%), нанесенный на поверхность подложки тест-системы и апробированный в молоке представлен на рисунке 16.



Рисунок 16 - Апробированная тест-система в молоке с карбофосом ($>0,05$ мг/кг) на основе низкометилированного пектина (2%) и хлористого кальция (0,1 %)

Как видно из рисунка 16, полимерный гель, полученный на основе низкометилированного пектина (2%) и хлористого кальция, при апробировании в образцах молока с содержанием карбофоса свыше 0,05 мг/кг цвет тест-системы практически не изменился, что свидетельствует о том, что данная тест-система не позволяет определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке, несмотря на хорошие механические свойства полученной тест-системы.

На основании собственных исследований было установлено, что в растворе на основе пектина с включенными в него молекулами фермента ацетилхолинэстеразы активная кислотность понижается с 4,1 до 2,87. Понижение же величины рН в свою очередь, не дает возможности наблюдать переход окраски индикатора фенолового красного от розового в желтый, что и объясняет полученный результат.

Полимерный гель, полученный на основе альгината натрия с концентрацией 2 % и хлористым кальцием (0,1%), нанесенные на поверхность подложки тест-системы и апробированный в молоке представлен на рисунке 10.

Как видно из рисунка 17, полимерный гель, полученный на основе альгината натрия (2 %) и хлористого кальция, при апробировании в образцах

молока с содержанием карбофоса свыше 0,05 мг/кг цвет тест-системы изменился из розового в ярко желтый, что свидетельствует о том, что данная тест-система позволяет определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке также как и полимерный гель, полученный на основе желатина (3%) и глутарового альдегида.

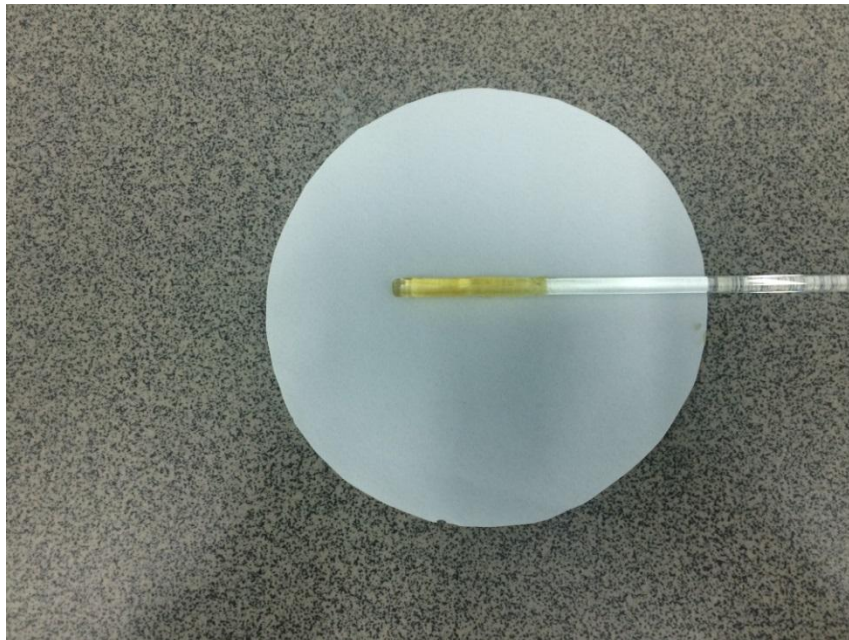


Рисунок 17 - Апробированная тест-система в молоке с карбофосом (>0,05 мг/кг) на основе альгината натрия (2 %) и хлористого кальция (0,1 %)

Таким образом, на основании проведенных исследований получены следующие результаты.

Во-первых, установлено, что добавление в реакционную смесь бифункциональных сшивающих агентов (для желатина - глутарового альдегида, для низкометилированного пектина и альгината натрия - хлористого кальция) были получены полимерные гели равномерной, вязкой и не текучей структурой розового цвета. Данные полимерные гели с сшивающими агентами образовывали более лучшую структуру гелей в сравнении с полимерными гелями, полученными на основе желатина, низкометилированного пектина и альгината натрия с включенными в него молекулами фермента без сшивающего агента. Также необходимо отметить, что полимерные гели, полученные с добавлением в реакционную смесь бифункциональных сшивающих агентов, равномерно и плотно закрепились на поверхности подложки тест-системы в отличие от полимерных гелей без сшивающих агентов. То есть, для получения биосенсерной тест-системы для качественного определения карбофоса в молоке приемлем второй способ получения полимерных гелей.

Во-вторых, при апробировании тест-системы, полученной на основе желатина и альгината натрия с добавлением бифункциональных сшивающих агентов в образцах молока с содержанием карбофоса свыше 0,05 мг/кг цвет

тест-системы изменился, что свидетельствует о том, что данная тест-система позволяет определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке.

Однако при апробировании тест-системы, полученной на основе низкометилированного пектина с добавлением бифункциональных сшивающих агентов, в образцах молока с содержанием карбофоса свыше 0,05 мг/кг цвет тест-системы практически не изменился, что свидетельствует о том, что данная тест-система не позволяет определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке.

Как показывают результаты исследований многих ученых, процесс гелеобразования носителей различной природы, используемых при иммобилизации ферментов, протекает в течение длительного времени и является кинетическим процессом [142, 149].

На основании вышеизложенного, на следующем этапе по выбору материала для иммобилизации фермента была исследовано изменение вязкости реакционной смеси с бифункциональными сшивающими агентами (для желатина - глутарового альдегида и альгината натрия - хлористого кальция) в зависимости от продолжительности гелеобразования.

В данной работе в качестве исследуемых материалов были выбраны желатин и альгинат натрия, поскольку как показали результаты предварительных исследований полимерный гель, полученный на основе низкометилированного пектина, не позволило получить тест-систему для обнаружения в молоке фосфорорганического пестицида - карбофоса.

Результаты исследования вязкости полученных полимеров на ротационном вискозиметре представлены на рисунке 18.

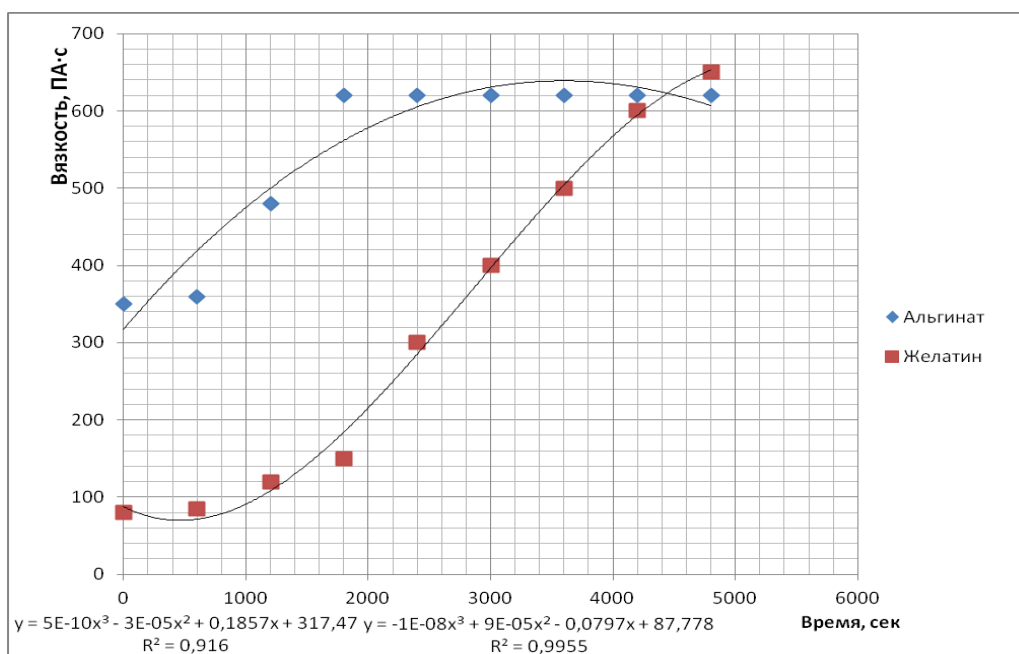


Рисунок 18 - Изменение вязкости полученных полимеров

Как видно из графика рисунка 18 вязкость реакционной смеси с бифункциональным сшивающим агентом (альгинат натрия - хлористый кальций) изменяется в течение 30 минут до определенной постоянной точки, образуя гель. При вязкости 620 Па*с наблюдается конечное состояние реакционной смеси, при котором гель приобретает твердое состояние.

Вязкость реакционной смеси с бифункциональным сшивающим агентом (желатин - глутаровый альдегид) изменяется в течение 80 минут, образуя гель.

По результатам исследования изменения вязкости полученных полимеров установлено, что в качестве носителя для иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы был выбран альгинат натрия с бифункциональным сшивающим агентом - хлористый кальций.

На основании проведенных экспериментальных исследований по подбору метода и выбора материала для иммобилизации фермента получены следующие результаты.

Во-первых, по иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы методом включения в гель желатина, пектина и альгината натрия при оптимальной температуре гелеобразования 18-20°C и при разных концентрациях носителей установлено, что с повышением концентрации желатина и альгината натрия в растворе активная кислотность увеличивается постепенно и незначительно. Вместе с тем в растворе на основе пектина с включенными в него молекулами фермента ацетилхолинэстеразы активная кислотность понижается с 4,1 до 2,87, то есть увеличивается кислотность раствора.

Во-вторых, на основе анализа оценки внешнего вида полученных полимерных гелей для получения тест-системы были выбраны носители следующих концентраций:

- желатина 3%;
- низкометилированного пектина – 2%;
- альгината натрия – 2 %.

В-третьих, было установлено, что при нанесении полимерного геля на стеклянную поверхность тест-системы, полученного первым способом на основе желатина (3%), пектина и альгината натрия (2%) с включенными в него молекулами фермента ацетилхолинэстеразы, наблюдалось неравномерное распределение гелей на поверхности тест-системы с не плотной структурой и с значительными разрывами.

В-четвертых, при апробировании тест-систем, полученных первым способом на основе желатина и альгината натрия, на образцах молока с содержанием карбофоса свыше 0,05 мг/кг цвет тест-системы изменился, что свидетельствует о том, что тест-система, полученная на основе данных полимеров позволяет определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке. Необходимо отметить, что в растворе с концентрацией желатина от 1 до 4 % активная кислотность повышается от 5,3 до 5,5 рН среды, в растворе с концентрацией альгината натрия от 1 до 4 % активная кислотность повышается от 6,0 до 6,2 рН среды.

При апробировании же тест-системы, полученной на основе низкометилированного пектина, на образцах молока с содержанием карбофоса свыше 0,05 мг/кг цвет тест-системы не изменился, что свидетельствует о том, что данная тест-система не позволяет определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке. По-видимому, это связано с тем, что в растворе на основе пектина с включенными в него молекулами фермента ацетилхолинэстеразы активная кислотность понижается с 4,1 до 2,87, то есть увеличивается кислотность раствора.

В пятых, исходя из результатов исследования, можно отметить, что при оптимальной температуре гелеобразования 18-20 °С максимальную активность ацетилхолинэстеразы проявляет при оптимальной величине рН среды для полимерного геля, полученного на основе 3% желатина 5,5; для полимерного геля, полученного на основе 2 % альгината натрия – 6,2.

В-шестых, при втором способе получения тест-системы с внесением кросс-сшивающего агента (для желатина - глутарового альдегида, для низкометилированного пектина и альгината натрия - хлористого кальция) были получены полимерные гели равномерной и плотной эластичной текстурой с розовым цветом. То есть, для получения биосенсерной тест-системы для качественного определения карбофоса в молоке приемлем второй способ получения полимерных гелей.

В-седьмых, при апробировании тест-систем, полученных на основе желатина и альгината натрия с добавлением бифункциональных сшивающих агентов в образцах молока с содержанием карбофоса свыше 0,05 мг/кг цвет тест-системы изменился с розового в желтый, что свидетельствует о том, что данные тест-системы позволяют определить присутствие фосфорорганического пестицида в молоке. Вместе с тем, по результатам исследования изменения вязкости полученных полимеров установлено, что в качестве носителя для иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы необходимо выбрать альгинат натрия с бифункциональным сшивающим агентом - хлористый кальций.

В-восьмых, было установлено, что исследуемые полимерные гели при нанесении на поверхность стеклянной палочки при хранении претерпевают изменения структуры гелей по истечении 30 суток, что возможно связано с испарением влаги. При хранении же на хроматографической бумажной полоске при той же температуре по истечении 20 дней на ее поверхности также были обнаружены микротрещины. В связи с этим срок хранения тест-системы на основе стеклянной палочки не должен превышать 30 дней при температуре 5-6°С, а на бумажной основе – 20 дней.

Таким образом, для получения тест-системы выбран второй способ - метод включения в гель с дополнительным применением одного из способов химического метода - кроссшивание.

В качестве носителя для иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы выбран 2% альгинат натрия с бифункциональным сшивающим агентом - хлористый кальций. Внесение в реакционную смесь бифункционального сшивающего агента (хлористого кальция), позволило получить трехмерный

гель, который обладает способностью поглощать большое количество воды и набухать, при этом сохраняя свою сетчатую структуру.

3.3 Разработка биосенсорной тест-системы на основе иммобилизованного фермента для определения карбофоса в молоке

В данном разделе поставлена задача – разработать способ получения биосенсорной тест-системы на стеклянных и бумажных основах.

В качестве стеклянной основы для приготовления биосенсорной тест-системы с иммобилизованным ферментом ацетилхолинэстеразы была использована стеклянная палочка диаметром 5 мм и длиной 220 мм (ТУ 4320-012-29508133-2009).

Способ получения тест-системы состоит из следующих этапов:

- 2 г альгината натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды при комнатной температуре;

- 0,1 г фенолового красного растворяют в 10 мл дистиллированной воды;

- к 10 мл раствора альгината натрия добавляют 0,5 мл раствора фермента ацетилхолинэстеразы, затем добавляют 1 мл буферного раствора pH-8,4, тщательно перемешивают и добавляют 5-6 капель раствора индикатора фенолового красного;

- сухую чистую стеклянную палочку погружают в приготовленный раствор и выдерживают в течение 5 секунд, вынимают из раствора и погружают в раствор хлорида кальция на 5 секунд.

На поверхности стеклянной палочки образуется тонкая полимерная пленка, окрашенная в розовый цвет как показано на рисунке 19.

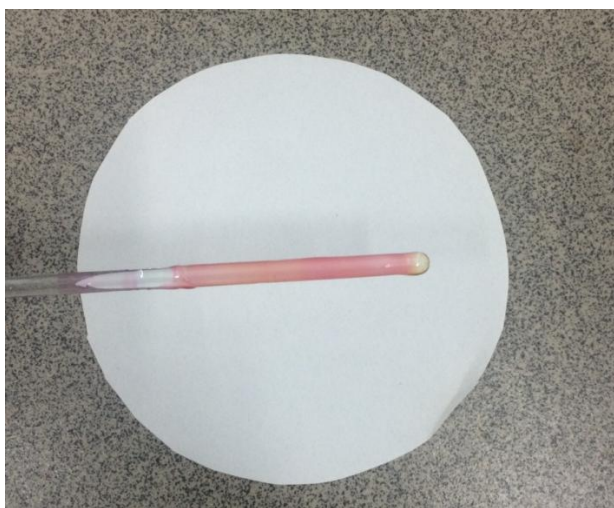


Рисунок 19– Тест-система на стеклянной основе

В качестве бумажной основы для приготовления биосенсорной тест-системы была использована хроматографическая бумага по ГОСТ 10395-75.

Способ получения тест-системы состоит из следующих этапов:

- 2 г альгината натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды при комнатной температуре;

- 0,1 г фенолового красного растворяют в 10 мл дистиллированной воды;
- к 10 мл раствора альгината натрия добавляют 0,5 мл раствора фермента ацетилхолинэстеразы, затем добавляют 1 мл буферного раствора рН-8,4, тщательно перемешивают и добавляют 5-6 капель раствора индикатора фенолового красного;
- хроматографическую бумагу разрезают на полоски длиной 100 мм и шириной 15 мм;
- бумажные полоски погружают в приготовленный раствор и выдерживают в течение 5 секунд, вынимают из раствора и погружают в раствор хлорида кальция на 5 секунд.

На поверхности бумажной тест-полоски образуется тонкая полимерная пленка, окрашенная в розовый цвет как показано на рисунке 20.



Рисунок 20– Тест-система на бумажной основе

Для практической апробации разработанных тест-систем, которые должны показывать результаты качественного определения фосфорорганического пестицида (карбофоса) в молоке, не уступающие известным биосенсорам, были использованы образцы молока с различной концентрацией карбофоса.

С этой целью были подготовлены образцы молока следующим образом:

- в 10 мл дистиллированной воды добавляли 0,1 г карбофоса для получения раствора с процентной концентрацией 0,99 %. Концентрацию полученного раствора рассчитываем по формуле:

$$\omega = \frac{m_{в-в}}{m_{р-р}} \times 100 \%, \quad (12)$$

где: $m_{в-в}$ - масса вещества, г;

m_{p-p} - масса полученного раствора, г.

- 0,1 мл полученного раствора разбавили водой до объема 100 мл для уменьшения концентрации карбофоса в растворе до $99 \times 10^{-6} \%$;

- для получения образцов молока с содержанием в нем карбофоса 0,03 мг/кг в молоко добавляем 3 мл $99 \times 10^{-6} \%$ раствора; для 0,05 мг/кг - в молоко добавляем 5 мл $99 \times 10^{-6} \%$ раствора; для 0,07 мг/кг - в молоко добавляем 7 мл $99 \times 10^{-6} \%$ раствора; для 0,09 мг/кг - в молоко добавляем 9 мл $99 \times 10^{-6} \%$ раствора; для 0,12 мг/кг - в молоко добавляем 12 мл $99 \times 10^{-6} \%$ раствора. Так как по результатам предварительных экспериментальных исследований было установлено, что изменение окраски тест-системы наблюдается при содержании карбофоса свыше 0,05 мг/кг, то при дальнейших исследованиях содержание карбофоса в молоке начинали со значения 0,03 мг/кг карбофоса в молоке.

Полученную тест-систему на стеклянной палочке погружали в образцы молока с содержанием карбофоса 0,03; 0,05; 0,07; 0,09 и 0,12 мг/кг.

При содержании карбофоса в молоке от 0,03 до 0,05 мг/кг окраска тест-системы не изменилась, при превышении же содержания карбофоса в молоке от 0,05 до 0,12 мг/кг наблюдается изменение окраски тест-системы из розового в желтый цвет как видно на рисунке 21.

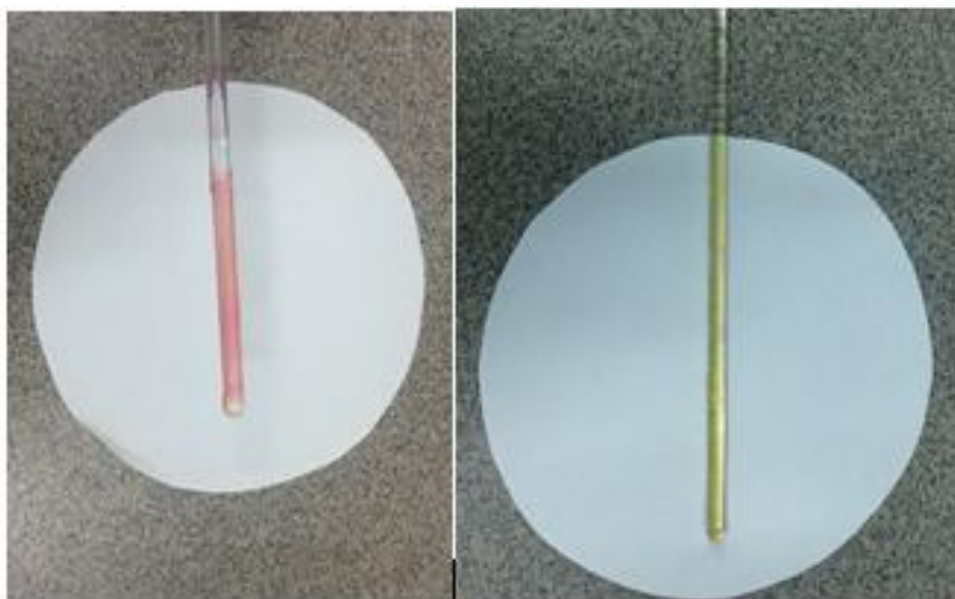


Рисунок 21 – Изменение цвета тест-системы при превышении содержания карбофоса в молоке

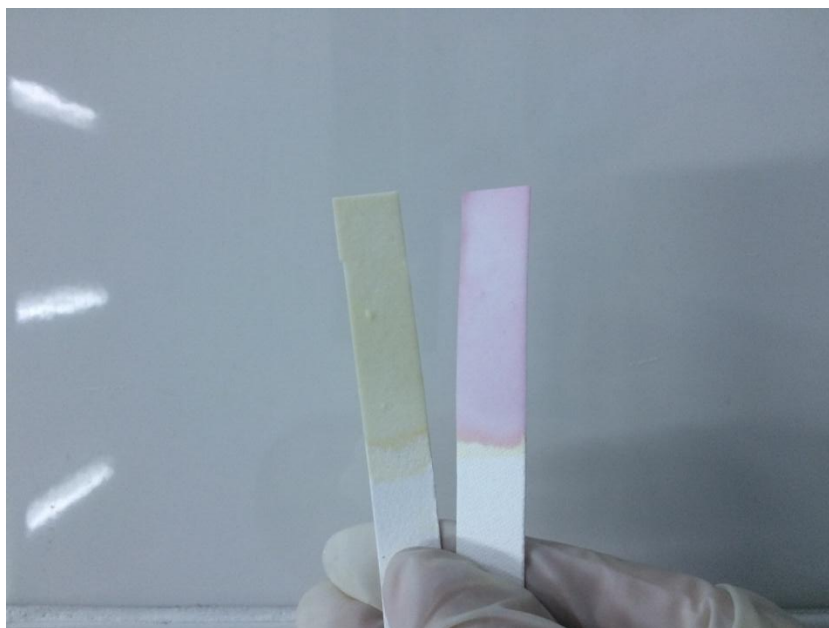


Рисунок 22 – Изменение цвета тест-системы при превышении содержания карбофоса в молоке

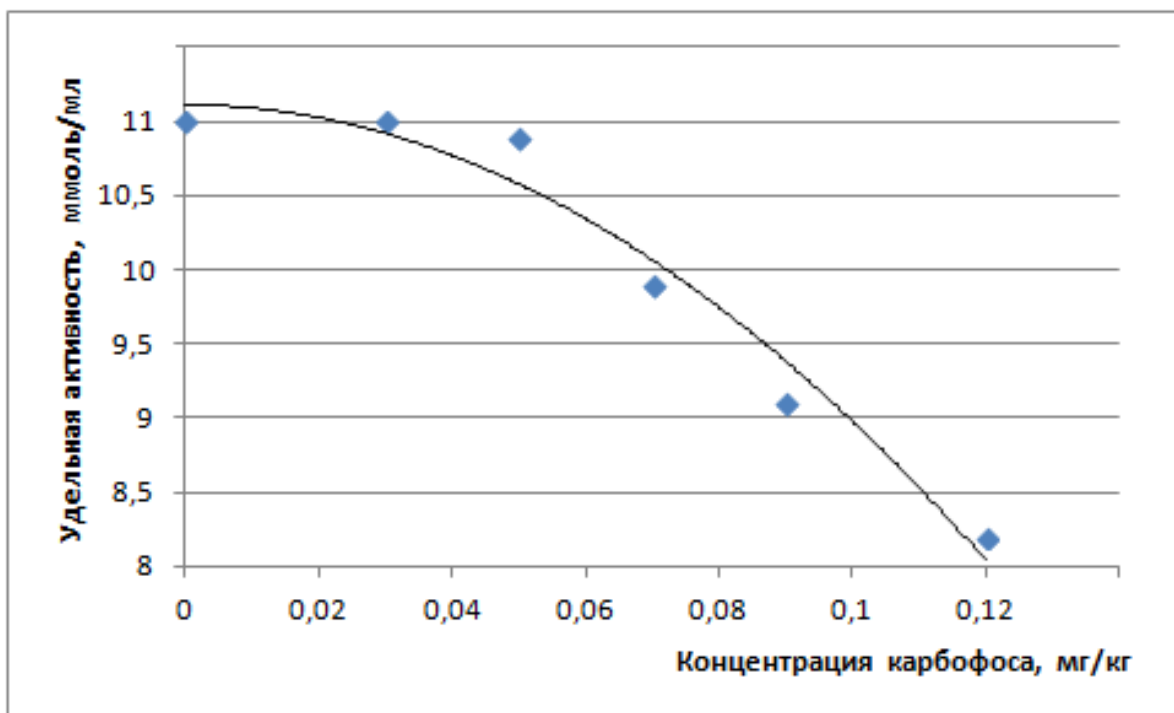
Полученную тест-систему на бумажной основе погружали также в образцы молока с содержанием карбофоса 0,03; 0,05; 0,07; 0,09 и 0,12 мг/кг.

При содержании карбофоса в молоке от 0,03 до 0,05 мг/кг окраска тест-системы не изменилась, при превышении же содержания карбофоса в молоке от 0,05 до 0,12 мг/кг также наблюдается изменение окраски тест-системы из розового в желтый цвет как видно на рисунке 22.

Результаты экспериментальных исследований раздела 3.1 показали, что ацетилхолинэстераза, как гидролитический фермент, обладает наиболее высокой удельной активностью и проявляет высокую чувствительность к ингибирующим свойствам карбофоса в молоке.

Удельная активность фермента определяется по концентрации выделившейся уксусной кислоты, которая, в свою очередь определяется по содержанию ионов водорода, в результате изменения окраски индикатора - фенолового красного на ФЭК - КФК – 5 при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В связи с этим на следующем этапе исследовано изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы в зависимости от концентрации карбофоса в исследуемых образцах молока. Результаты исследования представлены на рисунке 23.



$$y = -212,83x^2 - 0,0033x + 11,109 \quad (R^2 = 0,9627)$$

Рисунок 23– Изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы от концентрации карбофоса

На основании математической обработки полученных экспериментальных данных получено уравнение полиномиальной регрессии:

$$y = -cx^2 - bx + a \quad (13)$$

где c , b и a - коэффициенты регрессии;
 x - концентрация карбофоса, %.

Уравнение линейной регрессии имеет вид:

$$y = -212,83x^2 - 0,0033x + 11,109 \quad (R^2 = 0,9627)$$

В результате анализа коэффициентов регрессии установлено, что абсолютная величина коэффициента регрессии b имеет отрицательное значение, что показывает наибольшую зависимость изменения удельной активной ацетилхолинэстеразы от концентрации карбофоса.

Так, как видно из рисунка 23, удельная активность ацетилхолинэстеразы изменяется с увеличением содержания карбофоса в молоке свыше 0,05 мг/кг. При этом при содержании карбофоса в молоке от 0 до 0,03 мг/кг удельная активность фермента не изменяется. В промежутке содержания карбофоса в молоке от 0,03 до 0,05 мг/кг наблюдается незначительное понижение удельной активности фермента, соответственно от 11 ммоль/мл до 10,9 ммоль/мл.

На основании проведенных исследований установлено, что содержание карбофоса в молоке в количестве 0,05 мг/кг можно рассматривать как предельно-допустимую концентрацию. Так как, при проведении экспериментов с помощью биосенсорных тест-систем при содержании карбофоса в молоке 0,03 и 0,05 мг/кг не наблюдалось изменение окраски тест-систем, что подтверждает достоверность качественного определения карбофоса в молоке при концентрации не превышающей значение 0,05 мг/кг.

При достижении удельной активности фермента 10,9 ммоль/мл наблюдается резкое понижение удельной активности фермента с увеличением содержания карбофоса в молоке. Так, при содержании карбофоса в молоке 0,07 мг/кг удельная активность фермента составила 9,9 ммоль/мл, при 0,09 мг/кг - 9,1 ммоль/мл, при 0,12 мг/кг - 8,2 ммоль/мл. При проведении экспериментов с помощью биосенсорных тест-систем при содержании карбофоса в молоке от 0,07 и 0,12 мг/кг наблюдалось изменение окраски тест-систем из розового в желтый цвет.

Как показали результаты экспериментальных исследований с увеличением содержания карбофоса в молоке свыше 0,05 мг/кг понижается удельная активность фермента, что связано с его ингибированием карбофосом. Разработанные биосенсорные тест-системы как на стеклянной палочке, так и на бумажной основе показали изменение окраски с розового на желтый цвет, именно с концентрации в которой наблюдается резкое понижение удельной активности фермента.

Таким образом, на основании проведенных экспериментальных исследований разработанные биосенсорные тест-системы могут быть применены для определения фосфорорганического пестицида (карбофоса) не только в объектах окружающей среды, но и в молоке [150].

Вместе с тем необходимо отметить, что иммобилизацию фермента можно проводить не только на стеклянной поверхности, но и на бумажной основе. Данный фактор важен при выборе недорогого материала для создания тест-системы при серийном их производстве.

Разработанные тест-системы можно отнести к альтернативным методам определения пестицидов в молоке, являющиеся удобным, надежным и простым экспресс-методом для качественного определения содержания фосфорорганического пестицида.

4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПОНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КАРБОФОСА В МОЛОКЕ

4.1 Исследования изменения содержания карбофоса в процессе фильтрации молока с использованием цеолита

В настоящее время малоизвестны исследования по изучению процесса миграции по пищевой цепи фосфорорганических пестицидов в продукцию животноводства. Известны единичные работы отечественных и российских ученых, посвященных исследованию содержания остаточного количества данного ксенобиотика в мясе животных. В данных работах рассматривается актуальность проблемы токсического воздействия остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в мясном сырье на организм человека.

Вместе с тем, известны научные исследования, направленные на разработку методов очистки объектов окружающей среды от фосфорорганических пестицидов, в частности карбофоса с применением различных сорбентов. В качестве сорбентов для очистки объектов окружающей среды от карбофоса ученые в своих исследованиях предлагают использовать цеолиты (клиноптилолит и морденит), поскольку они проявляют высокую адсорбционную активность в отношении исследуемого ксенобиотика [151, 152, 153].

Необходимо отметить, что природный цеолит находит широкое распространение в качестве фильтрующего материала для очистки от токсичных веществ при производстве пищевых продуктов животного и растительного происхождения, например растительных масел, молочных продуктов и др. Перспективность применения цеолита в качестве фильтрующего материала объясняется его уникальными свойствами, а именно, высокими адсорбционными и ионообменными свойствами, значительной пористой структурой, химической природой, а также селективностью в отношении сорбции токсичных веществ [111].

На основании вышеизложенного в данной работе поставлена задача – исследование и разработка технологических параметров очистки молока от карбофоса.

На основании проведенных экспериментальных исследований при разработке биосенсорной тест-системы, результаты которых приведены в разделе 3.3 диссертации, установлено, что при содержании карбофоса в молоке 0,05 мг/кг не меняется окраска тест-системы, то есть данное количество карбофоса не снижает удельную активность фермента ацетилхолинэстеразы. С увеличением же количества карбофоса в молоке от 0,07 до 0,12 мг/кг наблюдается изменение окраски тест-системы из розового в желтый цвет, то есть данное количество карбофоса снижает удельную активность фермента. Снижение удельной активности ацетилхолинэстеразы свидетельствует об ингибирующем действии карбофоса на фермент. В связи с чем, в данной работе

изменение содержания карбофоса в молоке в процессе очистки определяли по величине удельной активности ацетилхолинэстеразы.

Для очистки молока от карбофоса в данной работе был выбран процесс фильтрации с применением в качестве фильтрующего материала - природного цеолита, основанный на его сорбционных свойствах. Известно, что благодаря наличию в микроструктуре цеолита полостей и каналов, а также большого свободного движения молекул воды и катионов данные минералы обладают молекулярно-ситовыми свойствами.

Молекулярно-ситовые свойства цеолита характеризуются избирательным поглощением ионов и молекул в процессе адсорбции и ионного обмена. Адсорбция и ионный обмен иона или молекул веществ протекает в адсорбционной полости цеолита при условии, если размеры ионов или молекулы вещества не превышают размера «входных окон» цеолита [154, 155]. На основе анализа литературных источников установлено, что цеолит имеет размер «входных окон» от 3 до 10 ангстрем, размер же молекулы малатиона (карбофоса) составляет 3,5-6,0 ангстрем по данным Брек Д.В. (1976 г), что объясняет выбор цеолита для очистки молока от карбофоса.

В настоящее время уделяется большое внимание очистке молока от токсичных веществ с применением цеолита в качестве сорбционного материала на различных установках (ионообменная установка, сепаратор, фильтрационная установка и др.) [112, 156].

Экспериментальные исследования были проведены на лабораторной установке «Стенд для моделирования фильтрации жидкостей» (Инновационный патент № 30570. Оpubл. 16.11.2015 г. Бюлл. № 11), разработанной учеными Государственного университета имени Шакарима [157]. Лабораторная установка представлена на рисунке 24 [155].

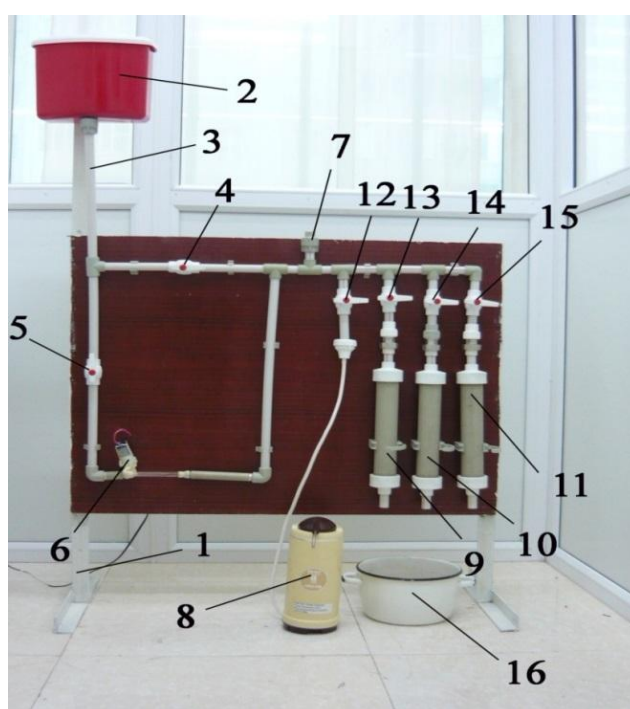


Рисунок 24- Стенд для моделирования фильтрации жидкостей

Процесс фильтрации молока (рисунок 24) протекает непосредственно в трех рабочих фильтрах. Регулирование потока жидкости в фильтры осуществляется вентилями (13, 14, 15). Из приемной емкости 2 под давлением насоса 6 по трубопроводу 3 при открытом вентиле 5 и 13, а также при закрытых вентилях 14 и 15 молоко перекачивается в фильтр 9 с диаметром корпуса 50 мм, в котором содержится цеолит в количестве 100 г, что составляет 40 % наполняемости фильтра. При закрытом же вентиле 13 и 15, и при открытом вентиле 5 и 14 молоко перекачивается в фильтр 10, в котором содержится цеолит в количестве 150 г, что составляет 60 % наполняемости фильтра. При закрытом же вентиле 13 и 14, и при открытом вентиле 5 и 15 молоко перекачивается в фильтр 11, в котором содержится цеолит в количестве 200 г, что составляет 80 % наполняемости фильтра. Для подачи жидкости как видно из рисунка 24 используется насос, который оснащен двигателем постоянного тока (12 В) с питанием от регулируемого блока питания. Рабочий фильтр стенда для моделирования фильтрации жидкостей состоит из цилиндрического корпуса, который был изготовлен из водопроводной трубы длиной 300 мм и диаметром 50 мм с нарезанной резьбой на концах. Крышки с резьбовыми креплениями изготовлены из водопроводных переходников с 50 мм на 20 мм [155, 158, 159].

Для разработки технологических параметров фильтрации были проведены исследования по определению влияния температуры, давления подачи молока и объема заполнения фильтра цеолитом на процесс очистки молочного сырья от карбофоса. Для проведения исследования процесс фильтрации проводили по технологической схеме (рисунок 25) [155, 158, 159].



Рисунок 25 – Технологическая схема фильтрации молока

В соответствии с представленной технологической схемой фильтрацию молока проводили при разном объеме наполняемости трех фильтров цеолитом, при разных температурах и частоте оборотов насоса. При этом объемная производительность насоса составляла 3 л/мин при число оборотов насоса $1,6 \text{ с}^{-1}$, 6 л/мин – $3,3 \text{ с}^{-1}$, 10 л/мин – 5 с^{-1} и 13 л/мин – $6,6 \text{ с}^{-1}$.

Фильтрацию молока проводили при температурах выше $20 \text{ }^\circ\text{C}$, поскольку при более низких температурах, как известно, повышается вязкость молока, что затруднит процесс фильтрования через сорбционный материал.

Для того чтобы повысить эффективность процесса фильтрации молока с применением фильтрующего материала – цеолита были выбраны следующие режимы: $20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$, $25\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$ и $30\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$.

На первом этапе исследования были проведены в фильтре № 1, в котором содержание цеолита составило 100 г, что соответствует 40 % наполняемости фильтра при разных температурных режимах и разной частоте оборотов насоса.

Результаты экспериментальных исследований представлены на рисунках 26, 27, 28.

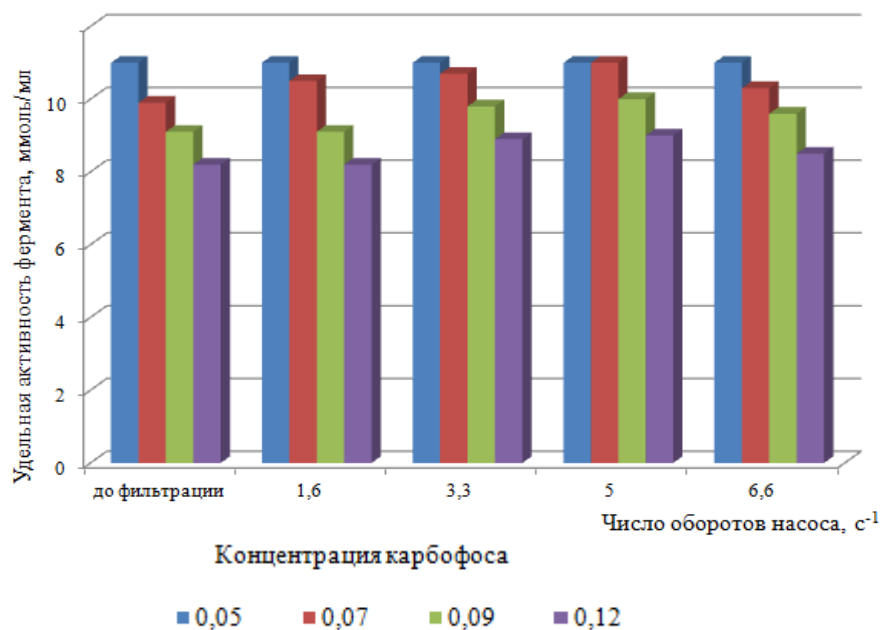


Рисунок 26 – Изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы в процессе фильтрации молока при температуре $20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$

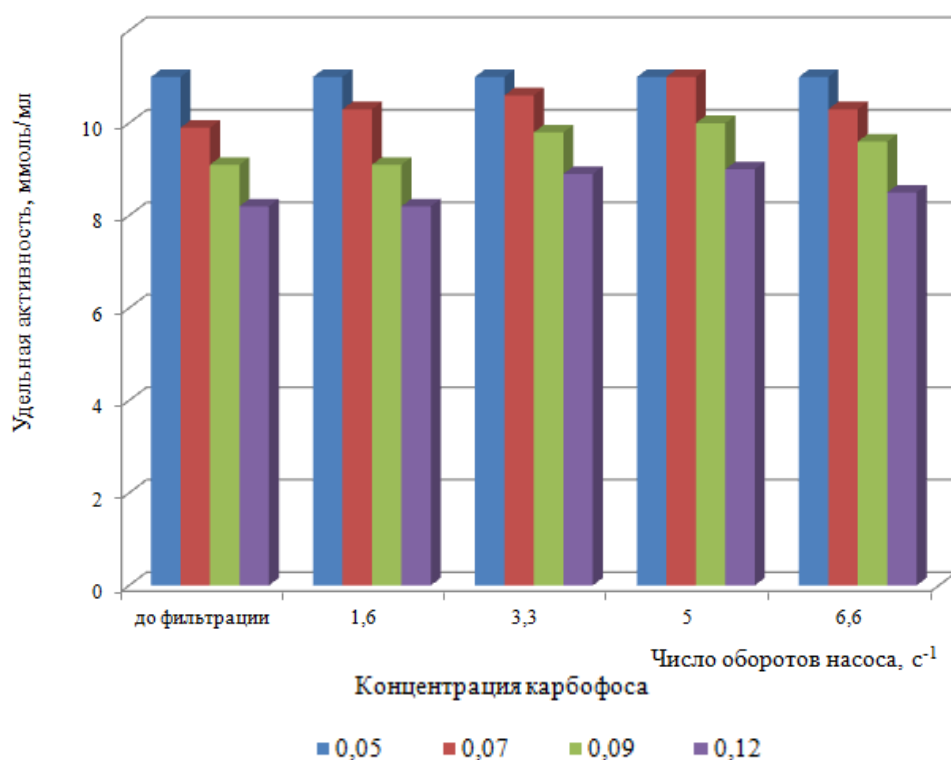


Рисунок 27 – Изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы в процессе фильтрации молока при температуре 25-30 °С

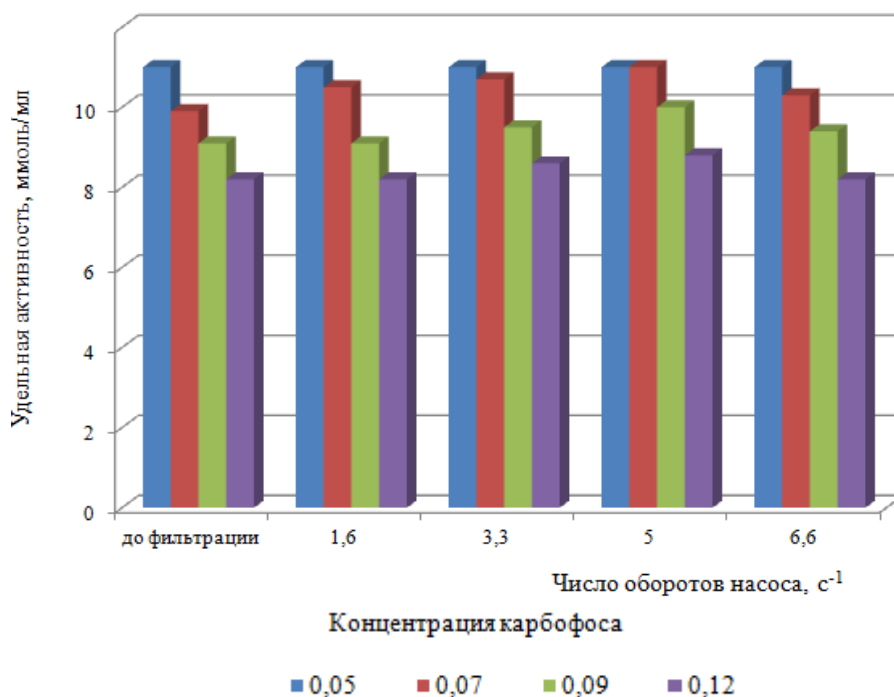


Рисунок 28 – Изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы в процессе фильтрации молока при температуре 30-35 °С

Как видно из рисунков 26, 27 и 28 удельная активность ацетилхолинэстеразы при содержании в молоке карбофоса до фильтрации в количестве 0,05 мг/кг составила 11 ммоль/мл.

При содержании же 0,07 мг/кг карбофоса в молоке удельная активность ацетилхолинэстеразы составила 9,9 ммоль/мл, при содержании карбофоса 0,09

мг/кг – 9,1 ммоль/мл и при содержании карбофоса 0,12 мг/кг – 8,2 ммоль/мл. Более низкие показатели удельной активности ацетилхолинэстеразы свидетельствуют об инактивации фермента карбофосом.

В процессе фильтрации молока с содержанием карбофоса 0,05 мг/кг через первый фильтр при температурах 20-25 °С, 25-30 °С, 30-35 °С и разной производительности насоса удельная активность фермента ацетилхолинэстеразы не изменилась и составила 11 ммоль/мл.

При содержании карбофоса в молоке 0,07 мг/кг удельная активность ацетилхолинэстеразы в процессе фильтрации изменилась от 9,9 до 10,5 ммоль/мл при числе оборотов насоса $1,6 \text{ с}^{-1}$, до 10,7 ммоль/мл при $3,3 \text{ с}^{-1}$ и до 10,3 ммоль/мл при $6,6 \text{ с}^{-1}$, что свидетельствует о незначительном понижении содержания карбофоса в молоке.

При числе же оборотов насоса 5 с^{-1} удельная активность фермента составила 11 ммоль/мл, что свидетельствует о снижении количества карбофоса в молоке после фильтрации.

Необходимо отметить, что процесс фильтрации молока с содержанием карбофоса от 0,09 до 0,12 мг/кг при содержании 100 г цеолита в фильтре при разных температурах и производительности насоса незначительно влияет на изменение содержания данного ксенобиотика в молоке.

В процессе фильтрации молока при разных температурных режимах удельная активность фермента не изменяется при производительности насоса $1,6 \text{ с}^{-1}$. Увеличение же производительности насоса незначительно понижает содержание карбофоса в молоке, поскольку удельная активность фермента после фильтрации изменилась незначительно в сравнении с удельной активностью фермента до фильтрации молока. Так, при содержании 0,09 мг/кг карбофоса в молоке с увеличением числа оборотов насоса до $3,3 \text{ с}^{-1}$ удельная активность ацетилхолинэстеразы изменилась от 9,1 до 9,8 ммоль/мл, при 5 с^{-1} до 10 ммоль/мл, при $6,6 \text{ с}^{-1}$ до 9,6 ммоль/мл. При содержании же 0,12 мг/кг карбофоса в молоке с увеличением числа оборотов насоса до $3,3 \text{ с}^{-1}$ удельная активность ацетилхолинэстеразы изменилась от 8,2 до 8,9 ммоль/мл, при 5 с^{-1} до 9,0 ммоль/мл, при $6,6 \text{ с}^{-1}$ до 8,5 ммоль/мл.

На следующем этапе была проведена фильтрация молока на стенде для моделирования фильтрации жидкостей через второй фильтр с содержанием цеолита 150 г, что соответствует 60 % наполняемости фильтра.

Фильтрацию молока проводили при температуре 20-25 °С, 25-30 °С и 30-35 °С и объемной производительности насоса 3 л/мин при частоте оборотов насоса $1,6/ \text{с}^{-1}$, 6 л/мин – $3,3 \text{ с}^{-1}$, 10 л/мин – 5 с^{-1} и 13 л/мин – $6,6 \text{ с}^{-1}$.

Результаты экспериментальных исследований процесса фильтрации представлены на рисунках 29, 30 и 31.

Удельная активность ацетилхолинэстеразы при содержании в молоке карбофоса до фильтрации в количестве 0,05 мг/кг составило 11 ммоль/мл, при содержании карбофоса 0,07 мг/кг – 9,9 ммоль/мл, при содержании карбофоса 0,09 мг/кг – 9,1 ммоль/мл и при содержании карбофоса 0,12 мг/кг – 8,2 ммоль/мл.

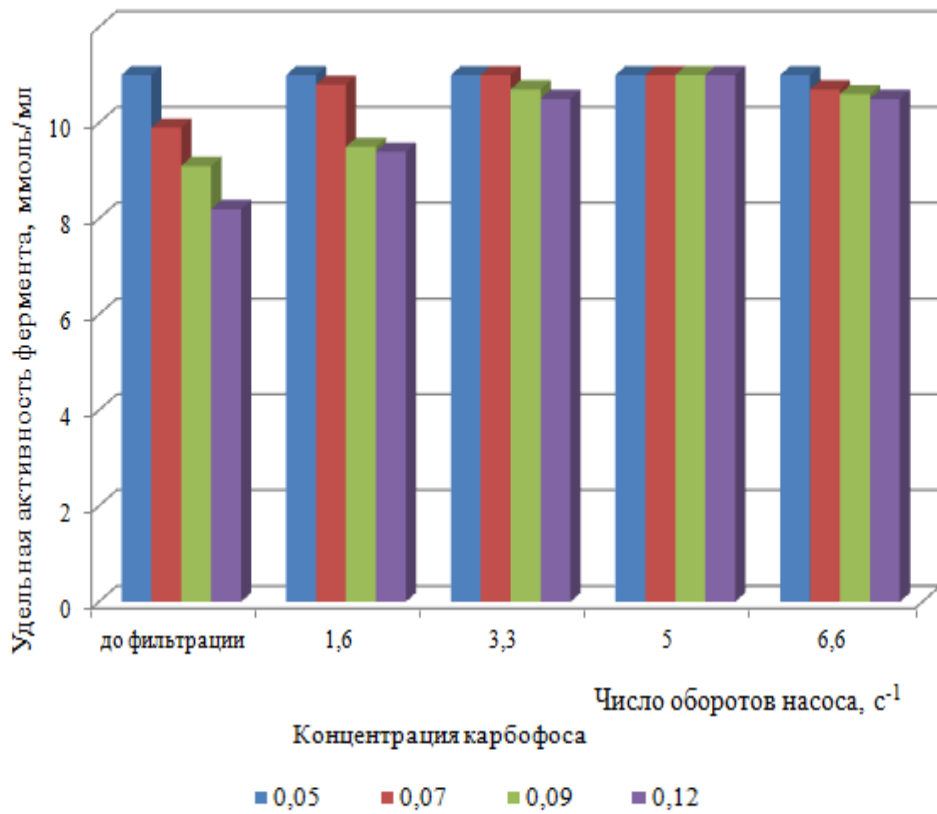


Рисунок 29 – Изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы в процессе фильтрации молока при температуре 20-25 °С

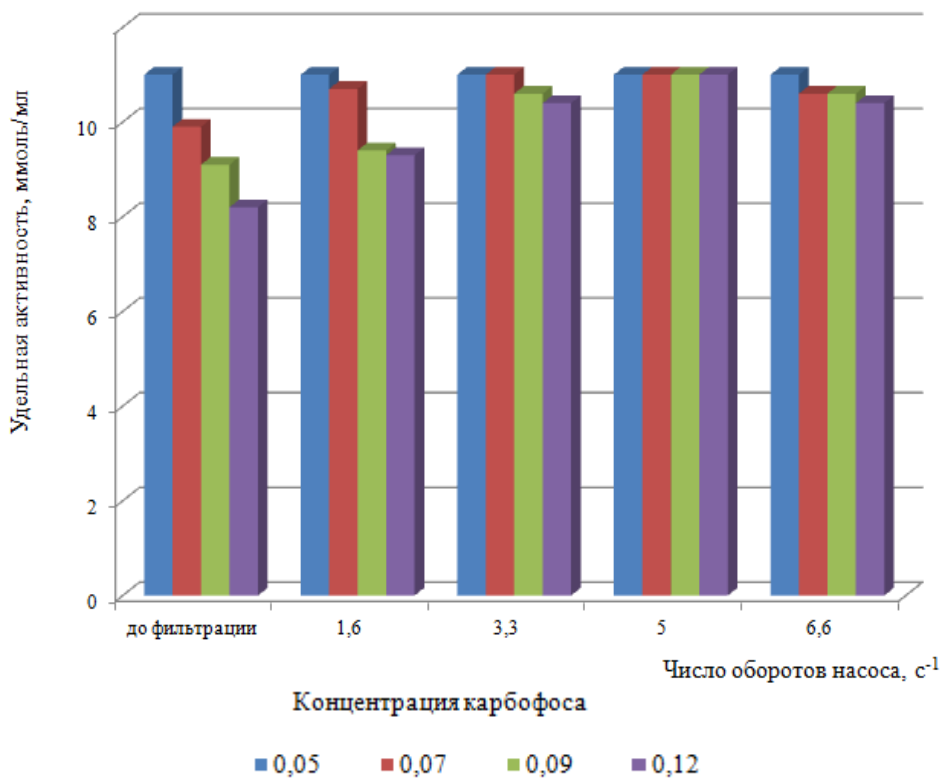


Рисунок 30 – Изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы в процессе фильтрации молока при температуре 25-30 °С

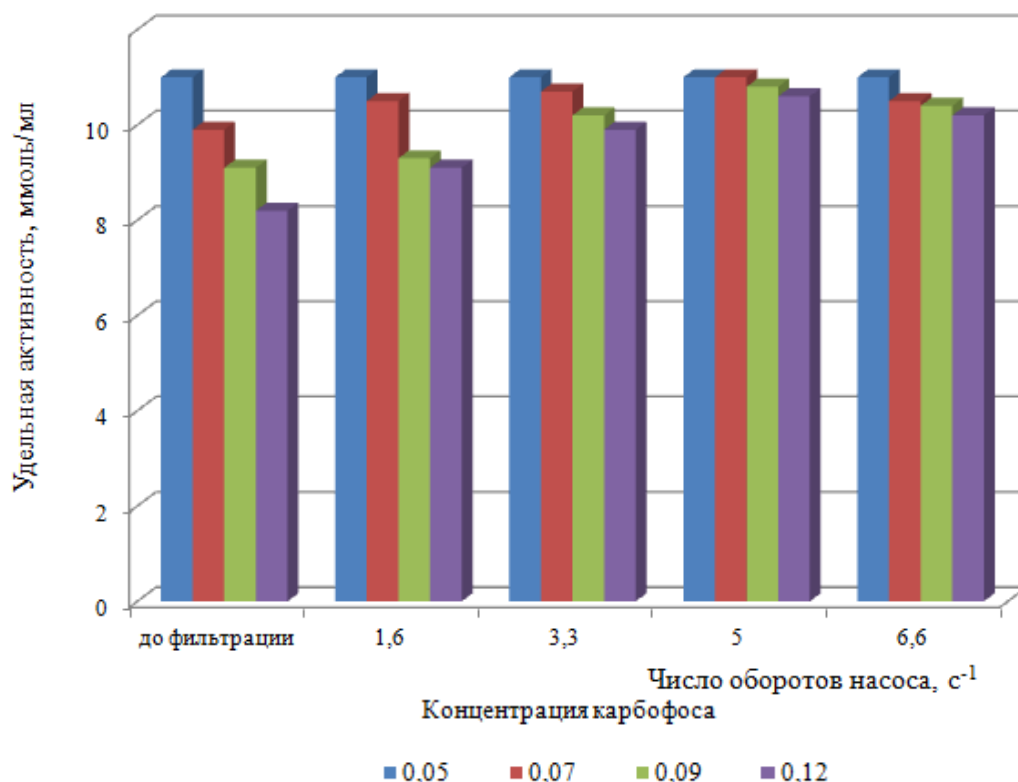


Рисунок 31 – Изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы в процессе фильтрации молока при температуре 30-35 °С

Как видно из рисунков 29, 30 и 31 увеличение наполняемости рабочего фильтра цеолитом до 60 % (150 г) способствует понижению содержания карбофоса в молоке в процессе фильтрации с числом оборотов насоса 5 с⁻¹, при температурах 20-25 °С и 25-30 °С, поскольку удельная активность ацетилхолинэстеразы увеличилась до 11 ммоль/мл.

Вместе с тем, при содержании карбофоса в молоке 0,07 мг/кг в процессе фильтрации с числом оборотов насоса 3,3 с⁻¹, при температурах 20-25 °С и 25-30 °С также наблюдается увеличение удельной активности фермента до 11 ммоль/мл.

С увеличением же содержания карбофоса в молоке процесс фильтрации с более низкой производительностью насоса 1,6 и 3,3 с⁻¹ при всех температурных режимах незначительно понижает содержание данного ксенобиотика в исходном сырье.

Так, при частоте оборотов насоса 1,6 с⁻¹ и при содержании карбофоса в молоке от 0,09 до 0,12 мг/кг удельная активность ацетилхолинэстеразы увеличилась в пределах 9,1-9,5 ммоль/мл. При содержании карбофоса в молоке 0,07 мг/кг удельная активность фермента возросла в пределах 10,5 – 10,8 ммоль/мл.

При числе оборотов насоса 3,3 с⁻¹ и при содержании карбофоса в молоке 0,09-0,12 мг/кг удельная активность ацетилхолинэстеразы увеличилась в пределах 9,9- 10,7 ммоль/мл.

Однако с увеличением числа оборотов насоса до 6,6 с⁻¹ при всех температурных режимах наблюдается понижение процесса сорбции карбофоса

цеолитом, вероятнее всего, это связано с тем, что с увеличением скорости потока молока динамическая активность сорбента понижается. Так, в процессе фильтрации с числом оборотов насоса $6,6 \text{ с}^{-1}$ при всех температурных режимах удельная активность фермента увеличилась в пределах $10,2 - 10,7$ ммоль/мл.

Таким образом, процесс фильтрации при числе оборотов насоса 5 с^{-1} положительно влияет на процесс сорбции карбофоса цеолитом. По-видимому, это связано с уменьшением диффузионного сопротивления при прохождении адсорбтива во «входные окна» пористой структуры цеолита [112, 160].

На основании проведенных исследований установлено, что на процесс очистки молока с повышением содержания в нем карбофоса влияет, не только объем наполняемости фильтров цеолитом, число оборотов насоса, но и температура фильтрации.

Как видно из рисунка 31, при содержании карбофоса в молоке $0,07 \text{ мг/кг}$ с повышением температуры фильтрации до $30-35 \text{ }^\circ\text{C}$ удельная активность фермента увеличилось до 11 ммоль/мл, что свидетельствует о понижении содержания данного пестицида в молоке после фильтрации.

С повышением же содержания карбофоса в исходном молоке температура фильтрации влияет на процесс адсорбции данного пестицида. Так, при содержании $0,09 \text{ мг/кг}$ карбофоса в молоке в процессе фильтрации при температуре $30-35 \text{ }^\circ\text{C}$ с числом оборотов насоса $1,6 \text{ с}^{-1}$ удельная активность ацетилхолинэстеразы увеличилась от $9,1$ до $9,3$ ммоль/мл, при $3,3 \text{ с}^{-1}$ до $10,2$ ммоль/мл, при 5 с^{-1} до $10,8$ ммоль/мл, при $6,6 \text{ с}^{-1}$ до $10,4$ ммоль/мл.

При содержании $0,12 \text{ мг/кг}$ карбофоса в молоке в процессе фильтрации с числом оборотов насоса $1,6 \text{ с}^{-1}$ удельная активность ацетилхолинэстеразы увеличилась от $8,2$ до $9,1$ ммоль/мл, при $3,3 \text{ с}^{-1}$ до $9,9$ ммоль/мл, при 5 с^{-1} до $10,6$ ммоль/мл, при $6,6 \text{ с}^{-1}$ до $10,2$ ммоль/мл.

Незначительное влияние температуры фильтрации $30-35 \text{ }^\circ\text{C}$ на процесс адсорбции карбофоса (малатиона) в молоке, вероятнее всего, связано с тем, что при воздействии температуры содержащиеся в молоке минорные сывороточные белки меняют свою четвертичную структуру, при этом высвобождаются активные аминокрупы белка, которые в свою очередь, способны присоединять молекулы малатиона (карбофоса) [161].

В связи с тем, что незначительная часть карбофоса возможно остается в молоке в связанном состоянии.

Вместе с тем на основании анализа литературных источников установлено, что оптимальной температурой адсорбции токсичных элементов в водной среде является $18-20 \text{ }^\circ\text{C}$, так как процесс адсорбции на цеолите носит экзотермический характер и с повышением температуры наблюдается процесс десорбции [160].

На третьем этапе была проведена фильтрация молока на стенде для моделирования фильтрации жидкостей через третий фильтр с содержанием цеолита 200 г с наполняемостью фильтра 80% .

Фильтрацию молока проводили при тех же режимах.

Результаты экспериментальных исследований процесса фильтрации представлены на рисунках 32, 33 и 34.

Удельная активность ацетилхолинэстеразы при содержании в молоке карбофоса до фильтрации в количестве 0,05 мг/кг составило 11 ммоль/мл, при содержании карбофоса 0,07 мг/кг – 9,9 ммоль/мл, при содержании карбофоса 0,09 мг/кг – 9,1 ммоль/мл и при содержании карбофоса 0,12 мг/кг – 8,2 ммоль/мл.

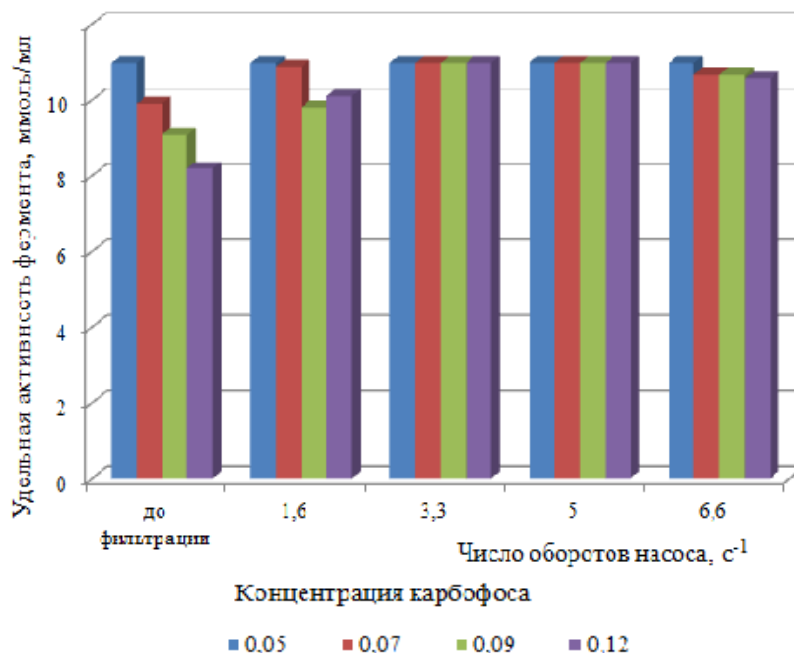


Рисунок 32 – Изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы в процессе фильтрации молока при температуре 20-25 °С

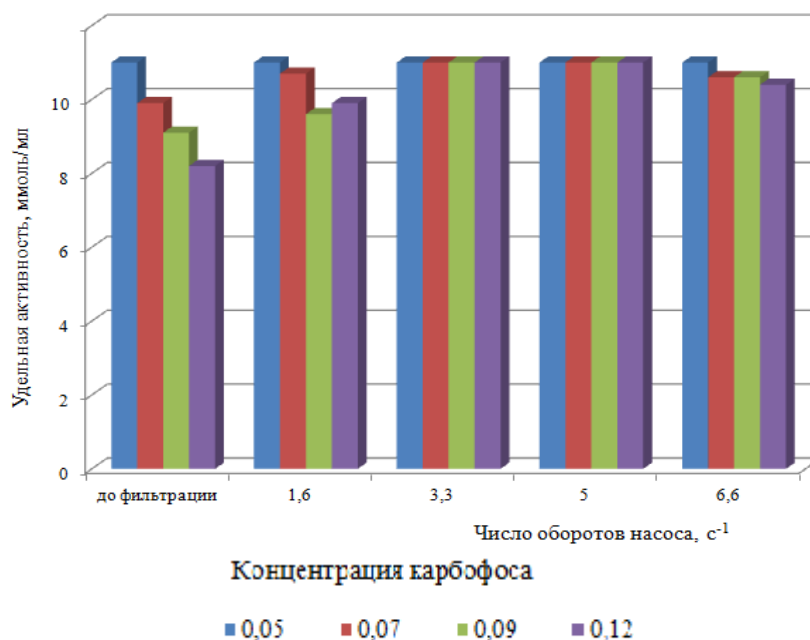


Рисунок 33 – Изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы в процессе фильтрации молока при температуре 25-30 °С

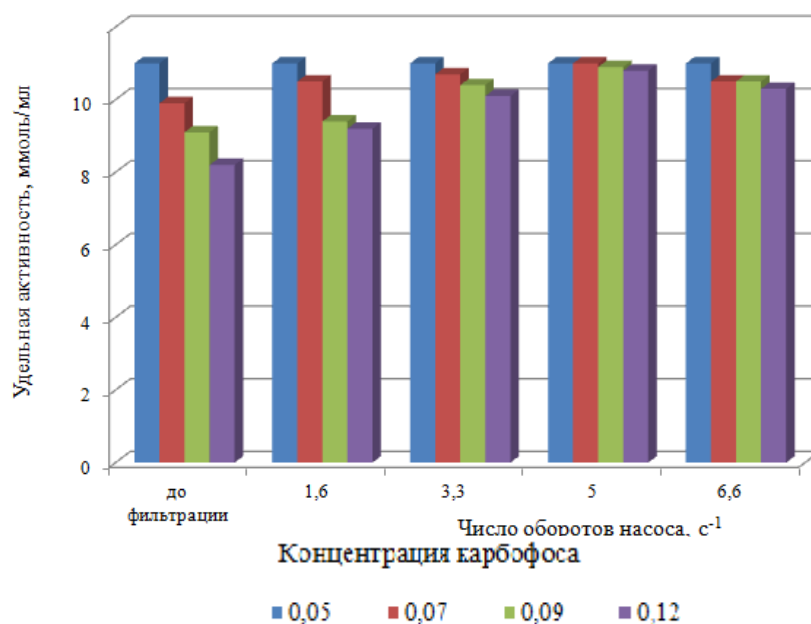


Рисунок 34 – Изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы в процессе фильтрации молока при температуре 30-35 °С

Как видно из рисунков 32, 33 и 34 увеличение объема наполняемости фильтра до 80 % (200 г) цеолитом повышает степень очистки молока от пестицида. Так, при содержании карбофоса в молоке в количестве 0,09 мг/кг в процессе фильтрации при температурах 20-25 °С и 25-30 °С, числе оборотов насоса 3,3 с⁻¹ удельная активность ацетилхолинэстеразы увеличилась от 9,1 до 11 ммоль/мл (рисунок 32, 33). Необходимо отметить, что при содержании в фильтре 150 г цеолита (наполняемость 60 %) удельная активность фермента при тех же режимах фильтрации изменилась от 9,1 до 10,6-10,7 ммоль/мл. С повышением же температуры до 30-35 °С удельная активность ацетилхолинэстеразы увеличилась до 10,6-10,7 ммоль/мл (рисунок 34).

При фильтрации молока при температурах 20-25 °С и 25-30 °С, числе оборотов насоса 5 с⁻¹ удельная активность ацетилхолинэстеразы также увеличивается до 11 ммоль/мл, что свидетельствует о понижении содержания карбофоса в молоке.

В процессе фильтрации молока с числом оборотов насоса 6,6 с⁻¹ содержание карбофоса уменьшается в меньшей степени, поскольку при всех температурных режимах удельная активность фермента увеличилась в пределах 10,5-10,7 ммоль/мл.

При более высоком содержании карбофоса 0,12 мг/кг в молоке в процессе фильтрации при температурах 20-25 °С и 25-30 °С, числе оборотов насоса 3,3 с⁻¹ удельная активность ацетилхолинэстеразы увеличилась от 8,2 до 11 ммоль/мл, при содержании же 150 г цеолита в фильтре удельная активность фермента увеличилась только лишь до 10,4-10,6 ммоль/мл.

С увеличением числа оборотов насоса до 5 с⁻¹ также наблюдается увеличение удельной активности фермента до 11 ммоль/мл, что свидетельствует о понижении содержания карбофоса в молоке.

Однако с увеличением температуры фильтрации молока до 30-35 °С наблюдается изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы до 10,4-10,8 ммоль/мл, то есть наблюдается понижение содержания карбофоса в молоке, но выше 0,05 мг/кг.

На основании проведенных исследований установлено, что процесс фильтрации молока с применением цеолита в качестве фильтрующего материала способствует понижению содержания карбофоса в исходном сырье. При этом очистка молока от карбофоса основана на процессе адсорбции, поскольку, как известно из литературных источников цеолит обладает значительным сорбционным свойством без сложной дополнительной обработки [155, 162].

На эффективность процесса фильтрации влияют объем наполняемости фильтров цеолитом, объемная производительность насоса и температура фильтрации. С увеличением объема наполняемости фильтров цеолитом до 80 % (200 г) удельная активность ацетилхолинэстеразы повышается до 11 ммоль/мл для всех опытных образцов уже при объемной производительности насоса 6 л/мин ($3,3 \text{ с}^{-1}$), то есть наблюдается значительное понижение содержания карбофоса в молоке.

Однако при 60 % наполняемости фильтров цеолитом (150 г) при объемной производительности насоса 6 л/мин ($3,3 \text{ с}^{-1}$) удельная активность фермента достигает значения 11 ммоль/мл при содержании в молоке карбофоса в количестве от 0,05-0,07 мг/кг. При повышенном содержании карбофоса до 0,09-0,12 мг/кг удельная активность увеличивается только лишь до 10,5-10,7 ммоль/мл. С повышением объемной производительности насоса до 10 л/мин (5 с^{-1}) наблюдается увеличение удельной активности фермента до 11 ммоль/мл во всех опытных образцах при содержании цеолита в фильтрах 150-200 г (60-80 % наполняемости), то есть наблюдается понижение содержания карбофоса в молоке на уровне 0,05 мг/кг и ниже 0,05 мг/кг данного пестицида в исходном сырье.

Таким образом, необходимо отметить, что при наполняемости объема фильтра 60 % на изменение содержания карбофоса в молоке влияет уже и объемная производительность насоса фильтрационной установки.

При содержании в фильтре 100 г цеолита (40 % наполняемости) удельная активность фермента достигает значения 11 ммоль/мл при содержании 0,05-0,07 мг/кг карбофоса в молоке. С повышением содержания карбофоса в молоке от 0,09 до 0,12 мг/кг в процессе фильтрации с объемной производительностью насоса до 10 л/мин (5 с^{-1}) удельная активность фермента увеличивается только лишь до 9-10 ммоль/мл, что свидетельствует о незначительном понижении содержания данного пестицида в молоке.

Таким образом, необходимо отметить, что на изменение содержания карбофоса, прежде всего, влияет наполняемость фильтра цеолитом. При увеличении объема наполняемости фильтра цеолитом до 80 % содержание карбофоса изменяется даже при низком числе оборотов насоса фильтрационной установки. С уменьшением же объема наполняемости фильтра цеолитом до 60

и 40 % на изменение содержания карбофоса в молоке влияет уже число оборотов насоса. В связи с чем, наиболее оптимальным объемом наполняемости фильтра является 80 %.

Рассмотрим влияние объемной производительности насоса фильтрационной установки на изменение содержания карбофоса в молоке по результатам проведенных исследований при наполняемости фильтра 80 % (200 г).

Как показали результаты исследования при объемной производительности насоса $1,6 \text{ с}^{-1}$ удельная активность фермента изменяется незначительно, что свидетельствует о незначительном понижении карбофоса в молоке, с увеличением объемной производительности насоса до $3,3$ и 5 с^{-1} удельная активность фермента увеличивается до максимального значения 11 ммоль/мл , что свидетельствует об уменьшении содержания карбофоса в молоке. С увеличением же объемной производительности насоса до $6,6 \text{ с}^{-1}$ наблюдается незначительное понижение удельной активности фермента, что свидетельствует о низком процессе сорбции карбофоса цеолитом. По-видимому, это связано с тем, что с увеличением скорости потока молока динамическая активность сорбента понижается и уменьшается диффузионное сопротивление при прохождении адсорбтива во «входные окна» пористой структуры цеолита.

Таким образом, наиболее оптимальной объемной производительностью насоса фильтрационной установки является $3,3 \text{ с}^{-1}$.

На процесс очистки молока от фосфорорганического пестицида также влияет температура. На основании проведенных исследований установлено, что наиболее оптимальной температурой фильтрации молока является $20-25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ и $25-30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. С повышением температуры фильтрации до $30-35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ во всех образцах молока с содержанием $0,09-0,12 \text{ мг/кг}$ карбофоса наблюдается незначительное изменение удельной активности ацетилхолинэстеразы, которая находилась в пределах $8,2-10,9 \text{ ммоль/мл}$. Это можно объяснить, прежде всего тем, что процесс адсорбции на цеолите носит экзотермический характер и с повышением температуры наблюдается процесс десорбции [160].

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что процесс фильтрации молока на фильтрационной установке с применением цеолита в качестве фильтрующего материала при содержании в фильтрах 200 г цеолита (80 % наполняемости), при объемной производительности насоса до 6 л/мин ($3,3 \text{ с}^{-1}$) и температуре $20-25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ способствует очистке молока от карбофоса.

4.2 Разработка технологии творага с применением системы анализа рисков и критических контрольных точек

На основании исследований изменения содержания карбофоса в процессе фильтрации молочного сырья с использованием цеолита определены технологические параметры очистки молока от ксенобиотика.

В связи с этим, в данном разделе поставлена задача – разработка технологии молочного продукта с использованием способа очистки молока от ксенобиотика на основе определения критических контрольных точек.

Поскольку в результате многолетних исследований российскими учеными установлено, что аминокруппы казеина молочного белка способны к реакции ковалентного связывания с пестицидами [161], то немаловажное значение приобретает задача обеспечения безопасности белковых молочных продуктов из молочного сырья, содержащего остаточное количество карбофоса, превышающее 0,05 мг/кг.

В связи с чем, в данной работе для производства молочного продукта из загрязненного молочного сырья карбофосом выбран молочный продукт, а именно творог. Для производства творога с массовой долей жира 9 % отдельным способом применяется цельное молоко, закваска, приготовленная на чистых культурах мезофильных и термофильных стрептококков, сычужный фермент и хлористый кальций по следующей рецептуре:

Таблица 7 – Рецептура на творог 9 % жирности (в кг на 1000 кг продукта)

Наименование сырья	Количество сырья, кг
Нежирный творог с массовой долей влаги не более 80 %	820
Сливки с массовой долей жира 50 %	180
Всего	1000

При производстве творога из молочного сырья, содержащего остаточное количество карбофоса, предусмотрен процесс фильтрации молока с применением цеолита в качестве фильтрующего материала для его очистки от ксенобиотика.

Технологический процесс производства творога состоит из следующих этапов:

- приемка и оценка качества молока;
- подогрев молока до температуры фильтрации;
- фильтрация молока с применением цеолита в качестве фильтрующего материала;
- подогрев молока для сепарирования;
- сепарирование молока;
- пастеризация обезжиренного молока и сливок;
- охлаждение обезжиренного молока до температуры заквашивания;
- заквашивание и сквашивание обезжиренного молока;
- разрезка и обработка сгустка;
- самопрессование и прессование сгустка;
- охлаждение нежирного творога;
- смешивание нежирного творога со сливками;

- оценка показателей безопасности творога;
- расфасовка и упаковка;
- хранение и реализация.

1. Приемка и оценка качества молочного сырья.

Сырье, применяемое в производстве творога должно соответствовать действующей нормативной технической документации. По показателям безопасности молочное сырье должно соответствовать требованиям Технического регламента Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевых продуктов». Содержание остаточного количества фосфорорганических пестицидов не регламентируется нормативной технической документации. При обнаружении в молочном сырье остаточного количества фосфорорганических пестицидов для его очистки рекомендуется проводить дополнительную фильтрацию с применением цеолита в качестве фильтрующего материала.

2. Подогрев молока до 20-25 °С.

Для фильтрации с применением цеолита в качестве фильтрующего материала молоко, содержащее остаточное количество фосфорорганических пестицидов 0,05 мг/кг и более, подогревают до температуры 20-25 °С.

3. Фильтрация молока.

Для фильтрации молока с применением цеолита в качестве фильтрующего материала при температуре 20-25°С использовали угловой нержавеющей сетчатый молочный фильтр.

4. Подогрев молока для сепарирования.

Для проведения процесса сепарирования на сепараторе-сливкоотделителе молоко подогревается до температуры 35-40°С в секции регенерации в пастеризационно-охладительной установке.

5. Сепарирование молока.

Сепарирование молока проводится на сепараторе-сливкоотделителе при температуре 35-40°С, где разделяется на обезжиренное молоко и сливки с массовой долей жира 50 %.

6. Пастеризация обезжиренного молока и сливок.

Пастеризацию обезжиренного молока проводят в пастеризационно-охладительной установке при температуре 78-80°С с выдержкой 20-30 секунд с дальнейшим охлаждением до температуры заквашивания молока 32-35 °С. Пастеризацию сливок проводят в пастеризационно-охладительной установке при температуре 85-90°С с выдержкой 15-20 секунд с дальнейшим охлаждением до температуры хранения 2-4 °С и отправляют на временное хранение до смешивания с нежирным творогом.

7. Заквашивание и сквашивание обезжиренного молока.

Заквашивание обезжиренного молока ускоренным способом проводится при температуре 32-35°С с добавлением закваски чистых культур 2,5 % термофильных стрептококков и 2,5 % мезофильных стрептококков, сычужного фермента в виде 1 %-ного раствора из расчета 1 г фермента на 1 т

молока, 40 %-ный раствор хлористого кальция из расчета 400 г безводной соли на 1 т молока. После перемешивания обезжиренное молоко оставляют для сквашивания при температуре 32-35°C в течение 4-5 часов. Готовность сгустка определяется по его кислотности 60-65 °Т и пробой на излом. Для пробы на излом применяют шпатель, который вводят в сгусток в чуть наклонном положении, осторожно приподнимая край сгустка. При этом, край сгустка должен быть ровным, с блестящими краями и должна выделяться прозрачная светло-зеленая сыворотка. В случае, если сгусток не готов, то края излома имеют рыхлый и дряблый вид, при этом выделяется мутная сыворотка.

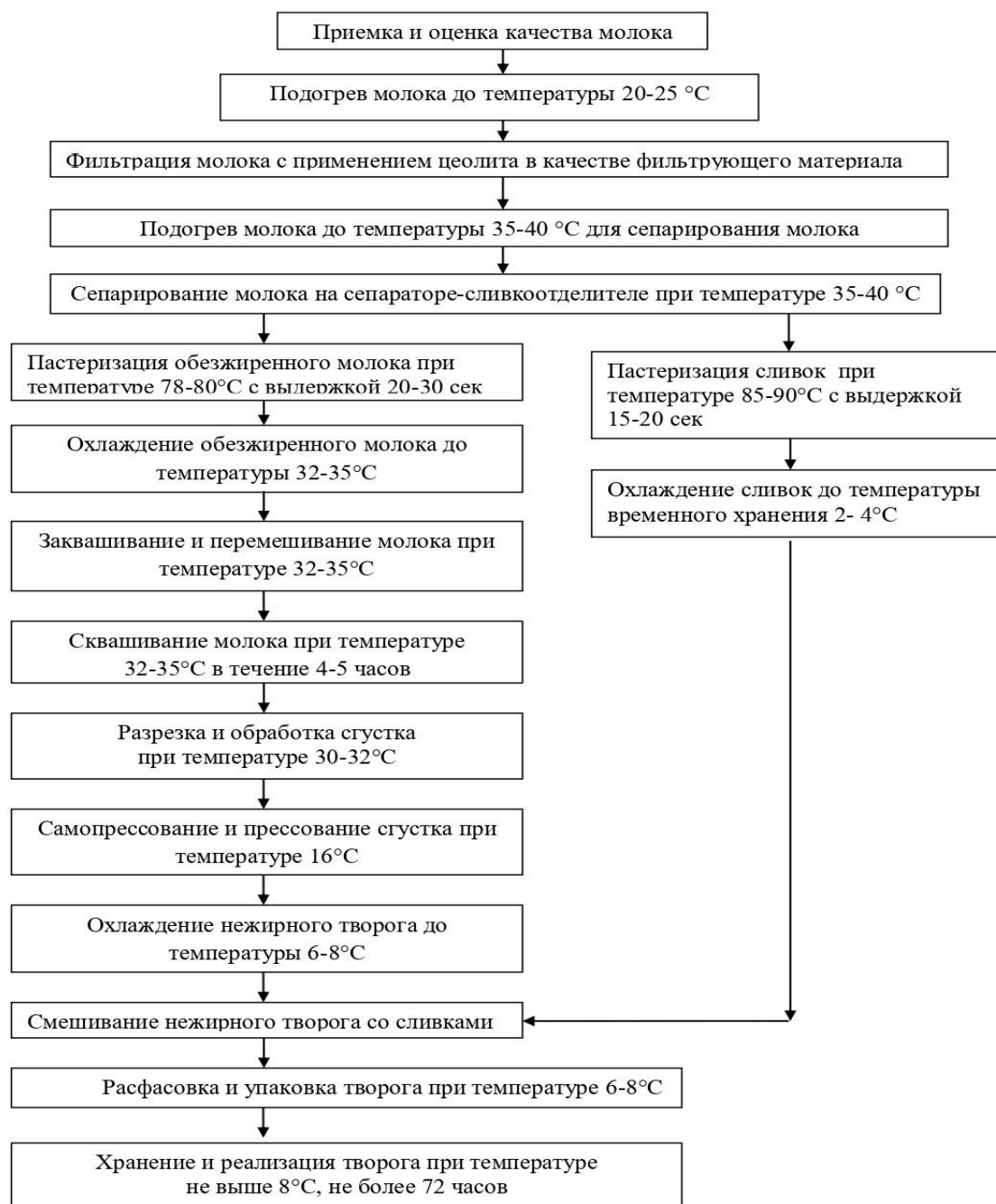


Рисунок 35 – Технологическая схема производства творога

8. Разрезка и обработка сгустка.

Для того чтобы полученный сгусток приобрел консистенцию творога необходимо удалить сыворотку. Полученный сгусток разрезаются на кубики размером 2,0x2,0x2,0см. Затем сгусток оставляют в покое в течение 60 минут для выделения сыворотки.

9. Самопрессование и прессование нежирного творога.

Для дальнейшего отделения сыворотки сгусток подвергают самопрессованию и прессованию. Самопрессование производится при

температуре не выше 16°C в течение 1 часа в пресс-тележках. Прессование проводится при температуре воздуха 3-6°C. По окончании прессования массовая доля влаги в нежирном твороге должна быть не выше 80 %.

10. Охлаждение нежирного творога.

По окончании прессования нежирный творог немедленно направляется на охлаждение до температуры 6-8°C на охладитель для творога.

11. Смешивание нежирного творога со сливками.

Для получения творога с массовой долей жира 9%, охлажденный нежирный творог смешивается с полученными при сепарировании пастеризованными сливками с массовой долей жира 50 % в смесителе-дозаторе.

12. Оценка показателей безопасности творога.

После охлаждения отбирается проба творога, в котором определяются показатели безопасности согласно требованиям Технического регламента Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевых продуктов». Вместе с тем, при выработке творога из молочного сырья с остаточным количеством фосфорорганических пестицидов определяется содержание данных ксенобиотиков в готовом продукте. Содержание фосфорорганических пестицидов в твороге не должно превышать 0,05 мг/кг.

13. Расфасовка и упаковка

Расфасовку и упаковку творога проводят при температуре 6-8°C в мелкую и крупную тару в соответствии с действующей нормативной документацией.

14. Хранение и реализация

Творог хранится при температуре не выше 8 °С, не более 72 часов с момента изготовления.

На технологический процесс производства творога разработана нормативно-техническая документация (Приложение Б).

Проведена промышленная апробация технологии творога с применением процесса фильтрации для очистки молока от карбофоса в молочном цехе крестьянского хозяйства «Нур» (Приложение В) и проведена расширенная дегустация полученного творога (Приложение Г).

В полученном твороге определены органолептические, физико-химические показатели и микробиологические показатели безопасности.

Результаты исследования представлены в таблицах 8, 9, 10, 11.

Таблица 8 – Органолептические показатели творога

Наименование показателя	Характеристика
Консистенция и внешний вид	Мягкая, мажущаяся, рассыпчатая. Допускается неоднородная, с наличием мягкой крупитчатости
Вкус и запах	Чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов
Цвет	Белый с кремовым оттенком

Таблица 9 – Физико-химические показатели творога

Наименование показателя	Норма для готового продукта	Фактически получено
Массовая доля жира, %	9,0	9,0
Массовая доля белка, %	16,0	16,7
Массовая доля влаги, %	73,0	70,3
Титруемая кислотность, °Т	210-240	210-240
Фосфатаза или пероксидаза	Не допускается	Не допускается
Температура при выпуске продукции, °С	8	8

Таблица 10 – Микробиологические показатели безопасности творога

Продукт	КМАФАнМ, КОЕ/см ³ (г), не более	Объем (масса) продукта, см ³ (г), в которой не обнаружено		
		БГКП (колиформы)	Патогенные, в том числе сальмонеллы	Стафилакокки S.aureus
Творог со сроком годности не более 72 часов	Молочнокислых микроорганизмов не менее 1×10^6	0,001	25	0,1

Как видно из таблицы 10 творог, выработанный в промышленных условиях, по микробиологическим показателям безопасности готовый продукт соответствует требованиям ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции».

Таблица 11 – Гигиенические показатели безопасности

Продукт	Единица измерения	Показатели безопасности						
		Токсичные элементы				Пестициды		
		свинец	кадмий	ртуть	мышьяк	ГХЦГ	ДДТ	Карбофос (малатион)
Творог	мг/кг	0,12	0,05	0	0	0	0	Отсутствует

Как показывают результаты исследования показателей безопасности (таблица 11) в твороге содержание токсичных элементов, регламентируемых ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевых продуктов», ниже предельно допустимых концентраций. Вместе с тем, необходимо отметить, что содержание исследуемого фосфорорганического пестицида (карбофоса) отсутствует. Поскольку в молоке, из которого получен творог, после фильтрации с применением цеолита в качестве фильтрующего материала содержание карбофоса не обнаружено.

Для внедрения в промышленное производство молочных продуктов из сырья с повышенным содержанием фосфорорганических соединений немаловажное значение приобретает проведение систематического контроля технологического процесса, а именно, очистки молочного сырья от ксенобиотика.

В данной работе была разработана система анализа рисков и критических контрольных точек для производства творога.

Для составления блок-схемы технологического процесса производства творога необходимо, прежде всего, идентифицировать каждую критическую контрольную точку (ККТ) для выявления опасного фактора, способствующего понижению показателей безопасности готового продукта. Данная блок-схема технологического процесса производства творога предоставит возможность получить последовательную и четкую картину основных стадий процесса, которые должны находиться под строгим контролем в промышленных условиях и обеспечивать безопасность производимой продукции.

Для того, чтобы определить опасные факторы была собрана информация о типах опасных факторов, о точке контроля рисков и возможные пути их устранения. Эти данные позволили определить вероятность возникновения рисков, а именно, тех производственных участков, несоблюдение гигиенических требований при обслуживании технологического оборудования, при приемке сырья и несоблюдении технологических режимов производства продукции.

На первом этапе с целью определения ККТ в процессе первичной обработки молочного сырья нами разработано дерево принятий решений ККТ (рисунок 36) в соответствии со стандартом СТ РК 1179-2003 «Система качества. Управление качеством пищевых продуктов на основе принципов НАССР».

Учитывая, что в данной работе впервые рассматривалось наличие фосфорорганического пестицида (карбофоса) в молоке, важным является правильно идентифицировать каждую критическую контрольную точку в процессе первичной переработки молока, содержащего повышенное количества данного ксенобиотика на основании построения «Дерева принятия решений».

Как видно из рисунка 36 каждый вопрос, сформулированный последовательно и логически, позволил определить на каждом технологическом этапе переработки молока критические контрольные точки. Так, первый вопрос «Наличие потенциально опасного фактора в сырье» позволил определить критическую контрольную точку на этапе приемки молочного сырья для переработки. То есть, при приемке молока обязательно проведение оценки качества молока на содержание карбофоса экспресс-методом, используя тест-систему.

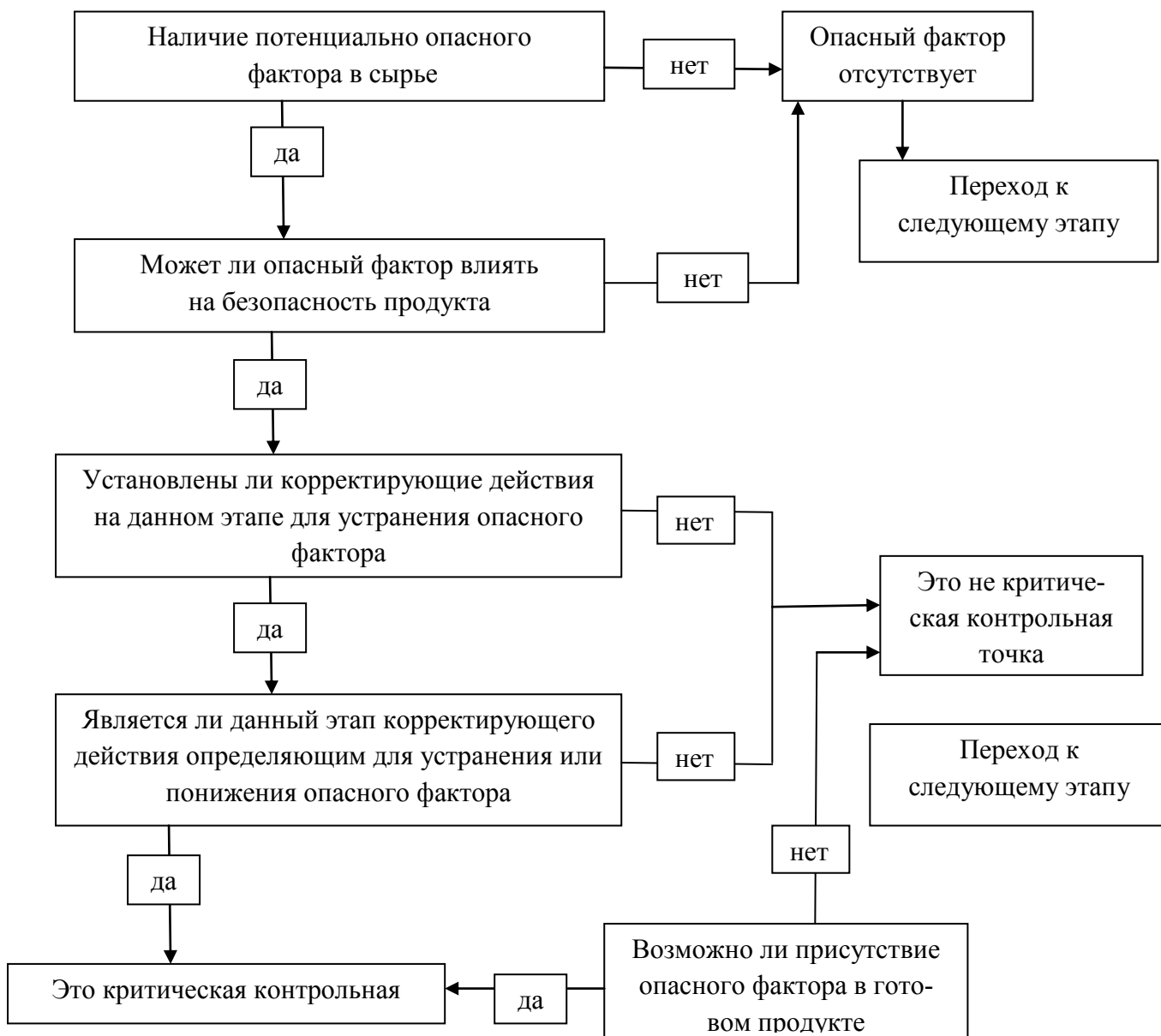


Рисунок 36 – Определение ККТ по «Дереву принятия решений»

Второй вопрос «Может ли опасный фактор влиять на безопасность продукта» позволил определить необходимость устранения опасного фактора с применением дополнительного технологического процесса – фильтрации с применением фильтрующего материала цеолита.

Третий вопрос «Установлены ли корректирующие действия на данном этапе для устранения опасного фактора» позволил определить технические параметры фильтрации молока с применением фильтрующего материала цеолита для его очистки от фосфорорганического пестицида.

Четвертый вопрос «Является ли данный этап корректирующего действия определяющим для устранения или понижения опасного фактора» позволил определить вторую критическую контрольную точку, то есть проведение

оценки качества молока на содержание карбофоса экспресс-методом, используя тест-систему.

Пятый вопрос «Возможно ли присутствие опасного фактора в готовом продукте» определил третью критическую контрольную точку, то есть проведение оценки качества готового продукта.

На следующем этапе, по результатам установленных критических контрольных точек «Дерева принятия решений» (рисунок 36) в процессе первичной переработки молока, содержащего повышенное количество данного ксенобиотика, нами разработан полный перечень критических контрольных точек по всему технологическому процессу производства творога. Результаты определения критических контрольных точек на всех этапах технологического процесса представлен в таблице 12.

Таблица 12 – Перечень критических контрольных точек технологического процесса производства творога

№	ККТ	Основные процессы	Опасные факторы
1	ККТ 1	Приемка молока	Химические факторы: токсичные элементы, микотоксины, антибиотики, пестициды, меланин, радионуклиды Биологические факторы: БГКП, соматические клетки, сальмонеллы, <i>S.aureus</i>
2	ККТ 2	Фильтрация молока с фильтрующим материалом - цеолит	Химические факторы: пестициды, энтеротоксины, остатки моющих и дезинфицирующих средств Биологические факторы: патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, <i>S.aureus</i>
3	ККТ 3	Пастеризация молока	Химические факторы: энтеротоксины, остатки моющих и дезинфицирующих средств, фосфатаза или пероксидаза Биологические факторы: патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, <i>S.aureus</i>
4	ККТ 4	Заквашивание и сквашивание молока	Химические факторы: энтеротоксины, остатки моющих и дезинфицирующих средств Биологические факторы: патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, <i>S.aureus</i> , БГКП

продолжение таблицы 12

5	ККТ 5	Самопрессование и прессование сгустка	Химические факторы: энтеротоксины, остатки моющих и дезинфицирующих средств Биологические факторы: патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, S.aureus, БГКП
6	ККТ 6	Упаковка	Химические факторы: пестициды Биологические факторы: патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, S.aureus, БГКП

Как видно из таблицы 12, в технологическом процессе производства творога из молочного сырья с повышенным содержанием фосфорорганического пестицида определены 6 критических контрольных точек с учетом установленных критических контрольных точек «Дерева принятия решений» в процессе первичной переработки исходного сырья.

В дополнении к определению фосфорорганического пестицида (карбофоса) установлены и другие ККТ химического и биологического происхождения, которые определяют риски в процессе технологической переработки молока при производстве творога.

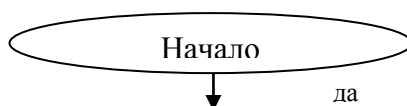
Как видно из таблицы 12 к опасным факторам химического происхождения относятся токсичные элементы (свинец, кадмий, ртуть, мышьяк), микотоксины, антибиотики, пестициды, меланин, радионуклиды, а также факторы, которые могут быть обнаружены при нарушении санитарно-гигиенических требований при обслуживании технологического оборудования и несоблюдении технологических режимов производства продукции. Это энтеротоксины, остатки моющих и дезинфицирующих средств.

Вместе с тем, в молоке и в готовом продукте немаловажное значение приобретает определение пестицидов как опасного фактора химического происхождения.

К критическим контрольным точкам (таблица 12) при производстве творога относятся также биологические факторы микробиологического происхождения: БГКП, соматические клетки, сальмонеллы, S.aureus.

В соответствии со стандартом СТ РК 1179-2003 «Система качества. Управление качеством пищевых продуктов на основе принципов НАССР» для каждого опасного фактора были проанализированы риски на основе вероятности их появления и принятия решений пошагово для выполнения корректирующих действий по устранению опасных факторов.

В результате данных анализа и на основании установленных критических контрольных точек разработана блок-схема технологического процесса производства творога (рисунок 37).



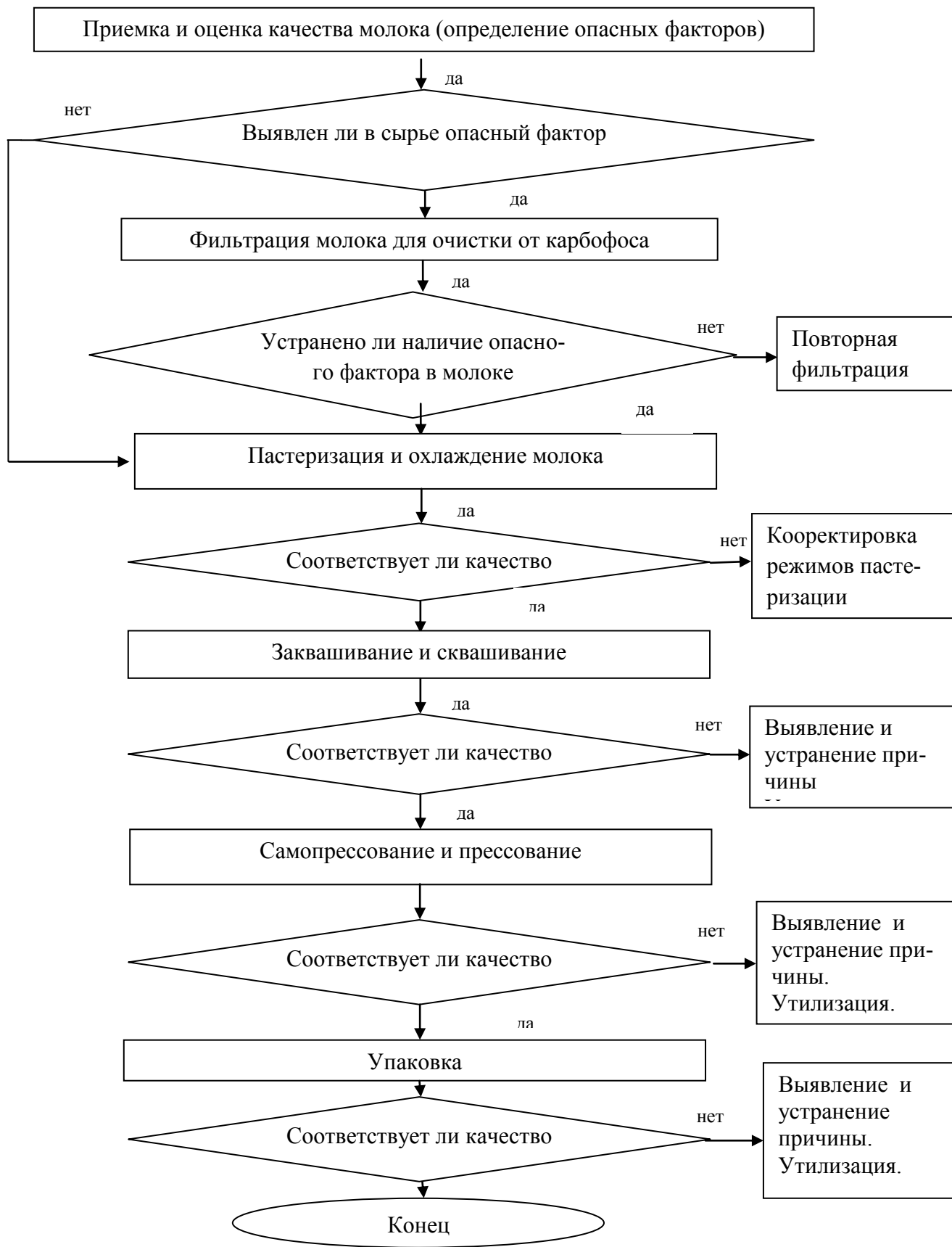


Рисунок 37 – Блок-схема технологического процесса производства творога

Как видно из рисунка 37 в процессе производства творога необходимо проведение технологического контроля качества сырья, полуфабриката и готового продукта в 6 точках, указанных в блок-схеме. В блок-схеме также предусмотрены основные корректирующие действия при выявлении опасных факторов.

Вместе с тем, в данной работе для обеспечения мониторинга опасных факторов в технологическом процессе производства творога возникла необходимость разработки схемы периодичности контроля критических контрольных точек, которая представлена в таблице 13.

Таблица 13 – Схема контроля технологического процесса производства творога

№	Наименование объекта	Контролируемый показатель	Периодичность контроля	Отбор проб
1	2	3	4	5
1	Молоко сырое	- токсичные элементы; - антибиотики; - пестициды; - радионуклиды; - микотоксины; - БГКП; - соматические клетки; - сальмонеллы; - S.aureus; - меланин;	- 2 раза в год; - 3 раза в год; - 2 раза в год; - 2 раза в год; - 3 раза в год; - 1 раз в 10 дней; - 1 раз в 10 дней; - 1 раз в квартал; - 1 раз в квартал; - в случае обоснованного предположения о возможном его наличии в продовольственном сырье	Из каждой партии
2	Молоко после фильтрации	- пестициды; - энтеротоксины; - остатки моющих и дезинфицирующих средств; - сальмонеллы; - S.aureus	- в случае обнаружения в сыром молоке; - 1 раз в квартал; - 4 раза в год; - 1 раз в квартал; - 1 раз в квартал	Из резервуара
3	Молоко после пастеризации	- энтеротоксины; - остатки моющих и дезинфицирующих средств; - сальмонеллы; - S.aureus	- 1 раз в квартал; - 4 раза в год; - 1 раз в квартал; - 1 раз в квартал	Из ванны

	2	3	4	5
4	Молочный сгусток в процессе заквашивания и сквашивания	- энтеротоксины; - остатки моющих и дезинфицирующих средств; - сальмонеллы; - S.aureus ureus; - БГКП	- 1 раз в квартал; - 4 раза в год; - 1 раз в квартал; - 1 раз в квартал; - 1 раз в 10 дней	Из ванны
5	Молочный сгусток в процессе самопрессования и прессования	- энтеротоксины; - остатки моющих и дезинфицирующих средств; - сальмонеллы; - S.aureus ureus; - БГКП	- 1 раз в квартал; - 4 раза в год; - 1 раз в квартал; - 1 раз в квартал; - 1 раз в 10 дней	Из пресс-тележки
6	Готовый продукт	- энтеротоксины; - остатки моющих и дезинфицирующих средств; - пестициды - сальмонеллы; - S.aureus ureus; - БГКП	- 1 раз в квартал; - 4 раза в год; - 2 раза в год; - 1 раз в квартал; - 1 раз в квартал; - 1 раз в 10 дней	В процессе упаковки

Как видно из таблицы 13 периодичность контроля технологического процесса по выявлению опасных факторов разработано в соответствии с требованиями действующих нормативных документов по периодичности контроля молока и молочных продуктов на молочных предприятиях. Контролируемые показатели установлены в соответствии с ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции», ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».

Таким образом, на основании проведенных исследований разработана технология производства творога из молока, содержащего повышенное содержание карбофоса, с применением процесса фильтрации с использованием фильтрующего материала – цеолита. Вместе с тем, на основании разработанной блок-схемы технологического процесса производства творога определены критические контрольные точки и составлена схема контроля технологического процесса производства творога для определения периодичности контроля.

4.3 Определение показателей безопасности, пищевой ценности готового продукта

При производстве творога из молочного сырья, содержащего остаточное количество карбофоса, предусмотрен процесс фильтрации молока с применением цеолита в качестве фильтрующего материала для его очистки от ксенобиотика.

На основании проведенных исследований казахстанскими учеными установлено, что при фильтрации молока с применением в качестве фильтрующего материала – цеолита наблюдается незначительное изменение содержания таких минеральных веществ, как железо, цинк и медь, а также содержание витаминов А и Е [155].

На основании вышеизложенного в данном разделе поставлена задача - исследование показателей безопасности и пищевой ценности готового продукта.

Для проведения исследования была произведена выработка творога с массовой долей жира 9% из одной партии молока: контрольный образец - из молока, не содержащего остаточное количество карбофоса; опытный образец - из молока, содержащего остаточное количество карбофоса и подвергнутого фильтрации для удаления данного пестицида.

На первом этапе проведены исследования для определения пищевой ценности творога. Исследования были проведены в испытательной региональной лаборатории инженерного профиля «Научный центр радиозэкологических исследований» ГУ им. Шакарима г. Семей (Приложение Д и Е).

Результаты исследования представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Исследование пищевой ценности контрольного и опытного образца творога

Пищевые вещества	Дневная потребность	Контрольный образец			Опытный образец		
		содержание веществ		степень удовлетворения	содержание веществ		степень удовлетворения
		в 100 г	в 178 г		в 100 г	в 178 г	
1	2	3	4	5	6	7	8
Вода, г	1750-2200	70,3	125,1	6,3	70,3	125,1	6,3
Белки, г	80-100	16,7	29,7	33,0	16,7	29,7	33,0
Незаменимые аминокислоты, г							
Лейцин	4-6	1,05	1,87	37,4	1,05	1,87	37,4
Изолейцин	3-4	0,556	0,989	28,3	0,556	0,989	28,3
Лизин	3-5	0,878	1,56	39,0	0,878	1,56	39,0
Триптофан	1	0,138	0,245	24,5	0,138	0,245	24,5
Валин	3-4	0,704	1,25	35,7	0,704	1,25	35,7
Треонин	2-3	0,470	0,836	33,5	0,470	0,836	33,5
Фенилаланин + лизин	5-8	1,21	2,15	33,0	1,21	2,15	33,0
Метионин + цистин	4-7	0,313	0,557	10,2	0,313	0,557	10,2
Жиры, г	80-100	9,0	16,0	17,7	9,0	16,0	17,7

Углеводы, г	400-500	3,1	5,6	1,3	3,1	5,6	1,3
-------------	---------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

продолжение таблицы 14

1	2	3	4	5	6	7	8
Витамины, мг							
А (ретинола ацетат)	1	0,057	0,101	10,1	0,057	0,101	10,1
Е (токоферол)	10	0,21	0,38	3,8	0,21	0,38	3,8
Минеральные вещества, мг							
Железо	15	0,41	0,73	4,9	0,40	0,72	4,8
Цинк	12	0,39	0,69	5,8	0,42	0,74	6,1
Медь	5	0,077	0,137	2,7	0,078	0,139	2,8
Энергетическая ценность	2850	160,2	285	10	160,2	285	10

Как видно из таблицы 14, проведение фильтрации молока для удаления остатков карбофоса с применением природного цеолита не повлияла на изменение пищевой ценности готового творога. Наблюдается только лишь незначительное расхождение по обеспечению дневной физиологической потребности в минеральных веществах.

Так, в опытном образце творога в сравнении с контрольным образцом творога незначительно уменьшилось содержание железа и степень удовлетворения по железу у опытного образца составило 4,8 %, у контрольного – 4,9 %. Содержание цинка и меди незначительно увеличилось в опытном образце творога в сравнении с его контрольным образцом. Степень удовлетворения по цинку в контрольном образце составило 5,8%, в опытном образце – 6,1%. Степень удовлетворения по меди в контрольном образце составило 2,7%, в опытном образце – 2,8%. Увеличение цинка и меди можно объяснить катионообменными процессами, которые протекают в процессе фильтрации молока через природный минерал – цеолит.

На следующем этапе исследованы показатели безопасности опытного образца творога. Показатели безопасности исследуемого образца были проведены на базе испытательной лаборатории по испытаниям продукции филиала «Семей» АО «Национальный центр экспертизы и сертификации» (Приложение Ж). Результаты исследования представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Показатели безопасности опытного образца творога

№	Наименование показателей	НД на методы испытания	Нормы по НД	Показатели исследования
1	2	3	4	5
1	Токсичные элементы мг/кг, не более: свинец мышьяк кадмий ртуть	ГОСТ 30178-96 ГОСТ 31266-2004 ГОСТ 30178-96 МУК 4.1.1472-03	0,3 0,2 0,1 0,02	Не обнаружено Не обнаружено Не обнаружено Не обнаружено
2	Микотоксины			

	мг/кг, не более Афлотаксин М ₁	ГОСТ 30711-2001	0,0005	Не обнаружено
--	--	-----------------	--------	---------------

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5
3	Антибиотики мг/кг, не более Левомецитин Тетрациклиновая группа	СТ РК 1505-2006	Не допускается	Не обнаружено
		СТР РК 1505-2006	Не допускается	Не обнаружено
4	Пестициды мг/кг, не более Гексахлорциклогексан (α , β , γ – изомеры) ДДТ и его метаболиты	ГОСТ 23452-2015	1,25	Не обнаружено
		ГОСТ 23452-2015	1,0	Не обнаружено
5	Радионуклиды Бк/кг Цезий-137 Стронций-90	ГОСТ 32161-2013	100	3,8
		ГОСТ 32163-2013	25	4,0

Как видно из таблицы 15 готовый творог, выработанный из молока, прошедшего фильтрацию с применением цеолита в качестве фильтрующего материала, не содержит токсичных элементов, микотоксинов, антибиотиков и пестицидов. Содержание радионуклидов в готовом твороге значительно ниже предельно-допустимых концентраций.

На основании проведенных исследований установлено, что проведение фильтрации молока для удаления остатков карбофоса с применением природного цеолита не повлияла на изменение пищевой ценности готового творога. Наблюдается только лишь незначительное расхождение по обеспечению дневной физиологической потребности в минеральных веществах.

Так, в опытном образце творога в сравнении с контрольным образцом творога незначительно уменьшилось содержание железа и степень удовлетворения по железу у опытного образца составило 4,8 %, у контрольного – 4,9 %. Содержание цинка и меди незначительно увеличилось в опытном образце творога в сравнении с его контрольным образцом. Степень удовлетворения по цинку в контрольном образце составило 5,8%, в опытном образце – 6,1%. Степень удовлетворения по меди в контрольном образце составило 2,7%, в опытном образце – 2,8%. Увеличение цинка и меди можно объяснить катионообменными процессами, которые протекают в процессе фильтрации молока через природный минерал – цеолит.

По показателям безопасности опытный образец творога не содержит токсичных элементов, микотоксинов, антибиотиков и пестицидов. Содержание радионуклидов в готовом твороге значительно ниже предельно-допустимых концентраций.

**5 РАСЧЕТ СТАТЬИ ЗАТРАТ НА ПОЛУЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ
НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФЕРМЕНТА ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРБОФОСА В МОЛОКЕ**

Таблица 16- Статья затрат на получение тест – системы на стеклянной основе

№	Статья затрат на получение тест – системы на стеклянной основе (30 палочек)	Единица измерения	Количество	Цена без НДС, тенге за единицу	Стоимость
1	Альгинат натрия	г	0,2	44,643	8,9
2	Дистиллированная вода	мл	110	0,071	7,9
3	Феноловый красный	мг	2	0,245	0,5
4	Фермент ацетилхолинэстеразы	мг	0,75	1,071	0,8
5	Буферный раствор рН-8.4 (ампулы)	мл	1	40,816	40,8
6	Палочка стеклянная (220 мм) для перемешивания d-5 мм (уп.10 шт) (ISOLAB)	30 шт	30	142,9	4 285,7
7	Хлорид кальция	г	0,4	64,018	25,6
	итого материальные расходы				4 370,2
8	Зарплата с отчислениями (14 %)	час	0,5	1017,86	508,9
9	Накладные расходы - 35 % от зарплаты	тенге			178,1
10	Всего затраты	тенге			5 057,3
11	Рентабельность	%			15,0
12	Прибыль	тенге			758,6
13	Оптовая цена без НДС	тенге			5 816
14	Оптовая цена с НДС	тенге			6 514

Таблица 17 - Статья затрат на получение тест – системы на бумажной основе

№	Статья затрат на получение тест – системы на бумажной основе (30 шт)	Единица измерения	Количество	Цена без НДС, тенге за единицу	Стоимость
1	2	3	4	5	6
1	Альгинат натрия	г	0,2	44,64	8,9
2	Дистиллированная вода	мл	110	0,071	7,9
3	Феноловый красный	мг	2	0,245	0,5
4	Фермент ацетилхолинэстеразы	мг	0,75	1,071	0,8
5	Буферный раствор рН-8.4	мл	1	40,816	40,8

продолжение таблицы 17

1	2	3	4	5	6
6	Хроматографическая бумага (30 шт)	шт	30	166,07	4982,1
7	Хлорид кальция	г	0,4	64,018	25,6
	итого материальные расходы				5066,6
8	Зарплата с отчислениями (14 %)	час	0,5	1017,86	508,9
9	Накладные расходы - 35 % от зарплаты	тенге			178,1
10	Всего затраты	тенге			5753,7
11	Рентабельность	%			15,0
12	Прибыль	тенге			863,1
13	Оптовая цена без НДС	тенге			6617
14	Оптовая цена с НДС	тенге			7411

Прибыль с одной упаковки теста на бумажной основе 863,1 тенге, а на стеклянной основе 758,6 тенге, это означает, что тест на бумажной основе экономически выгоднее, чем на стеклянной основе, эта выгода составит $863,1 - 758,6 = 104,5$ тенге.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе анализа теоретических исследований установлено, что в большинстве случаев в сельском хозяйстве применяются фосфорорганические пестициды (ФОП) из-за их невысокой стоимости и относительной простоте применения. Остатки фосфорорганических пестицидов в пищевых продуктах разлагаются при термической обработке, вместе с тем многие исследователи отмечают их токсическое воздействие на организм человека при длительном его накоплении. Токсическое воздействие фосфорорганических пестицидов связано, прежде всего, с подавлением функции фермента холинэстеразы, которое приводит к накоплению ацетилхолина в организме и в конечном итоге к нарушению функционирования нервной системы, а также к значительным поражениям мышечных тканей и легочной системы. В связи с чем определение фосфорорганических пестицидов не только в объектах окружающей среды, но и в сырье и продуктах питания является актуальным направлением.

Анализ данных литературных источников показал, что в последнее время уделяется большое внимание разработке экспресс-методов определения различных ксенобиотиков, в том числе и пестицидов, поскольку данные методы отличаются простотой, удобством и надежностью. Особенно в последние годы уделяется большое внимание разработке биосенсорных тест-систем с иммобилизованными ферментами. Основным преимуществом иммобилизованных ферментов, которые позволяют создать на их основе биосенсорные тест-системы, является сохранение их удельной активности при длительном хранении в сравнении с растворимым ферментом.

На основании вышеизложенного определены цель и задачи экспериментальных исследований для определения остаточного количества фосфорорганического пестицида в сырье животного происхождения.

Проведенные экспериментальные исследования позволили получить следующие результаты:

1. Для разработки биосенсорной тест-системы из двух гидролитических ферментов выбран гидролитический фермент ацетилхолинэстераза при оптимальном количестве данного фермента 0,2 мг, при рН буферного раствора – 8,4; при температуре термостатирования – 37 °С и времени ингибирования 30 минут, так как в молоке удельная активность ацетилхолинэстеразы составила 11 ммоль/мл, а удельная активность бутирилхолинэстеразы составила 7,9 ммоль/мл.

2. Для иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы выбран метод включения в гель с дополнительным применением одного из способа химического метода - кроссшивание. В качестве носителя для иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы выбран 2% альгинат натрия с бифункциональным сшивающим агентом - хлористый кальций. Установлено, что в течение 30 минут при динамической вязкости 620 МПа*с наблюдается конечное состояние реакционной смеси, при котором гель на основе альгината натрия приобретает твердое состояние.

3. Разработаны способы получения биосенсорных тест-систем на стеклянной поверхности и бумажной основе для определения фосфорорганического пестицида (карбофоса) в молоке. Установлен срок хранения биосенсорной тест-системы (30 дней при температуре 5-6°C на основе стеклянной палочки 30 дней, а на бумажной основе – 20 дней). Разработана инструкция по применению биосенсорных тест-систем на стеклянной поверхности и бумажной основе для определения фосфорорганического пестицида (карбофоса) в молоке (Приложение 3).

4. Разработаны технологические параметры очистки молока от карбофоса в процессе фильтрации молока с применением цеолита в качестве фильтрующего материала. Содержание карбофоса в исходном сырье понижается до предельно допустимой концентрации при содержании в фильтрах 200 г цеолита (80 % наполняемости), при объемной производительностью насоса до 6 л/мин (200 об/с⁻¹) и температуре 20-25 °С.

5. Разработана технология производства творога с применением процесса фильтрации с использованием фильтрующего материала – цеолита из молока, содержащего содержание карбофоса свыше значения 0,05 мг/кг. В соответствии со стандартом СТ РК 1179-2003 «Система качества. Управление качеством пищевых продуктов на основе принципов HACCP» разработана блок-схема технологического процесса производства творога и определены критические контрольные точки и составлена схема контроля технологического процесса производства творога для определения периодичности контроля.

6. Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на производство творога с применением процесса фильтрации с использованием фильтрующего материала – цеолита. Проведена промышленная апробация технологии производства творога с применением процесса фильтрации с использованием фильтрующего материала – цеолита из молока на базе молочного цеха крестьянского хозяйства «Нұр».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Филиппова А.М., Воробьева О.В., Аванесян С.С. Биосенсорная тест-система на основе иммобилизованного фермента ацетилхолинэстеразы для определения карбофоса / А.М. Филиппова, О.В. Воробьева, С.С. Аванесян // Современные проблемы науки и образования. – 2012. - № 6. – с. 577
- 2 Петров К.А., Харламова А.Д., Никольский Е.Е. Холинэстеразы: Взгляд нейрофизиолога / К.А. Петров, А.Д. Харламова, Е.Е. Никольский // Гены и клетки. – 2014. – Том IX, № 3. – С. 160-167.
- 3 Петров А. Пестициды в сельском хозяйстве / А. Петров // Наука в современных условиях: от идеи до внедрения. – 2014. - № 1. – С.418-421.
- 4 Ishan Y. Pandya Pesticides and Their Applications in Agriculture / Ishan Y. Pandya // Asian journal of Applied Science and Technology. – 2018. – P. 894-900.
- 5 Brankov T., Matkovski B., Jeremic M. et. all. Impact of Economic Development on Pesticide Use in South-East Europe / T. Brankov, B. Matkovski, M. Jeremic et. all. // Pol. J. Environ. Stud. – 2021. – Vol. 31, No. 2. – P. 1-10.
- 6 Davydov R., Sokolov M., Hogland W. et. all. The application of pesticides and mineral fertilizers in agriculture // <https://doi.org/10.1051/mateconf/201824511003/2018>.
- 7 Утков Ю.А., Бычков В.В., Дринча В.М. Технологическая политика устойчивого применения пестицидов в странах ЕС / Ю.А. Утков, В.В. Бычков, В.М. Дринча // Садоводство и виноградарство. – 2012. - №5.- С.43-48.
- 8 Ефремова Е.Н. Влияние пестицидов на живые организмы / Е.Н. Ефремова // Форум. Серия: Гуманитарные и экономические науки. – 2020. - №1(20). – С. 18-21.
- 9 Мустафина В.В., Душкина Ю.Н., Аргынбаева Е.Н. и др. Особо опасные пестициды в Казахстане: текущая ситуация и рекомендации по минимизации негативного воздействия / В.В. Мустафина, Ю.Н. Душкина, Е.Н. Аргынбаева и др. // Химическая безопасность. – 2020. - №4. – С.236-247.
- 10 Джаланкузов Т.Д., Исенова Г.Д., Жаманбаева Г.Т. Оценка загрязненности черноземов Северного Казахстана, обусловленной применением удобрений и пестицидов / Т.Д. Джаланкузов, Г.Д. Исенова, Г.Т. Жаманбаева // Почвоведение и агрохимия. – 2012. - №2. – С.14-21.
- 11 Kaur R., Mavi G.K., Raghav S.H. et. all. Pesticides classification and its impact on environment / R. Kaur, G.K. Mavi, S.H. Raghav et. all. // International journal of current microbiology and applied sciences. – 2019. – No.8(3). – P. 1889-1897.
- 12 Мистратова Н.А., Ступницкий Д.Н., Яшин С.Е. Органическое земледелие в России (обзорная статья) / Н.А. Мистратова, Д.Н. Ступницкий, С.Е. Яшин // Вестник КрасГАУ. – 2021. - №11. – С.100-107.
- 13 Левченко М.А. Линалоол как возможный аналог синтетическим пестицидам / М.А. Левченко // Ветеринария Кубани. – 2021. - №3. – С.28-30.
- 14 Stingaci Aurelia Using of entomoptogenic baculovirus pesticides for biological controls of pest insects in the Republic of Moldolva / Aurelia Stingaci // Agrarian science. – 2019. – No.52.- P.142-144.

15 Воронкова М.В. Разработка новых средств защиты для повышения продуктивности органического растениеводства / М.В. Воронкова // Вестник аграрной науки. – 2020. - №1(82). – С.30-33.

16 Биотехнология поля или шаг в органическое земледелие // Агрофорум. – 2019. - №3. – С.66.

17 Сычева И.И. Совершенствование биологизированных технологий в современных условиях // Proceedings of International Scientific and Practical E-Conference on Agriculture and Food security «Anthropogenic evolution of modern soils and food production under changing of soil and climatic conditions», г. Москва, 29 октября – 28 ноября 2015 года. - С.237-239.

18 Meemken E., Qaim M. Organic agriculture, food security, and the environment / E. Meemken, M. Qaim // Annual review of resource economics. – 2018 // <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-100517-023252>.

19 Crowder D.W., Reganold P. Financial competitiveness of organic agriculture on a global scale / D.W. Crowder, P. Reganold // Proceedings of the National Academy of Sciences/ - 2015/ - Vol.112, No.24. – P.7611-7616.

20 Arvind Malik, Gaurav Kumar An overview of chemical pesticides and its impact on environment and human health / Malik Arvind, Kumar Gaurav // International journal of Modern Agriculture. – 2021. – Vol.10, No.2. – P. 2045-2052.

21 Лукашук Н.А., Родькин О.И. Зарубежный опыт развития органического сельскохозяйственного производства / Н.А. Лукашук, О.И. Родькин // Труды БГТУ. – 2017. - №1. – С.185-189.

22 Фролова С.А. Применение биологического пестицида в технологии выращивания томата закрытого грунта / С.А. Фролова // Вестник аграрной науки. – 2018. - №2(71). – С.130-136.

23 Prudnicova S.V., Volova T.G. Design and Application of Slow-Release Pesticide Formulations Embedded in a Biodegradable Matrix Based on Poly (3-Hydroxybutyrate) / S.V. Prudnicova, T.G. Volova // journal of Siberian Federal University. Biology. – 2019. – No.12 (3). – P.329-336.

24 Kulakov V., Kumenko E.O. The use of pesticides in agriculture / V. Kulakov, E.O. Kumenko // Colloquium-Journal. – 2020. – No.33 (85). P.15-17.

25 Воробьева Т.Н. Эколого-токсикологический мониторинг – основа управления качеством пищевой безопасности виноградовинодельческих продуктов / Т.Н. Воробьева // Плодоводство и виноградарство Юга России. - 2014. - №30 (06). – С.2-9.

26 Kumar S., Sharma A.K., Rawat S.S. et. all. Use of Pesticides in agriculture and livestock animals and its impact on environment of India / S. Kumar, A.K. Sharma, S.S. Rawat et. all. //Asian journal of environmental science. – 2013. – Vol.8, No.1. – P.51-57.

27 Узиков З.З., Раупов Б.Н. Экологические проблемы применения пестицидов / З.З. Узиков, Б.Н. Раупов // Colloquium-Journal. – 2019. - №6-3 (30). – С. 38-39.

28 Борисова Е.Е. Пути миграции и механизм детоксикации пестицидов /Е.Е. Борисова // Современная наука: традиции и инновации. – 2020. – С.85-89.

29 Парамонов С.Г. Аспекты загрязнения лекарственных растений пестицидами / С.Г. Парамонов // *Формулы фармации*. – 2021. – Т.3, №2. – С.78-81.

30 Tripathy V., Basak B.B., Varghese T.S. et. all. Residues and contaminants in medicinal herbs – A review. *PhytochemLett.* 2015; 14:67-78. DOI:10.1016/j.phytol.2015.09.003.

31 Gondo T.T., Obuseng V.C., Mmualefe L.C. et. all. Employing Solid Phase Micro extraction as Extraction Tool for Pesticide Residues in Traditional Medicinal Plants. *Journal of Analytical Methods in Chemistry.* 2016:2890219. DOI:10.1155/2016/2890219.

32 Егорова О.В., Илюшина Н.А., Аверьянова Н.С. и др. Генотоксические свойства некоторых фосфорорганических пестицидов / О.В. Егорова, Н.А. Илюшина, Н.С. Аверьянова и др. // *Медицинская генетика*. – 2020. - №9(218). – С.72-73.

33 Smirnov R.Y., Pande S., Kolenchukova O.A. et. all. Household Management of Pesticides and Chemical Contaminants in Fruit and Vegetables / R.Y. Smirnov, S. Pande, O.A. Kolenchukova et. all. // *Journal of Siberian Federal University. Biology*. – 2017. - №10 (2). – P.179-186.

34 Ефремова Е.Н. Влияние пестицидов на живые организмы / Е.Н. Ефремова // *Форум. Серия: Гуманитарные и экономические науки*. – 2020. - №1(20). – С.18-21.

35 Katsikantami I., Kavvalakis M.P., Tzatzarakis M.N. et. all. Advances on Biomonitoring of Organophosphorus and Organochlorine Pesticides / I. Katsikantami, M.P. Kavvalakis, M.N. Tzatzarakis et. all. // *Journal of Siberian Federal University. Biology*. – 2017. - №10 (2). – P.153-170.

36 Ghorab M.A., Khalil M.S. Toxicological Effects of Organophosphates Pesticides / M.A. Ghorab, M.S. Khalil // *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis*. – 2015. - №3(4). – P.218-220.

37 Исрайилова А.С. Влияние пестицидов на здоровье человека // *Материалы II Международной заочной научно-практической конференции «Актуальные проблемы социально-экономического развития современного общества»*, г. Киров, 27 мая 2021 года. – С.216-220.

38 Куркина Л.В., Рудакова С.И. Влияние пестицидов на здоровье человека // *Материалы XIII Международной научно-практической конференции «Тенденции сельскохозяйственного производства в современной России»*, г. Кемерово, 09-12 декабря 2014 года. – С.323-331.

39 Куксова М.А., Медведева А.С. Последствия влияния пестицидов на организм человека // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 15-летию основания кафедры «Защита в чрезвычайных ситуациях» «Актуальные проблемы обеспечения безопасности в техносфере и защиты населения и территорий в чрезвычайных ситуациях»*, г. Ставрополь, 18-19 мая 2016 года. – С.262-264.

40 Raza H.A., Amir R.M., Idrees M.A. et. all. Residual impact of Pesticides on environment and health of sugarcane farmers in Punjab with special reference to

intergrated pest management / H.A. Raza, R.M. Amir, M.A. Idrees et. all. // Journal of Global innovations in Agricultural and Social Sciences. – 2019. – No.7(2). – P.79-84.

41 Saratovskikh E.A. Molecular Mechanisms of the Damage Effect of Pesticides of Various Structures on Target Organisms / E.A. Saratovskikh // Russian journal of Physical Chemistry. – 2017. – Vol.11, No.4. – P.652-662.

42 Козуля С.В., Ташев Э.А., Сулейманов Ф.С. и др. Загрязненность почв Крыма пестицидами и ее влияние на здоровье человека / С.В. Козуля, Э.А. Ташев, Ф.С. Сулейманов и др. // ModernScience. – 2019. - №4-1. – С.32-34.

43 Фаизова Г.Т., Савельева В.П., Маллябаева М.И. Влияние пестицидов в окружающей среде на здоровье людей // Материалы XVI Международной научно-технической конференции, посвященной 75-летию Победы Великой Отечественной войне «Наука, образование, производство в решении экологических проблем (Экология – 2020)», г. Уфа, 22 апреля 2020 года. – С.78-83.

44 Togawa K. Cancer in agricultural populations / K. Togawa // Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology. – 2019. – No.59(9). – P.837-838.

45 Sankhla M.S., Kumari M., Sharma K. et. all. Water Contamination through Pesticide and Their Toxic Effect on Human Health / M.S. Sankhla, M. Kumari, K. Sharma et. all. // International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology. – 2018. – No.6. – P.967-970.

46 Bonner M.R., Alavanja M.C. Pesticides, human health, and food security / M.R. Bonner, M.C. Alavanja // Food and Energy Security. – 2017. – No.6 (3). – P.89-93.

47 Завьялова Я.С., Богданова В.Д. Влияние пестицидов на организм человека / Я.С. Завьялова, В.Д. Богданова // Medicus. – 2017. - №1(13). – С.16-18.

48 Анучина А.В. Токсическое действие пестицидов на организм человека и животных / А.В. Анучина // Международный студенческий научный вестник. – 2019. - №1. – С.11-24.

49 Plyushina N.A., Egorova O.V., Averyanova N.S. et. all. The mutagenicity and carcinogenicity of pesticides and hazards for human health: a systematic review / N.A. Plyushina, O.V. Egorova, N.S. Averyanova et. all. // Health care of the Russian Federation, Russian journal. – 2016. – No.61(2). – P.96-102.

50 Сырку Р.Ф., Цуркану Г.И., Пынзару Ю.В. и др. Оценка риска здоровью от поступающих с пищей пестицидов, нарушающих работу эндокринной системы / Р.Ф. Сырку, Г.И. Цуркану, Ю.В. Пынзару и др. // Химическая безопасность. – 2020. - №4. – С.55-67.

51 Илюшина Н.А., Ревазова Ю.А. Генотоксическая активность смеси пестицидов / Н.А. Илюшина, Ю.А. Ревазова // Токсикологический вестник. – 2020. - №3(162). – С.9-13.

52 Oaya C.S., Malgwi A.M., Degri M.M. et. all. Impact of synthetic pesticides utilization on humans and the environment: an overview / C.S. Oaya, A.M. Malgwi, M.M. Degri et. all. // Agricultural science and technology. – 2019. – Vol.11, No.4. – P.279-286.

53 Hashimi M.H., Hashimi R., Ryan Q. Toxic Effects of Pesticides on Humans, Plants, Animals, Pollinators and Beneficial Organisms / M.H. Hashimi, R. Hashimi, Q. Ryan // Asian Plant Research journal. – 2020. – No.5(4). – P.37-47.

54 Kim K.H., Kabir E., Jahan S.A. Exposure to pesticides and the associated human health effects / K.H. Kim, E. Kabir, S.A. Jahan // Science of The Total Environment. – 2017. – Vol.575, No.1. – P.525-535.

55 Khayatnezhad M., Nasehi F. Industrial Pesticides and a Methods Assessment for the Reduction of Associated Risks: A Review / M. Khayatnezhad, F. Nasehi // Advancements in Life Sciences – International Quarterly Journal of Biological Sciences. – 2021. – Vol.8, No.2. – P.202-210.

56 Воронцова Е.В., Воронцов А.Л. Качество и безопасность пищевой продукции как фактор общественного здоровья: социально-правовой анализ основных рисков / Е.В. Воронцова, А.Л. Воронцов // Известия Юго-Западного государственного университета. Серия: История и право. – 2019. - №9(4). – С.51-63.

57 Табанюхов К.А., Мирошников П.Н., Скрыбин В.А. и др. Пестициды и микотоксины как источники угрозы безопасности пищевых продуктов / К.А. Табанюхов, П.Н. Мирошников, В.А. Скрыбин и др. // Инновация и продовольственная безопасность. – 2020. – №2(28). – С. 28-34.

58 El-Nahhal Y., El-Nahhal I. Cardiotoxicity of some pesticides and their amelioration / Y. El-Nahhal, I. El-Nahhal // Environmental Science and Pollution Research. – 2021. – No.28. – P.44726-44754.

59 Zeng X., Du Z., Ding X. et. all. Protective effects of dietary flavonoids against pesticide-induced toxicity: A review / X. Zeng, Z. Du, X. Ding et. all. // Trends in Food Science and Technology. – 2021. – Vol.109. – P.271-279.

60 Yuan S., Li C., Yu H. et. all. Screening of lactic acid bacteria for degrading organophosphorus pesticides and their potential protective effects against pesticide toxicity / S. Yuan, C. Li, H. Yu et. all. // LWT – Food science and Technology. – 2021. – Vol.147. – P.111672-111674.

61 Upadhyay S.B., Dut A. Microbial Detoxification of Residual Organophosphate Pesticides in Agricultural Practices / S.B. Upadhyay, A. Dut // Microbial Biotechnology. – 2018. – No.9. – P.225-242.

62 Шевкопляс-Гурьева Н.А., Сивкова Г.А. Применение пестицидов и их влияние на окружающую среду и здоровье человека / Н.А. Шевкопляс-Гурьева, Г.А. Сивкова // Инновационная наука. – 2020. - №12. – С.15-16.

63 Songa E.A., Okonkwo J.O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review / E.A. Songa, J.O. Okonkwo // Talanta. – 2016. - Vol.155. – P.289-304.

64 Смирнов А.Н., Дорожкин В.И., Кононенко Г.П. и др. Современные методы и тест-системы для контроля токсичных веществ в объектах ветеринарного надзора / А.Н. Смирнов, В.И. Дорожкин, Г.П. Кононенко и др. // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2015. - №2(14). – С.78-81.

65 Буклагин Д.С. Тест-системы для определения показателей безопасности в продукции животноводства / Д.С. Буклагин // Вестник Всероссийского научно-исследовательского института механизации животноводства. – 2019. - №2(34). – С.21-27.

66 Sassolas A., Prieto-Simon B., Marty J. Biosensors for Pesticide Detection: New Trends / A. Sassolas, B. Prieto-Simon, J. Marty // American Journal of Analytical Chemistry. – 2012. – No.3. – P.210-232.

67 Поклонский Д.Л., Дурилов О.Ю., Зыгин Д.А. и др. Биосенсоры для осуществления мероприятий экологического мониторинга: классификация и особенности разработки / Д.Л. Поклонский, О.Ю. Дурилов, Д.А. Зыгин и др. // Теоретическая и прикладная экология. – 2017. - №4. – С.12-19.

68 Гайнуллина Э.Т., Гуликова Д.К., Корнеев Д.О. и др. Биосенсоры как средство мониторинга объектов окружающей среды на содержание фосфорорганических соединений нервно-паралитического действия / Э.Т. Гайнуллина, Д.К. Гуликова, Д.О. Корнеева и др. // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т.70, №7. – С.675-685.

69 Сазыкина М.А., Мирина Е.А., Сазыкин И.С. Использование биосенсоров для детекции антропогенного загрязнения природных вод / М.А. Сазыкина, Е.А. Мирина, И.С. Сазыкин // Вода: химия и экология. – 2015. - №10(88). – С.64-74.

70 Gieva E., Nikolov G., Nikolova B. Biosensors for environmental monitoring / E. Gieva, G. Nikolov, B. Nikolova // Challenges in Higher Education and Research. – 2014. – No.13. – P.123-127.

71 Verma N., Bhadwaj A. Biosensor Technology for Pesticides – A review // ApplBiochemBiotechnol // DOI 10.1007/s12010-015-1489-2/2015.

72 Плеханов Ю.В., Решетилов А.Н. Микробные биосенсоры для определения пестицидов / Ю.В. Плеханов, А.Н. Решетилов // Журнал аналитической химии. – 2019. – Т.784, №13. – С.883-901.

73 Юдина Н.Ю., Абрамова Т.Н., Арляпов В.А. Создание биосенсора на основе бактерий, выделенных из активного ила, для экспресс-мониторинга водных сред / Н.Ю. Юдина, Т.Н. Абрамова, В.А. Арляпов // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2018. – Вып.1. – С.56-68.

74 Karadurmus L., Kaya S.I., Ozkan S. Recent advances of enzyme biosensors for pesticide detection in foods / L. Karadurmus, S.I. Kaya, S. Ozkan // Journal of Food Measurement and Characteruzation. – 2021. – No.15. – P.4582-4595.

75 Rajangam B., Daniel D.K., Krastanov A.I. Progressi in enzyme inhibition based detection of pesticides / B. Rajangam, D.K. Daniel, A.I. Krastanov // Engineering in Life Sciences. - 2018. – No.18. – P.4-19.

76 Liu S., Bilal M., Rizwan K. et. all. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review / S. Liu, M. Bilal, K. Rizwan et. all. // International journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol.190, No.1. – P.396-408.

77 Pundir C.S., Chauhan N. Acetylcholinesterase inhibition – based biosensors for pesticide determination: A review / C.S. Pundir, N. Chauhan // *Analytical Biochemistry*. – 2012. – Vol.429, No.1. – P.19-31.

78 Guan Y., Liu L., Chen C. et. all. Effective immobilization of tyrosinase via enzyme catalytic polymerization of L-DOPA for highly sensitive phenol and atrazine sensing / Y. Guan, L. Liu, C. Chen et. all. // *Talanta*. – 2016. – No.160. – P.125-132.

79 Yasmin J., Ahmed M., Cho B. Biosensors and their Applications in Food Safety: A review / J. Yasmin, M. Ahmed, B. Cho // *Journal of Biosystems Engineering*. – 2016. – No.41(3). – P.240-254.

80 Nguyen H.H., Lee S.H., Lee U.J. et. all. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications / H.H. Nguyen, S.H. Lee, U.J. Lee et. all. // *Journal Materials*. – 2019. – Vol.12, No.1. – P.121.

81 Liu S., Zheng Z., Li X. Advances in pesticide biosensors: current status, challenges, and future perspectives / S. Liu, Z. Zheng, X. Li // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – No.4. – P.63-90.

82 Korotkaya E.V. Biosensors: design, classification, and applications in the food industry / E.V. Korotkaya // *Foods and Raw Materials*. – 2014. – Vol.2, No.2. – P.161-173.

83 Cui H., Wu W., Li M. et. all. A highly stable acetylcholinesterase biosensor based on chitosan-TiO₂-graphene nanocomposites for detection of organophosphat pesticides / H. Cui, W. Wu, M. Li et. all. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – Vol.99, No.15. – P.223-229.

84 Soldatkin A.P., Dzyadevych S.V., Korpan Y.I. et. all. Biosensors. A quarter of a century of R&D experience / A.P. Soldatkin, S.V. Dzyadevych, Y.I. Korpan et. all. // *Biopolymers and Gell*. – 2013. – Vol.29, No.3. – P.188-206.

85 Goradel N.H., Mirzaei H., Sahebkar A. et. all. Biosensors for the Detection of Environmental and Urban Pollutions // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2018. – Vol.119, No.1. – P.207-212.

86 Arduini F., Cinti S., Scognamiglio V. et. all. Nanomaterials in electrochemical biosensors for pesticide detection: advances and challenges in food analysis / F. Arduini, S. Cinti, V. Scognamiglio et. all. // *Microchimica Acta*. – 2016. – No.183 (7). – P.2063-2083.

87 Neethirajan S., Ragavan V., Weng X. et. all. Biosensors for Sustainable Food Engineering: Challenges and Perspectives / S. Neethirajan, V. Ragavan, X. Weng et. all. // *Biosensors journal*. – 2018. – Vol.8, No.1. – P.23.

88 Bao J., Huang T., Wang Z. et. all. 3D graphene/copper oxide nano-flowers based acetylcholinesterase biosensor for sensitive detection of organophosphate pesticides / J. Bao, T. Huang, Z. Wang et. all. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2019. – Vol.279, No. 15. – P.95-101.

89 Zhang P., Sun T., Rong S. et. all. A sensitive amperometric AChE-biosensor for organophosphate pesticides detection based on conjugated polymer and Ag-rGO-NH₂ nanocomposite / P. Zhang, T. Sun, S. Rong et. all. // *Bioelectrochemistry*. – 2019. – Vol.127. – P.163-170.

90 Lv M., Liu Y., Geng J. et. all. Engineering nanomaterials-based for food safety detection / M. Lv, Y. Liu, J. Genget. all. // Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – Vol.106, No.30. – P.122-128.

91 Лягин И.В., Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. Ферментные биосенсоры для определения пестицидов / И.В. Лягин, Е.Н. Ефременко, С.Д. Варфоломеев // Успехи химии. – 2017. – Т.8, №4. – С.339-355.

92 Stepankova S., Vorcakova K. Cholinesterase-based biosensors / S. Stepankova, K. Vorcakova // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2016. – No.31. – P.180-193.

93 Utegenova A., Kakimova Z., Klivenko A. et. all. Acetylcholinesterase Immobilized on Glass Rod for Organophosphorus Pesticides Detection: Application on Milk Analysis / A. Utegenova, Z. Kakimova, A. Klivenko et. all. // International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology. – 2021. – Vol.11, No.3. – P.843-848.

94 Утегенова А.О., Какимова Ж.Х., Капшакбаева З.В. ж.б. Иммобилизация ланған ферментпен тест-жүйесін дайындау үшін ацетилхолинэстераза ферментінің меншікті белсенділігін зерттеу / А.О.Утегенова, Ж.Х.Какимова, З.В. Капшакбаева ж.б. // Семей қаласының Шәкәрім атындағы мемлекеттік университетінің Хабаршысы. – 2020. - №2(90). – 176-179 б.

95 Агапкин А.М. Доброкачественность, или пищевая безвредность, продуктов / А.М. Агапкин // Товароведение и экспертиза. – 2016. - №6(90). – С. 183-189.

96 Давтян В.А., Торосян Г.О. Обнаружение малатиона и его детоксикация с помощью щелочного гидролиза для защиты окружающей среды / В.А. Давтян, Г.О. Торосян // Химическая безопасность. 2018. – Т.2, №1. – С.220-226.

97 Rawtani D., Khatri N., Tyagi S. et. all. Nanotechnology-based recent approaches for sensing and remediation of pesticides / D. Rawtani, N. Khatri, S. Tyagi et. all. // Journal of Environmental Management. – 2018. – Vol.2016, No.15. – P. 749-762.

98 Figovsky O., Spiridinov Y., Muhin V. et. all. Detoxication of pesticide and other toxic substance remains in soil with the help of nanomaterials / O. Figovsky, Y. Spiridinov, V. Muhin et. all. // Engineering journal of Donn. – 2014. – No.4-1(31). – P.143.

99 Колотова О.В., Слюсарева П.С., Могилевская И.В. и др. Некоторые аспекты получения и применения бактериальных препаратов для ремедиации почв, загрязненных пестицидами / О.В. Колотова, П.С. Слюсарева, И.В. Могилевская и др. // Вестник ИРГСХА. – 2019. - №90. – С.34-44.

100 Wochner K.F., Becker-Algeri T.A., Colla E. et. all. The action of probiotic microorganisms on chemical contaminants in milk / K.F. Wochner, T.A. Becker-Algeri, E. Colla et. all. // Critical Reviews in Microbiology. – 2018. – Vol.44, No.1. – P.112-123.

101 Trinder M., Bisanz J.E., Burton J.P. et. all. Probiotic lactobacilli: a potential prophylactic treatment for reducing pesticide absorption in humans and wildlife /

M. Trinder, J.E. Bisanz, J.P. Burton et. all. // *Beneficial Microbes*. – 2015. – No.6(6). – P.841-847.

102 Bajwa U., Sandhu K.S. Effect of handling and processing on pesticide residues in food – a review / U. Bajwa, K.S. Sandhu // *Journal Food Science Technology*. - 2014. – No.51(2). – P.201-220.

103 Андреев Т.А. Как снизить уровень пестицидов в продуктах питания с помощью технологической обработки? // *Материалы научно-практической конференции «Инновации и технологии в биомедицине»*, г. Владивосток, 19-20 мая 2021 года. – С.89-92.

104 Клименко О.В., Курочкина Н.Г. Технологические способы снижения остаточных количеств пестицидов в пищевой продукции / О.В. Клименко, Н.Г. Курочкина // *Молодежь и наука*. – 2017. - №1. – С.75.

105 Gavahian M., Pallares N., Khawli F.A. et. all. Recent advances in the application of innovative food processing technologies for mycotoxins and pesticide reduction in foods / M. Gavahian, N. Pallares, F.A. Khawli et. all. // *Trends in Food Science & Technology*. – 2020. – Vol.106. – P.209-218.

106 Ayoub M.M., Desoki M.E., Hassanin A.S. et. all. Detection of pesticide residues in milk and some dairy products / M.M. Ayoub, M.E. Desoki, A.S. Hassanin et. all. // *Journal of Plant Protection and Pathology*. – 2012. – Vol.3(8). – P.865-880.

107 Padaliya S.R., Parmar K.D., Chawla S. Processing of raw Agricultural Produce and its Effect on Pesticide Residues – A review / S.R. Padaliya, K.D. Parmar, S. Chawla // *Agricultural Reviews*. – 2020. – Vol.41, No.2. – P.160-165.

108 Rana M.S., Lee S., Kang H. et. all. Reducing Veterinary Drug Residues in Animal Products: A Review / M.S. Rana, S. Lee, H. Kang et. all. // *Food Science of Animal Resources*. – 2019. – Vol.39, No.5. – P. 687-703.

109 Abd-Rabo F.H.R., Elsalamony H., Sakr S.S. Reduction of pesticide residues in Egyptian buffalo milk by some processing treatments / F.H.R. Abd-Rabo, H. Elsalamony, S.S. Sakr // *International journal of Dairy Science*. – 2016. – Vol.11, No.2. – P.75-80.

110 Walid A.S. Gafour Impact of Cow Milk Manufacturing Processes on the Degradation of Malathion Pesticide Residues / Walid A.S. Gafour // *American Journal of Food Science and Technology*. – 2018. – Vol.6. No.6. – P.290-294.

111 Какимов А.К., Какимова Ж.Х., Смирнова И.А. и др. Перспективные направления применения цеолита для очистки молока от токсикоэлементов / А.К. Какимов, Ж.Х. Какимова, И.А. Смирнова и др. // *Техника и технология пищевых производств*. – 2018. – Т.48, №1. – С.143-149.

112 Смирнова И.А., Какимов А.К., Жарыкбасов Е.С. Технологические аспекты обеспечения экологической безопасности пищевых продуктов / И.А. Смирнова, А.К. Какимов, Е.С. Жарыкбасов // *Известия КГТУ им. И. Раззакова*. – 2017. - №43. – С.29-35.

113 Смирнова И.А., Какимов А.К., Жарыкбасов Е.С. Технология переработки молока с применением цеолита / И.А. Смирнова, А.К. Какимов,

Е.С. Жарыкбасов // Техника и технология пищевых производств. – 2019. – Т.49, №2. – С.245-252.

114 Какимов А.К., Какимова Ж.Х., Байбалинова Г.М. и др. Радиопротекторные свойства природных цеолитов // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной памяти Василия Матвеевича Горбатова, г. Москва, 2014, №1. – С.278-311.

115 Maximiano E.M., Lima F., Cardoso C.A.L. et. all. Incorporation of thermally activated zeolite into carbon paste electrodes for voltammetric detection of carbendazim traces in milk samples / E.M. Maximiano, F. Lima, C.A.L. Cardoso et. all. // Journal of Applied Electrochemistry. – 2016. – No.46. – P.713-723.

116 Arnnok P., Patdhanagul N., Burakham R. Dispersive solid-phase extraction using polyaniline-modified zeolite NaY as a new sorbent for multiresidue analysis of pesticides in food and environmental samples / P. Arnnok, N. Patdhanagul, R. Burakham // Talanta. – 2017. – Vol.164, No.1. – P.651-661.

117 Kukkar P., Kukkar D., Younis S.A. et. all. Colorimetric biosensing of organophosphate pesticides using enzymatic nanoreactor built on zeoliticimidazole / P. Kukkar, D. Kukkar, S.A. Younis et. all. // Microchemical Journal. – 2021. – Vol.166. – P.342-351.

118 Laurino C., Palmieri B. Zeolite: “the magic stone”; main nutritional, environmental, experimental and clinical fields of application / C. Laurino, B. Palmieri // NutricionHospitalaria. – 2015. – No.32(2). – P.573-581.

119 Шарафиев Д.Р., Хацринов А.И. Анализ потребительских свойств природных цеолитов в странах СНГ / Д.Р. Шарафиев, А.И. Хацринов // Вестник технологического университета. – 2016. – Т.19, №12. – С.95-98.

120 Вейсгем А.С., Назаренко О.Б., Зарубина Р.Ф. Удаление железа из скважинной воды на фильтре с загрузкой из Бадинского цеолита / А.С. Вейсгем, О.Б. Назаренко, Р.Ф. Зарубина // Вестник науки Сибири. – 2012. – №4(5). – С.23-29.

121 Eroglu N., Emekci M., Athanassiou C.G. Applications of natural zeolites and food production / N. Eroglu, M. Emekci, C.G. Athanassiou // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2017. – Vol.97, No.11. – P.3487-3499.

122 Marican A., Duran-Lara E.F. A review on pesticide removal through different processes / A. Marican, E.F. Duran-Lara // Environmental Science and Pollution Research. – 2018. – No.25. – P.2051-2064.

123 Mostafa M., Bin Jumah M.N., Othman S.I. et. all. Effective removal of different species of organophosphorus pesticides (acephate, omthosate, and methyl parathion) using chitosan/Zeolite-A as multifunctional adsorbent / M. Mostafa, M.N. Bin Jumah, S.I. Othman et. all. // Environmental Technology & Innovation. – 2021. – Vol.24. – P.101875.

124 Lule G.M., Atalay M.U. Comparison of Fenitrothion and Trifluralin Adsorption on Organo-Zeolites and Activated Carbon. Part I: Pesticides Adsorption Isotherms on Adsorbents / G.M. Lule, M.U. Atalay // Particulate science and technology. – 2014. – Vol.32, No.4. – P.418-425.

125 Rasamimanana S., Mignard S., Batonneau-Gener I. Hierarchical zeolites as adsorbents for mesosulfuron-methyl removal in aqueous phase / S. Rasamimanana, S. Mignard, I. Batonneau-Gener // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2016. – Vol.226, No.15. – P.153-161.

126 Ogunan J.A., Kowenje C.O., Osewe E.T. et. all. Effects of zeolites X and Y on the degradation of malathion in water / J.A. Ogunan, C.O. Kowenje, E.T. Osewe et. all. // *Science Journal of Chemistry*. – 2013. – No.1(1). – P.7-13.

127 Ignatov I., Mosin O., Strommer S. Nano Mix of Shyngite and Zeolite for Cleaning of Toxins and Increasing of Energy of Hydrogen Bonds among Water Molecules in Human Body / I. Ignatov, O. Mosin, S. Strommer // *Journal of Medicine, Physiology and Biophysics*. 2016. – Vol.27. – P.1-10.

128 Ahmed S.M., Taha M.R., Taha O.M. Kinetics and isotherms of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) adsorption using soil-zeolite mixture / S.M. Ahmed, M.R. Taha, O.M. Taha // *Nanotechnology for Environmental Engineering*. – 2018. – No.4. – P.5-25.

129 Лягин И.В., Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. Ферментные биосенсоры для определения пестицидов / И.В. Лягин, Е.Н. Ефременко, С.Д. Варфоломеев // *Успехи химии*. – 2017. – Т.86, № 4. – С. 339-355.

130 Будников Г.К., Евтюгин Г.А. Экспресс-тестовые методы определения ингибиторов гидролитических ферментов с помощью электрохимических биосенсоров / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин // *Рос.хим. ж. им. Д.И. Менделеева*. – 2001. - , Т.14, № 4. – С. 86-94.

131 Филиппова А.М. Разработка технологии формирования биосенсорных тест-систем на основе композиционных материалов: автореферат.... канд. биол. наук: 03.01.06/ Филиппова Анастасия Михайловна – Ставрополь, 2013. – 20 с.

132 Утегенова А.О., Ашкенова З.Н., Какимова Ж.Х. и др. Особенности функционирования и практического применения биосенсоров на основе фермента холинэстеразы // *Материалы Международной научно-практической конференции, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова*. – Семей, 2018. – С. 271-273.

133 Аракелян А.Г., Кочуров Д.В., Паламарчук А.А. и др. Полимерные носители для иммобилизации ферментов / А.Г. Аракелян, Д.В. Кочуров, А.А. Паламарчук и др. // *Проблемы науки*. – 2018. - №11(35). – С.9-10.

134 Демьянцева Е.Ю., Парфенова А.В. Способы инкапсулирования ферментов: учебно-метод. пособие / ВШТЭ СПб ГУПТД-СПб., 2018. – 20 с.

135 Волосова Е.В., Безгина Ю.А., Пашкова Е.В. и др. Спектрофотометрический метод определения протеолитической активности иммобилизованных в структуру биополимеров / Е.В. Волосова, Ю.А. Безгина, Е.В. Пашкова и др. // *Успехи современного естествознания*. – 2016. - №4. – С.18-22.

136 Ключева М.В. Основные аспекты иммобилизации ферментов на примере липаз / М.В. Ключева // *Молодой ученый*. – 2014. - №8. – С.320-325.

137 Ефимцева Э.А., Челпанова Т.И. Иммобилизация щелочнойфосфотазы. Перспективы биомедицинского использования иммобилизованного фермента / Э.А. Ефимцева, Т.И. Челпанова // Биотехнология. - 2017. - № 4, Т.33. – С. 54-75.

138 Маслова Н.Е., Крылова Т.С., Гараева М.Я. и др. Методы функционализации поверхности сенсоров биологическими молекулами / Н.Е. Маслова, Т.С. Крылова, М.Я. Гараева и др. // Молекулярная медицина. - 2013. - № 5. - С. 8-15.

139 Приворотская Е.А. Получение стабилизированных форм гидролитических ферментов технического и фармацевтического назначения: дис. ... канд. хим. наук: 03.01.06 / Приворотская Елизавета Александровна. - Москва, 2017. – 171 с.

140 Мазеина Г.С., Сухороков А.Ю. Разработка новых защитных групп для бороновых кислот на основе борадамантов / Г.С. Мазеина, А.Ю. Сухороков // Успехи в химии и в химической технологии. – 2017. - №4. Т.31. – С.13-15.

141 Челпанова Т.И., Ефимцева Э.А. Иммобилизация щелочнойфосфотазы на сферических пектиновых гелях / Т.И. Челпанова, Э.А. Ефимцева // Прикладная биохимия и микробиология. - 2016. - № 1, Т.52.- С.44-52.

142 Большакова Л.С., Литвинова Е.В., Жмурина Н.Д. Влияние различных технологических факторов на реологические характеристики альгинатных гелей / Л.С. Большакова, Е.В. Литвинова, Н.Д. Жмурина // Современные проблемы науки и образования. - 2012. - № 6. - С. 1-7.

143 Оболкина В.И., Крапивницкая И.А., Йовбак У.С. и др. Использование пектинов и пектинсодержащих продуктов при производстве кондитерских изделий с железной структурой / В.И. Оболкина, И.А. Крапивницкая, У.С. Йовбак и др. // Продукты & ингредиенты. - 2013. - № 2. - С.10-12.

144 Ефимцева Э.А., Челпанова Т.И. Иммобилизация щелочнойфосфотазы. Перспективы биомедицинского использования иммобилизованного фермента / Э.А. Ефимцева, Т.И. Челпанова // Биотехнологи. - 2017. - № 4, Т.33. - С. 54-75.

145 Немец Е.А., Панкина А.П., Сургученко В.А. и др. Биостабильность и цитоксичность медицинских изделий на основе сшитых биополимеров / Е.А. Немец, А.П. Панкина, В.А. Сургученко и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2018. - №1, Т.20. - С.79-85.

146 Юсова А.А., Гусев И.В., Липатова И.М. Свойства гидрогелей на основе смесей альгината натрия с другими полисахаридами природного происхождения / А.А. Юсова, И.В. Гусев, И.М. Липатова // Химия растительного сырья. - 2014. - № 4. - С.59-66.

147 Донченко Л.В., Темников А.В. Разработка способов улучшения студнеобразующей способности свекловичного пектина // Евразийское научное объединение. - 2016. - № 2 (14). - С. 80-84.

148 Утегенова А.О., Какимова Ж.Х., Капшакбаева З.В. ж.т.б. Имобилизацияланған ферментпен тест-жүйесін дайындау үшін ацетилхолинэстераза ферментінің меншікті белсенділігін зерттеу / А.О.Утегенова, Ж.Х.Какимова, З.В. Капшакбаева ж.т.б. // Семей қаласының Шәкәрім атындағы мемлекеттік университетінің Хабаршасы. – 2020. - №2(90). – 176-179 б.

149 Маклакова А.А., Кондратюк Ю.В., Воронько Н.Г. и др. Реологическое поведение гелей желатины с добавками анионного полисахарида // Известия КГТУ. - 2012. - № 25. - С.90-97.

150 Патент РК № 4295, МПК G01N 27/30 Биосенсорная тест-система на основе иммобилизованного фермента для определения карбофоса в молоке (варианты). Какимова Ж.Х., Утегенова А.О., Кливенко А.Н. и др., 2019/0558.2, 13.09.2019, бюл. № 37.

151 Торосян Г.О., Симонян А.А., Давтян В.А. и др. Выбор адсорбента для очистки сточных вод от органических загрязнителей / Г.О. Торосян, А.А. Симонян, В.А. Давтян и др. // Водоочистка, водоподготовка, водоснабжение - 2019. - № 5 (137). – С. 18-22.

152 Торосян Г.О., Петросян М.З., Симонян А.А. и др. Оптимизация технологии очистки сточных вод от пестицидов / Г.О. Торосян, М.З. Петросян, А.А. Симонян и др. // Вода Magazine – 2018. - № 8 (132). – С. 30-33.

153 Торосян Г.О., Петросян М.З., Симонян А.А. и др. Обезвреживание фосфорорганических соединений в окружающей среде / Г.О. Торосян, М.З. Петросян, А.А. Симонян и др. // Экологический Вестник Северного Кавказа – 2018. – Т. 4, № 2. – С. 65-75.

154 Васильянова Л.С., Лазарева Е.А. Цеолиты в экологии / Л.С.Васильянова, Е.А. Лазарева // Новости науки Казахстана. - 2016. - № 1 (127). - С. 61-85.

155 Жарыкбасов Е.С. Исследование возможности переработки молока с повышенным содержанием токсичных элементов: дис... канд. техн. наук: 05.18.04 / Жарыкбасов Ерлан Сауықович. – Кемерово, 2019. – 280 с.

156 Донская Г.А., Марьин В.А. Очистка молока от радионуклидов цезия неорганическим природным сорбентом / Г.А. Донская, В.А. Марьин // Молочная промышленность. - 2014. - № 12. - С. 48-49.

157 Инновационный патент РК № 30570, МПК G01N 15/00 Стенд для моделирования фильтрации жидкостей. Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Государственный университет им. Шакарима, 2014/1842.1, 16.11.2015, бюл. № 11

158 Исследование степени накопления свойственных для Семейского региона Восточно-Казахстанской области радиоактивных элементов и тяжелых металлов в сырье животного и растительного происхождения и разработка технологического способа понижения их содержания в процессе переработки исследуемого сырья: отчет о НИР/Какимов А.К.- Семей: Государственный университет имени Шакарима города Семей, 2012. - 122 с.

159 Какимов А.К., Ибрагимов Н.К., Жарыкбасов Е.С. и др. Исследования содержания тяжелых металлов и радионуклидов в молоке до и после фильтрации / А.К.Какимов,Н.К. Ибрагимов, Е.С. Жарыкбасов и др. // Актуальные проблемы техники и технологии переработки молока. - 2015. - вып. 12. - С. 32-37.

160 Комаров В.М. Адсорбенты и их свойства / В.М. Комаров - Минск: Наука и техника, 1977. - 248 с.

161 Чебунина Е.И. Свойства конъюгированных форм различных белков с карбофосом / Е.И. Чебунина // Известия вузов. Пищевая технология. - 1993. - № 3-4. - С. 12-13.

162 Засидко И.Б., Полутренко М.С., Мандрык О.Н. Использование цеолита и антрацита для очистки природных и сточных вод от ионов тяжёлых металлов // Наукові нотатки. – 2019. - № 65. – С. 80-86.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Патент № 4295 на полезную модель «Биосенсорная тест-система на основе иммобилизованного фермента для определения карбофоса в молоке»

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**ПАТЕНТ
PATENT**

№ 4295

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL

 (21) 2019/0558.2

(22) 19.06.2019

Қазақстан Республикасы Пайдалы модельдер мемлекеттік тізілімінде тіркеу күні / Дата регистрации в Государственном реестре полезных моделей Республики Казахстан / Date of the registration in the State Register of Utility Models of the Republic of Kazakhstan: 09.09.2019

(54) Сүттегі карбофосты анықтау үшін арналған иммобилизацияланған фермент негізіндегі биосенсорлық тест-жүйе (нұсқалары)
Биосенсорная тест-система на основе иммобилизованного фермента для определения карбофоса в молоке (варианты)
Biosensor test system based on an immobilized enzyme for determination of carbophos in milk (variants)

(73) Утегенова Асия Оразбековна (KZ)
Utegenova Assiya Orazbekovna (KZ)

(72) Какимова Жайнагуль Хасеновна (KZ) Kakimova Zhainagul Khasenovna (KZ)
Утегенова Асия Оразбековна (KZ) Utegenova Assiya Orazbekovna (KZ)
Кливленко Алексей Николаевич (KZ) Klivenko Aleksey Nikolayevich (KZ)
Капшакбаева Зарина Владимировна (KZ) Kapshakbayeva Zarina Vladimirovna (KZ)
Бейсембаева Алем Халитовна (KZ) Beisembayeva Alem Khalitovna (KZ)
Куркембаева Нурбике Кадыргалиевна (KZ) Kurkembayeva Nurbike Kadyrgaliyevna (KZ)
Байбалинова Гульмира Муратбековна (KZ) Baibalinova Gulmira Muratbekovna (KZ)



ЭЦҚ қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed by EDS

Е. Оспанов
Y. Ospanov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМҚ директоры
Директор РІП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 4295
(51) G01N 27/30 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2019/0558.2

(22) 19.06.2019

(45) 13.09.2019, бюл. №37

(72) Какимова Жайнагуль Хасеновна; Утегенова Асия Оразбековна; Кливленко Алексей Николаевич; Капшакбаева Зарина Владимировна; Бейсембаева Алем Халптовна; Куркембаева Нурбике Кадыргалиевна; Байбалшинова Гульмира Мурагбековна

(73) Утегенова Асия Оразбековна

(74) Кундызбаев Джумакан Какимович

(56) Воробьева О.В., Филиппова А.М., Аванесян С.С. Биосенсорная тест-система на основе иммобилизованного фермента ацетилхолинэстеразы для определения карбофоса // Современные проблемы науки и образования. – 2012 - №6.

(54) **БИОСЕНСОРНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФЕРМЕНТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРБОФОСА В МОЛОКЕ (ВАРИАНТЫ)**

(57) Полезная модель относится к области контроля окружающей среды с использованием иммобилизованных ферментов и может быть

использована для определения наличия в молоке пестицида карбофоса.

Технический результат - быстрая биосенсорная тест-система на основе природного полимера альгината натрия с иммобилизованным ферментом которую можно использовать в полевых условиях.

Биосенсорная тест-система, включает фермент, композиционный материал-носитель, буферный раствор, индикатор, преобразователь. В качестве носителя содержит альгинат натрия, в качестве преобразователя - стеклянную палочку диаметром 5 мм и длиной 220 мм или полоску хроматографической бумаги, носитель с ферментом наносят тонким слоем на поверхность преобразователя, который затем помещают в 2-4% раствор хлорида кальция до образования гелевой матрицы.

Биосенсорная тест-система проста в использовании и не обладает токсичным действием. Является перспективной для создания экспресс-методов с целью определения различных токсикантов в биологических объектах.

(19) KZ (13) U (11) 4295

Полезная модель относится к области мониторинга окружающей среды с использованием иммобилизованных ферментов и может быть использована для определения наличия в молоке пестицида карбофоса.

Известна биосенсорная тест-система на основе иммобилизованного фермента, включающая композиционный материал, фермент ацетилхолинэстеразу для иммобилизации в структуру композиционного материала, буферный раствор, индикатор и преобразователь, на поверхности которого формируется тест-система. Формирование композиционного материала осуществляют методом свободного растекания исходной смеси на гладкую стеклянную поверхность желаемой формы толщиной 2-3 мм с испарением растворителя в течение 36-48 часов при температуре 20-24°C, для иммобилизации фермента ацетилхолинэстеразы в структуру композиционного материала 0,049 г композиционного материала, 0,6 мг фермента растворяют в 4 мл дистиллированной воды (Филлипова А.М., Воробьева О.В., Аванесян С.С. «Биосенсорная тест-система на основе иммобилизованного фермента ацетилхолинэстеразы для определения карбофоса», <https://science-education.ru/ru/article/view?id=8023>)

Недостатком известной тест-системы является то, что в данном способе не указывается название материала, который используется в качестве композиционного материала, длительное формирование композиционного материала на гладкой стеклянной поверхности (в течение 36-48 часов), а также то, что не указываются размеры гладкой стеклянной поверхности (преобразователя).

Задачей полезной модели является создание удобной в эксплуатации биосенсорной тест-системы на основе природного полимера с иммобилизованным ферментом позволяющей сократить длительность формирования композиционного материала.

Техническим результатом полезной модели является быстрая биосенсорная тест-система на основе природного полимера альгината натрия с иммобилизованным ферментом, в которой в качестве преобразователя используют стеклянную палочку или полоску хроматографической бумаги (вариант).

Технический результат достигается тем, что биосенсорная тест-система, включающая фермент, композиционный материал - носитель, буферный раствор, индикатор, преобразователь, согласно полезной модели в качестве носителя содержит альгинат натрия, в качестве преобразователя - стеклянную палочку диаметром 5 мм и длиной 220 мм или полоску фильтровальной бумаги размером 1,5x5 мм, носитель с ферментом наносят тонким слоем на поверхность преобразователя, который затем помещают в 2-4% раствор хлорида кальция до образования гелевой матрицы.

Полезная модель реализуется следующим образом.

Для создания тест-системы в качестве преобразователя используют стеклянные палочки диаметром 5 мм длина 220 мм.

Исходную смесь готовят следующим образом: сначала получают водный раствор альгината натрия, затем к 10 мл приготовленного раствора альгината натрия добавляют 0,5 мл раствора фермента ацетилхолинэстеразы, 1 мл буферного раствора pH-8.4, тщательно перемешивают и добавляют 5-6 капель раствора фенолового красного, который используют в качестве индикатора.

Сухую чистую стеклянную палочку - преобразователь, погружают в приготовленную исходную смесь, выдерживают в течение 5 секунд, вынимают из раствора и погружают в раствор хлорида кальция на 5 секунд. На поверхности преобразователя образуется тонкая бесцветная полимерная пленка.

Для определения наличия или отсутствия в молоке ингибитора фермента (карбофоса) преобразователь с образовавшейся на ней полимерной пленкой, содержащей иммобилизованный фермент, погружают в подготовленный образец молока. При отсутствии ингибитора фермента (карбофоса) тест-система остается бесцветной, в случае присутствия карбофоса выше ПДК 0,05 мг/кг - окрашивается в розовый цвет.

Тест-систему на основе хроматографической бумаги получают таким же способом, как описано выше на основе стеклянной палочки, за исключением погружения носителя с ферментом в раствор хлорида кальция

Полезная модель иллюстрируется примерами.

Пример 1.

Готовят раствор альгината натрия путем растворения 1 г альгината натрия в 100 мл воды при комнатной температуре.

Готовят раствор фермента для иммобилизации путем растворения в 10 мл дистиллированной воды 15 мг сухого фермента.

Готовят исходный раствор, для чего к 10 мл раствора альгината натрия добавляют 0,5 мл раствора фермента ацетилхолинэстеразы, 1 мл буферного раствора pH-8.4, тщательно перемешивают и добавляют 5-6 капель раствора фенолового красного в качестве индикатора.

Сухую чистую стеклянную палочку погружают в приготовленную исходную смесь, выдерживают в течение 5 секунд, вынимают из исходного раствора и погружают в раствор хлорида кальция на 5 секунд. На поверхности стеклянной палочки образуется тонкая бесцветная полимерная пленка.

Пример 2.

Подготовку раствора альгината натрия, раствора фермента и исходной смеси осуществляют так же, как в примере 1.

Далее полоску фильтровальной бумаги погружают в приготовленную исходную смесь, выдерживают в течение 5 секунд. На поверхности фильтровальной бумаги образуется тонкая бесцветная полимерная пленка.

Полученная биосенсорная тест-система на основе иммобилизованного фермента ацетилхолинэстеразы легка и удобна в использовании и не обладает токсичным действием. Является перспективной для создания экспресс-тестов с целью определения различных токсикантов в биологических объектах.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

1. Биосенсорная тест-система на основе иммобилизованного фермента для определения карбофоса в молоке, включающая композиционный материал - носитель, фермент, буферный раствор,

индикатор, преобразователь, *отличающаяся* тем, что в качестве носителя используют альгинат натрия, в качестве преобразователя используют стеклянную палочку диаметром 5 мм и длиной 220 мм, носитель с ферментом наносят тонким слоем на поверхность преобразователя, который затем помещают в 2-4% раствор хлорида кальция до образования гелевой матрицы.

2. Биосенсорная тест-система, по п.1., *отличающаяся* тем, что в качестве преобразователя используют полоску хроматографической бумаги.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Стандарт организации

СТ РГКП на ПХВ - 3992 1917 27-001-2019

РГКП на ПХВ «Государственный университет имени Шакарима
города Семей»

УТВЕРЖДАЮ
Ректор РГКП на ПХВ
«Государственный университет
имени Шакарима города Семей»
М.Г. Ескендиоров
2019 год






Творог
СТ РГКП на ПХВ - 3992 1917 27-001-2019
(вводится впервые)

Срок действия
с « 01 » мая 2019 г
до « 01 » мая 2024 г

Держатель подлинника:
РГКП на ПХВ «Государственный
университет имени Шакарима города Семей
Адрес 071412, Республика Казахстан,
Восточно-Казахстанская область,
г. Семей, ул. Глинки, 20А
тел. 8 (7222) 323513

Разработано:
РГКП на ПХВ «Государственный
университет имени Шакарима
города Семей

 А.К. Какимов
 Ж.Х. Какимова
 А.О. Утегенова
«22» 05 2019 год

Семей
2019

1 Область применения

Настоящий Стандарт организации распространяется на упакованный в потребительскую тару творог, изготавливаемый из коровьего молока и предназначенный для непосредственного использования в пищу.

Настоящий стандарт не распространяется на продукт, обогащенный молочным белком, витаминами, микро- и макроэлементами, пищевыми волокнами, полиненасыщенными жирными кислотами, фосфолипидами, пробиотиками и пребиотиками.

Стандарт пригоден для целей сертификации.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего Стандарта организации необходимы следующие ссылочные нормативные документы:

ГОСТ 2874-82 Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством

ГОСТ 26809.1-2014 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка проб к анализу

ГОСТ 3622-68 Молоко и молочные продукты. Отбор проб и подготовка их к испытанию

ГОСТ 3623-73 Молоко и молочные продукты. Методы определения пастеризации

ГОСТ 3626-73 Молоко и молочные продукты. Метод определения влаги и сухого вещества

ГОСТ 5867-90 Молоко и молочные продукты. Методы определения жира

ГОСТ 3624-92 Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности

ГОСТ 3625-84 Молоко и молочные продукты. Методы определения плотности

ГОСТ 8218-89 Молоко. Метод определения чистоты

ГОСТ 9225-84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 10444.11-89 Продукты пищевые. Методы определения молочно-кислых микроорганизмов

ГОСТ 10444.15-94 Продукты пищевые. Метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

ГОСТ 23327-98 Молоко и молочные продукты. Метод измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка

ГОСТ 13264-88 Молоко коровье. Требования при закупках

ГОСТ 14192-96 Маркировка грузов

СТ РК ГОСТ Р 51760-2003 Тара потребительская полимерная. Общие технические условия

ГОСТ 12302-2013 Пакеты из полимерных пленок и комбинированных материалов. Общие технические условия

ГОСТ 23452-79 Молоко и молочные продукты. Методы определения остаточных количеств хлорорганических пестицидов

ГОСТ 25102-90 Молоко и молочные продукты. Методы определения содержания спор мезофильных анаэробных бактерий

ГОСТ 26927-86 Сырье и продукты пищевые. Методы определения ртути

ГОСТ 26932-86 Сырье и продукты пищевые. Методы определения свинца

ГОСТ 26933-86 Сырье и продукты пищевые. Методы определения кадмия

ГОСТ 30178-96 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов

ГОСТ 30347-92 Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*

ГОСТ 30518-97 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 30519-97 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода *salmonella*

ГОСТ 30711-2001 Продукты пищевые. Методы выявления и определения афлатоксинов В1 и М1

ГОСТ 30538-97 Продукты пищевые. Методика определения токсичных элементов атомно-эмиссионным методом

ГОСТ 8.579-2002 Государственная система обеспечения единства измерений. Требования к количеству фасованных товаров в упаковках любого вида при их производстве, расфасовке, продаже и импорте

ПРИМЕЧАНИЕ При пользовании настоящим Стандартом организации целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов по ежегодно издаваемому информационному указателю «Нормативные документы по стандартизации» по состоянию на текущий год и соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим Стандартом организации следует руководствоваться замененным (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку

3 Классификация

3.1 Продукт в зависимости от молочного сырья изготавливают из:

- цельного молока;
- нормализованного молока;
- обезжиренного молока;
- восстановленного молока;
- их смесей.

4 Технические требования

4.1 Продукт должен вырабатываться в соответствии с требованиями [1] и технологической инструкции (Приложение 1).

4.2 По органолептическим показателям продукт должен соответствовать требованиям, указанным в Таблице 1

Таблица 1- Требования к органолептическим показателям

Показатели	Характеристика
Консистенция и внешний вид	Мягкая, мажущаяся, рассыпчатая. Допускается неоднородная, с наличием мягкой крупитчатости
Вкус и запах	Чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов
Цвет	Белый с кремовым оттенком

4.3 По физико-химическим показателям продукт должен соответствовать требованиям, указанным в Таблице 2

Таблица 2- Физико-химические показатели

Наименование показателя	Норма для продукта с массовой долей жира, % не менее													
	обезжиренный	2,0	3,0	3,8	4,0	5,0	7,0	9,0	12,0	15,0	18,0	19,0	20,0	23,0
Массовая доля белка, %, не менее	18,0			16,0				14,0						
Массовая доля влаги, %	80,0	76,0			75,0		73,0		70,0		65,0		60,0	
Кислотность, °Т	240		230				220		210			200		
Фосфатаза или пероксидаза	не допускается													
Температура продукта при выпуске с предприятия, °С	4±2													
Примечание – Для продукта, произведенного из цельного молока, массовую долю жира устанавливают в технологической инструкции в виде диапазона фактических значений («от.....до....», %)														

4.4 Допустимые уровни содержания потенциально опасных веществ (токсичные элементы, микотоксины, диоксиды, меламина, антибиотики, пестициды, радионуклиды) в твороге не должно превышать требования [1].

4.5 Допустимые уровни содержания микроорганизмов (бактерии группы кишечной палочки, дрожжи, плесени, *Staphylococcus aureus*, бактерии рода *Salmonella*, молочнокислые микроорганизмы) в продукте не должны превышать требования [1].

Количество молочнокислых микроорганизмов КОЕ в 1 г продукта в течение срока годности – не менее 10.

Жировая фаза творога должна содержать только молочный жир.

4.6 Требование к сырью и материалам:

4.6.1 Для производства продукта используют следующее сырье и материалы в зависимости от рецептуры:

- молоко коровье сырое по ГОСТ 31449;
- молоко обезжиренное по ГОСТ 31658;
- сливки по СТ РК 142;
- молоко цельное сухое по ГОСТ 4495;
- молоко сухое обезжиренное по ГОСТ 10970;
- закваски и бакконцентраты для творога, состоящие из термофильных и мезофильных молочнокислых стрептококков;
- препараты ферментные молокосвертывающие животного происхождения по ГОСТ 34353;
- кальций хлористый по ГОСТ 450;
- вода питьевая (для продукта из восстановленного молока) по СТ РК 1432.

4.7.2 Сырье, применяемое для изготовления продукта, по показателям безопасности должно соответствовать требованиям [1].

4.7.3 Допускается использование аналогичного сырья отечественного и другого производства, не уступающего по показателям качества и безопасности, указанным в 4.7.1., 4.7.2.

4.8 Упаковка

4.8.1 Продукт выпускают фасованным.

4.8.2 Тара и материалы, используемые для упаковывания и укупоривания продукта, должны соответствовать требованиям [3] и документов, в соответствии с которыми они изготовлены, и обеспечивать сохранность качества и безопасности продуктов при их перевозках, хранении и реализации.

4.8.3 Формирование групповой упаковки - в соответствии с ГОСТ 25776.

4.8.4 Транспортные пакеты формируют по ГОСТ 23285 и ГОСТ 26663.

4.8.5 Укладку транспортного пакета осуществляют так, чтобы была видна маркировка не менее одной единицы потребительской тары и/или групповой упаковки, и/или транспортной тары, и/или многооборотной тары с каждой боковой стороны транспортного пакета. Укладку транспортного пакета осуществляют способами, обеспечивающими сохранность нижних рядов потребительской тары и/или групповой упаковки, и/или транспортной тары, и/или многооборотной тары без их деформации.

4.8.6 Допускаемые отрицательные отклонения содержимого нетто от номинального количества - в соответствии с ГОСТ 8.579.

4.9 Маркировка

4.9.1 Маркировка потребительской тары должна быть осуществлена в соответствии с [2] со следующим уточнением:

- для продукта, произведенного из цельного молока, допускается указывать массовую долю жира в диапазоне «От... до...», в процентах, с дополнительной отчетливо видимой маркировкой для каждой партии конкретного значения массовой доли жира любым удобным способом;

- для обезжиренного продукта допускается не указывать массовую долю жира;

- для продукта, произведенного из цельного молока, допускается указывать пищевую и энергетическую ценность в диапазоне «От... до...» в процентах или граммах и в джоулях или калориях соответственно.

4.9.2 Маркировка групповой упаковки, многооборотной и транспортной тары, транспортного пакета - в соответствии с [2] с нанесением манипуляционных знаков или предупредительных надписей: «Бережь от солнечных лучей» и «Ограничение температуры» с указанием минимального и максимального значений температуры по ГОСТ 14192.

4.9.3 При обандероливании прозрачными полимерными материалами маркировку на боковые поверхности групповой упаковки, транспортной тары и транспортного пакета допускается не наносить.

Маркировкой в этом случае служат видимые надписи на потребительской таре или групповой упаковке, или транспортной таре, дополненные информацией о количестве мест и массе брутто. Непросматриваемые надписи, в том числе манипуляционные знаки, наносят на листы-вкладыши или представляют любым другим доступным способом.

5 Требования безопасности

5.1 Правила приемки - по ГОСТ 26809.1.

5.2 Продукт контролируют по показателям качества и безопасности, предусмотренным в разделе 4. в соответствии с программой производственного контроля, утвержденной в установленном порядке.

6 Методы контроля

6.1 Отбор и подготовка проб к анализу - по ГОСТ 26809.1.

6.2 Определение внешнего вида и цвета осуществляют визуально, консистенции, вкуса и запаха проводят органолептически и характеризуют в соответствии с требованиями 4.2.

6.3 Определение температуры продукта при выпуске с предприятия и массы нетто продукта - по ГОСТ 3622.

6.4 Определение массовой доли жира - по ГОСТ 5867.

6.5 Определение массовой доли белка - по ГОСТ 23327.

6.6 Определение кислотности - по ГОСТ 3624.

6.7 Определение фосфатазы, пероксидазы - по ГОСТ 3623.

6.8 Определение токсичных элементов:

- свинца - по ГОСТ 26932, ГОСТ 30178, ГОСТ 30538;
- мышьяка - по ГОСТ 30538;
- кадмия - по ГОСТ 26933, ГОСТ 30178, ГОСТ 30538;
- ртути - по ГОСТ 26927.

6.9 Определение пестицидов - по ГОСТ 23452.

6.10 Определение микотоксинов (афлатоксина М₁,) - по ГОСТ 30711.

6.11 Определение микробиологических показателей:

- бактерий группы кишечных палочек - по ГОСТ 9225, 30518;
- staphylococcus aureus - по ГОСТ 30347;
- бактерий рода Salmonella - по ГОСТ 30519;
- молочнокислых микроорганизмов - по ГОСТ 10444.11.

7 Транспортирование и хранение

7.1 Продукт транспортируют специализированными транспортными средствами в соответствии с правилами перевозок скоропортящихся грузов, действующими на данном виде транспорта.

7.2 Продукт хранят при температуре $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Срок годности продукта с момента окончания технологического процесса устанавливает изготовитель с учетом требований нормативных правовых актов в области безопасности пищевой продукции.

Библиография

(1) Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»

(2) Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 022/2011 «Пищевая продукция в части ее маркировки»

(3) Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 005/2011 «О безопасности упаковки».

Приложение А

Информационные данные о пищевой и энергетической ценности 100 грамм продукта

Наименование продукта	Среднее значение на 100 г продукта, г			Энергетическая ценность, ккал
	жир	белок	углеводы	
Творог	9,0	16,0	3,1	160,2

Приложение Б
Лист регистрации изменений

Номер изме- нения	Номер листа (станции)				номер доку- мента	Под- пись	Дата внесения изменений	Дата введения изменений
	изме- нен- ного	заме- нен- ного	но- вого	анули- рован- ного				

ТИ РГП на ПХВ 3992 1917 27 002-2019

РГКП на ПХВ «Государственный университет имени Шакарима
города Семей»

УТВЕРЖДАЮ
Ректор РГП на ПХВ
«Государственный университет
имени Шакарима города Семей»
М.Г. Ескендиров
2019 год


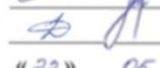



ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОИЗВОДСТВУ
ТВОРОГА
ТИ РГП на ПХВ 3992 1917 27 002-2019
(вводятся впервые)

Срок действия
с « 01 » мая 2019 г
до « 01 » мая 2024 г

Держатель подлинника:
РГКП на ПХВ «Государственный
университет имени Шакарима города Семей
Адрес 071412, Республика Казахстан,
Восточно-Казахстанская область,
г. Семей, ул. Глиники, 20А
тел. 8 (7222) 323513

Разработано:
РГКП на ПХВ «Государственный
университет имени Шакарима
города Семей

 А.К. Какимов
 Ж.Х. Какимова
 А.О. Утегенова
« 22 » 05 2019 год

Семей
2019

Настоящая технологическая инструкция распространяется на производство творога (далее по тексту - продукт), изготовляемый из коровьего молока и предназначенный для непосредственного использования в пищу.

1. Характеристика готовой продукции

Продукт выработан из коровьего молока по ГОСТ 13264, закваски молочнокислых чистых культур мезофильных и термофильных стрептококков.

1.1 Продукт по органолептическим показателям должен соответствовать требованиям, представленным в таблице 1.

Таблица 1.

Показатели	Характеристика
Консистенция и внешний вид	Мягкая, мажущаяся, рассыпчатая. Допускается неоднородная, с наличием мягкой крупитчатости
Вкус и запах	Чистый, кисломолочный без посторонних запахов и вкусов
Цвет	Белый с кремовым оттенком

Содержание радионуклидов в продукте должно соответствовать нормативам, установленным в Санитарные правила "Санитарно-эпидемиологические требования к объектам по производству пищевой продукции" утвержденных приказом Министранациональной экономики Республики Казахстан от 28 февраля 2015 года № 164.

1.2 По физико-химическим показателям продукт должен соответствовать требованиям, представленным в таблице 2.

Таблица 2.

Наименование показателя	Норма для продукта с массовой долей жира, % не менее													
	обезжиренный	2,0	3,0	3,8	4,0	5,0	7,0	9,0	12,0	15,0	18,0	19,0	20,0	23,0
Массовая доля белка, %, не менее	18,0			16,0				14,0						
Массовая доля влаги, %	80,0	76,0			75,0		73,0		70,0		65,0		60,0	
Кислотность, °Т	240		230				220		210			200		
Фосфатаза или пероксидаза	не допускается													
Температура продукта при выпуске с предприятия, °С	4±2													
Примечание – Для продукта, произведенного из цельного молока, массовую долю жира устанавливают в технологической инструкции в виде диапазона фактических значений («от.....до.....», %)														

1.3 По микробиологическим показателям продукт должен соответствовать требованиям, представленным в таблице 3.

Таблица 3.

Наименование показателя	Норма
Молочнокислые микроорганизмов, КОЕ/см ³ не менее	1 x 10 ⁶
Бактерии группы кишечной палочки в 0,001 г продукта	не допускается
Патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы, в 25 г продукта	не допускаются
Стафилококки S.aureus, в 0,1 г продукта	не допускаются

1.4 По содержанию токсичных элементов продукт должен соответствовать требованиям, представленным в таблице 4.

Таблица 4.

Наименование показателя	Допустимые уровни, мг/кг, не более
Свинец	0,3
Мышьяк	0,2
Кадмий	0,1
Ртуть	0,02

1.5 Содержание микотоксинов и пестицидов в продукте контролируется по сырью и не должно превышать допустимые уровни, указанные в таблице 5.

Таблица 5.

Наименование показателя	Допустимые уровни, мг/кг, не более
Афлатоксин М1	0,0005
Диоксины ²	0,000003 (в пересчете на жир)
ГХЦГ (α , β , γ -изомеры)	1,25 (в пересчете на жир)
ДДТ и его метаболиты	1,0 (в пересчете на жир)

2. Требования к сырью.

Для выработки продукта применяется следующее сырье и материалы:

- молоко коровье сырое по ГОСТ 31449;
- молоко обезжиренное по ГОСТ 31658;
- сливки по СТ РК 142;
- молоко цельное сухое по ГОСТ 4495;
- молоко сухое обезжиренное по ГОСТ 10970;
- закваски и бакконцентраты для творога, состоящие из термофильных и мезофильных молочнокислых стрептококков;
- препараты ферментные молокосвертывающие животного происхождения по ГОСТ 34353;
- кальций хлористый по ГОСТ 450;
- вода питьевая (для продукта из восстановленного молока) по СТ РК 1432.

3. Рецепттура

Продукт должен вырабатываться по рецептуре, представленной в таблице 6.

Таблица 6.

Наименование сырья	Количество сырья, кг
Нежирный творог с массовой долей влаги не более 80 %	820
Сливки с массовой долей жира 50 %	180
Всего	1000

4. Технологический процесс

Технологический процесс должен осуществляться с соблюдением санитарных норм и правил для предприятий молочной промышленности, утвержденных в установленном порядке.

4.1 Технологический процесс состоит из следующих операций:

- приемка и оценка качества молока;
- подогрев молока до температуры фильтрации;
- фильтрация молока с применением цеолита в качестве фильтрующего материала;
- подогрев молока для сепарирования;
- сепарирование молока;
- пастеризация обезжиренного молока и сливок;
- охлаждение обезжиренного молока до температуры заквашивания;
- заквашивание и сквашивание обезжиренного молока;
- разрезка и обработка сгустка;
- самопрессование и прессование сгустка;
- охлаждение нежирного творога;
- смешивание нежирного творога со сливками;
- оценка показателей безопасности творога;
- расфасовка и упаковка;
- хранение и реализация.

1. Приемка и оценка качества молочного сырья.

Сырье, применяемое в производстве творога должно соответствовать действующей нормативной технической документации. По показателям безопасности молочное сырье должно соответствовать требованиям Технического регламента Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевых продуктов». Содержание остаточного количества фосфорорганических пестицидов не регламентируется нормативной технической документации. При обнаружении в молочном сырье остаточного количества фосфорорганических пестицидов для его очистки рекомендуется проводить дополнительную фильтрацию с применением цеолита в качестве фильтрующего материала.

2. Подогрев молока до 20-25 °С.

Для фильтрации с применением цеолита в качестве фильтрующего материала молоко, содержащее остаточное количества фосфорорганических пестицидов 0,05 мг/кг и более, подогревают до температуры 20-25 °С.

3. Фильтрация молока.

Для фильтрации молока с применением цеолита в качестве фильтрующего материала при температуре 20-25°С использовали угловой нержавеющей сетчатый молочный фильтр.

4. Подогрев молока для сепарирования.

Для проведения процесса сепарирования на сепараторе-сливкоотделителе молоко подогревается до температуры 35-40°С в секции регенерации в пастеризационно-охладительной установке.

5. Сепарирование молока.

Сепарирование молока проводится на сепараторе-сливкоотделителе при температуре 35-40°С, где разделяется на обезжиренное молоко и сливки с массовой долей жира 50 %.

6. Пастеризация обезжиренного молока и сливок.

Пастеризацию обезжиренного молока проводят в пастеризационно-охладительной установке при температуре 78-80°С с выдержкой 20-30 секунд с дальнейшим охлаждением до температуры заквашивания молока 32-35 °С. Пастеризацию сливок проводят в пастеризационно-охладительной установке при температуре 85-90°С с выдержкой 15-20 секунд с дальнейшим охлаждением до температуры хранения 2-4 °С и отправляют на временное хранение до смешивания с нежирным творогом.

7. Заквашивание и сквашивание обезжиренного молока.

Заквашивание обезжиренного молока ускоренным способом проводится при температуре 32-35°С с добавлением закваски чистых культур 2,5 % термофильных стрептококков и 2,5 % мезофильных стрептококков, сычужного фермента в виде 1 %-ного раствора из расчета 1 г фермента на 1 т молока, 40 %-ный раствор хлористого кальция из расчета 400 г безводной соли на 1 т молока. После перемешивания обезжиренное молоко оставляют для сквашивания при температуре 32-35°С в течение 4-5 часов. Готовность сгустка определяется по его кислотности 60-65 °Т и пробой на излом. Для пробы на излом применяют шпатель, который вводят в сгусток в чуть наклонном положении, осторожно приподнимая край сгустка. При этом, край сгустка должен быть ровным, с блестящими краями и должна выделяться прозрачная светло-зеленая сыворотка. В случае, если сгусток не готов, то края излома имеют рыхлый и дряблый вид, при этом выделяется мутная сыворотка.

8. Разрезка и обработка сгустка.

Для того чтобы полученный сгусток приобрел консистенцию творога необходимо удалить сыворотку. Полученный сгусток разрезают на кубики размером 2,0x2,0x2,0см. Затем сгусток оставляют в покое в течение 60 минут для выделения сыворотки.

9. Самопрессование и прессование нежирного творога.

Для дальнейшего отделения сыворотки сгусток подвергают самопрессованию и прессованию. Самопрессование производится при температуре не выше 16°C в течение 1 часа в пресс-тележках. Прессование проводится при температуре воздуха 3-6°C. По окончании прессования массовая доля влаги в нежирном твороге должна быть не выше 80 %.

10. Охлаждение нежирного творога.

По окончании прессования нежирный творог немедленно направляется на охлаждение до температуры 6-8°C на охладитель для творога.

11. Смешивание нежирного творога со сливками.

Для получения творога с массовой долей жира 9%, охлажденный нежирный творог смешивается с полученными при сепарировании пастеризованными сливками с массовой долей жира 50 % в смесителе-дозаторе.

12. Оценка показателей безопасности творога.

После охлаждения отбирается проба творога, в котором определяются показатели безопасности согласно требованиям Технического регламента Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевых продуктов». Вместе с тем, при выработке творога из молочного сырья с остаточным количеством фосфорорганических пестицидов определяется содержание данных ксенобиотиков в готовом продукте. Содержание фосфорорганических пестицидов в твороге не должно превышать 0,05 мг/кг.

13. Расфасовка и упаковка

Расфасовку и упаковку творога проводят при температуре 6-8°C в мелкую и крупную тару в соответствии с действующей нормативной документацией.

14. Хранение и реализация

Творог хранится при температуре не выше 8 °С, не более 72 часов с момента изготовления.

5. Транспортирование и хранение

5.1 Продукт транспортируют специализированными транспортными средствами в соответствии с правилами перевозок скоропортящихся грузов, действующими на данном виде транспорта.

5.2 Продукт хранят при температуре (4 ± 2) °С.

Срок годности продукта с момента окончания технологического процесса устанавливает изготовитель с учетом требований нормативных правовых актов в области безопасности пищевой продукции.

6. Контроль качества

6.1 Отбор и подготовка проб к анализу - по ГОСТ 26809.1.

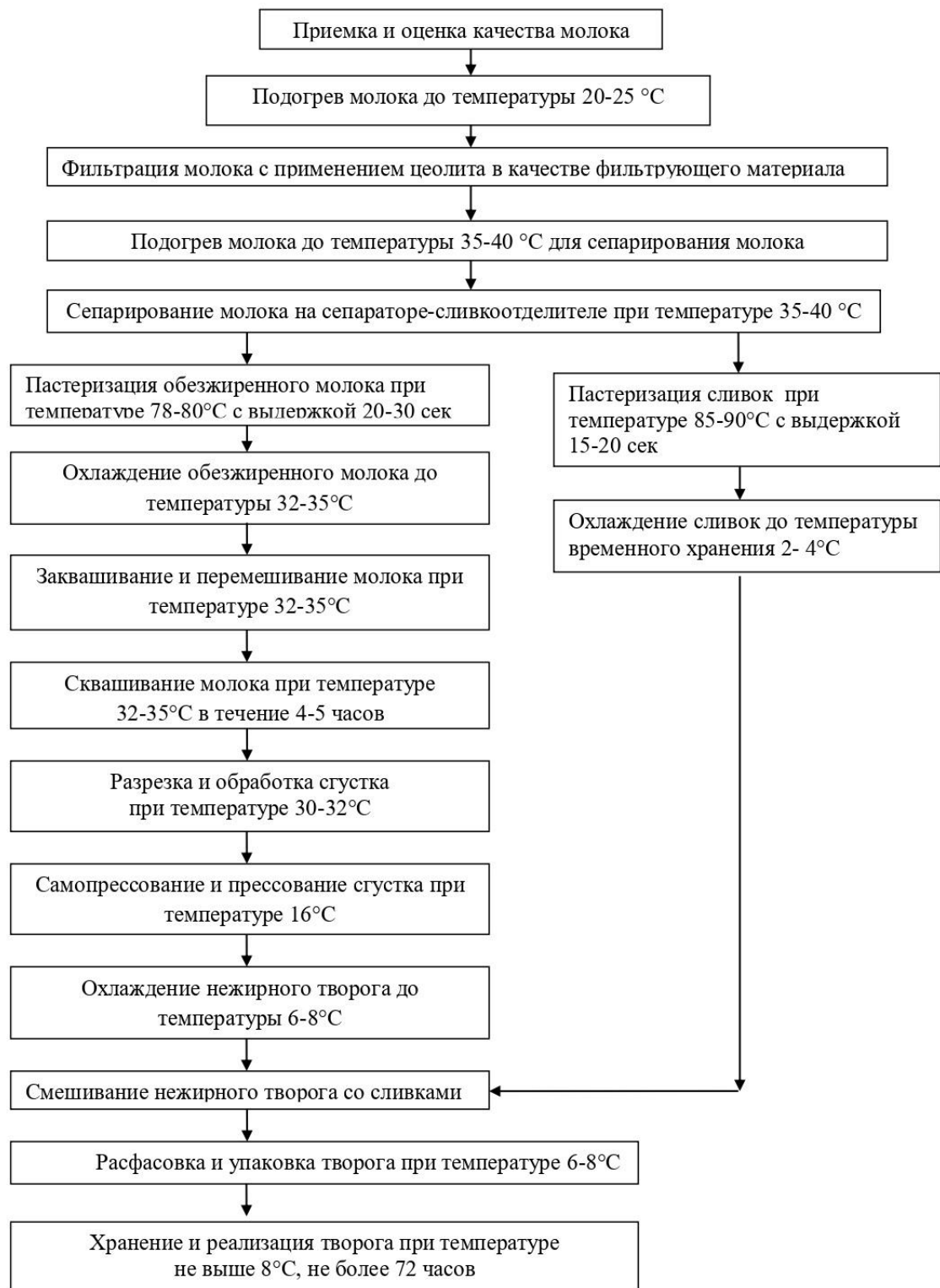
6.2 Определение внешнего вида и цвета осуществляют визуально, консистенции, вкуса и запаха проводят органолептически и характеризуют в соответствии с требованиями 4.2.

6.3 Определение температуры продукта при выпуске с предприятия и массы нетто продукта - по ГОСТ 3622.

- 6.4 Определение массовой доли жира - по ГОСТ 5867.
- 6.5 Определение массовой доли белка - по ГОСТ 23327.
- 6.6 Определение кислотности - по ГОСТ 3624.
- 6.7 Определение фосфатазы, пероксидазы - по ГОСТ 3623.
- 6.8 Определение токсичных элементов:
- свинца - по ГОСТ 26932. ГОСТ 30178. ГОСТ 30538;
 - мышьяка - по ГОСТ 30538;
 - кадмия - по ГОСТ 26933, ГОСТ 30178. ГОСТ 30538;
 - ртути - по ГОСТ 26927.
- 6.9 Определение пестицидов - по ГОСТ 23452.
- 6.10 Определение микотоксинов (афлатоксина М₁) - по ГОСТ 30711.
- 6.11 Определение микробиологических показателей:
- бактерий группы кишечных палочек - по ГОСТ 9225, 30518;
 - staphylococcus aureus - по ГОСТ 30347;
 - бактерий рода Salmonella - по ГОСТ 30519;
 - молочнокислых микроорганизмов - по ГОСТ 10444.11.

На всех стадиях производства осуществляется контроль за соблюдением технологических параметров.

Приложение А
Технологическая схема производства творога



ПРИЛОЖЕНИЕ В

Акт промышленной апробации

«УТВЕРЖДАЮ»



Директор молочного цеха
крестьянского хозяйства «Нұр»
_____ К.Ш. Шакеримов
» _____ 13 _____ 2019 г.

АКТ ПРОМЫШЛЕННОЙ АПРОБАЦИИ

Комиссия в составе: директор молочного цеха крестьянского хозяйства «Нұр» Шакеримов К.Ш.; технолог молочного цеха крестьянского хозяйства «Нұр» - Камзин Е.С.; руководитель отдела по управлению научной и инновационной деятельностью ГУ им. Шакарима г. Семей, PhD – Есимбеков Ж.С.; заведующий кафедрой «Стандартизация и биотехнология» ГУ им. Шакарима канд. техн. наук Какимова Ж.Х., докторант – Утегенова А.О. составили настоящий акт о том, что в молочном цехе крестьянского хозяйства «Нұр» было проведено производственное апробирование, внедрение технологии творога с массовой долей жира 9%, выработанного из партии молока, подвергшегося фильтрации с применением цеолита в качестве фильтрующего материала. Опытная партия вырабатывалась 25-27 марта 2019 года.

Технологический процесс производства творога осуществлен в соответствии с утвержденным стандартом организации (технические условия) и технологической инструкцией.

Опытно-промышленная выработка творога показала, что понижение токсичных элементов в молочном сырье с применением дополнительного процесса фильтрации улучшает показатели безопасности готового продукта и не влияет на изменение органолептических и физико-химических показателей готового продукта.

Комиссия отметила, что по физико-химическим показателям и показателям безопасности опытные образцы соответствует требованиям утвержденного стандарта организации на творог:

Физико-химические показатели

Наименование показателя	Характеристика
Массовая доля жира, %, не менее	9,0
Массовая доля белка, %, не менее	17,1
Кислотность, °Т	220
Фосфатаза или пероксидаза	Не обнаружено
Температура продукта при выпуске с предприятия, °С	4 ± 2

Микробиологические показатели

Наименование показателя	Содержание
Бактерии группы кишечной палочки в 0,01 г продукта	не обнаружены
Патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы, в 25 г продукта	не обнаружены
Стафилококки S.aureus, в 1 г продукта	не обнаружены

Технолог молочного цеха
крестьянского хозяйства «Нур»



Камзин Е.С.

Руководитель отдела по управлению
научной и инновационной деятель-
ностью ГУ им. Шакарима г. Семей,
PhD

Есимбеков Ж.С.

Заведующий кафедрой «Стандарти-
зация и биотехнология» ГУ им. Ша-
карима канд. техн. наук

Какимова Ж.Х

Докторант

Утегенова А.О.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Протокол расширенной дегустации

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор молочного цеха
крестьянского хозяйства «Нұр»
_____ К.Ш. Шакеримов
» _____ 2019 г.



ПРОТОКОЛ РАСШИРЕННОЙ ДЕГУСТАЦИИ

Комиссия в составе: директор молочного цеха крестьянского хозяйства «Нұр» Шакеримов К.Ш.; технолог молочного цеха крестьянского хозяйства «Нұр» - Камзин Е.С.; руководитель отдела по управлению научной и инновационной деятельностью ГУ им. Шакарима г. Семей, PhD – Есимбеков Ж.С.; заведующий кафедрой «Стандартизация и биотехнология» ГУ им. Шакарима канд. техн. наук Какимова Ж.Х., докторант – Утегенова А.О. составили настоящий протокол о том, что на базе молочного цеха крестьянского хозяйства «Нұр» была проведена расширенная дегустация творога, с массовой долей жира 9%, выработанного из партии молока, подвергшегося фильтрации с применением цеолита в качестве фильтрующего материала.

Комиссия отметила, что по органолептическим показателям творог соответствует требованиям утвержденного стандарта организации:

Таблица - Требования к органолептическим показателям

Показатели	Характеристика
Консистенция и внешний вид	Мягкая, мажущаяся, рассыпчатая
Вкус и запах	Чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов
Цвет	Белый с кремовым оттенком

В среднем по результатам органолептической оценки творог был оценен на 9 баллов. При этом вкус и запах творога (6 баллов) - чистый, кисломолочный

без посторонних запахов и привкусов, консистенция и внешний вид (2 балла) - мягкая, мажущаяся, рассыпчатая, цвет (1 балл) - белый с кремовым оттенком.

Вывод: комиссия отмечает, что творог, с массовой долей жира 9%, выработанный из партии молока, подвергнувшегося фильтрации с применением цеолита в качестве фильтрующего материала по органолептическим показателям соответствует потребительским свойствам и рекомендован к промышленному производству.

Технолог молочного цеха
крестьянского хозяйства «Нур»



Камзин Е.С.

Руководитель отдела по управлению
научной и инновационной деятель-
ностью ГУ им. Шакарима г. Семей,
PhD

Есимбеков Ж.С.

Заведующий кафедрой «Стандарти-
зация и биотехнология» ГУ им. Ша-
карима канд. техн. наук

Какимова Ж.Х

Докторант

Утегенова А.О.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Протокол испытаний



Испытательная региональная лаборатория инженерного профиля
«Научный центр радиоэкологических исследований» ГУ им. Шакарима г. Семей
071412, г. Семей, ул. Физкультурная 4 «А»

Идентификационный номер ИРЛИП НЦРЭИ: 07-1

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИИ

№ 965 от «27» июня 2018 г.

всего листов 2

лист 1 из 2

1. Наименование образца продукции: творог (контрольный образец)
2. Заказчик: докторант Утегенова А.О.
3. Заявка № 589 от «20» июня 2018 г.
4. Вид испытания: определение состава
5. Дата получения образца: «20» июня 2018 г.
6. Дата проведения испытания: «22» июня 2018 г.
7. Обозначение НД на продукцию: ЕСЭГТ, утв. реш. КТС №299 от 28.05.2010 г.
8. Испытания проведены при: температуре 22,0 °С, влажность не более 72%.

Наименование показателей, единицы измерения	Фактически получено	Обозначение НД на методы испытания
1	2	3
Вода, г/100 г	70,3	ГОСТ 3626-73
Белки, г/100 г	16,7	ГОСТ 23327-98
Аминокислотный состав, мг/100 г:	1050	МВИ.МН 1363-200
Лейцин	556	МВИ.МН 1363-200
Изолейцин	878	МВИ.МН 1363-200
Лизин	138	МВИ.МН 1363-200
Триптофан	704	МВИ.МН 1363-200
Валин	470	МВИ.МН 1363-200
Треонин	890	МВИ.МН 1363-200
Фенилаланин	310	МВИ.МН 1363-200
Лизин	215	МВИ.МН 1363-200
Метионин	98	МВИ.МН 1363-200
Цистин		
Жиры, г/100 г	9,0	ГОСТ 5867-90
Углеводы, г/100 г	3,1	ГОСТ 54667-2011

Содержание витаминов, мкг/100 г	57	ГОСТ 7047-55 ГОСТ 306273-98
А (ретинола ацетат)	210	
Е (токоферол)		
Содержание минеральных веществ, мг/кг		
Железо	0,41	ГОСТ 31671-2012
Цинк	0,39	ГОСТ 31671-2012
Медь	0,077	ГОСТ 31671-2012

Ответственный за оформление протокола:  Д.Е.Иминова

Исполнитель:  Д.Е.Иминова

/ Руководитель ИРЛИП НЦРЭИ:  С.Т.Дюсембаев



Перепечатка настоящего протокола (полная или частичная) без разрешения ИРЛИП НЦРЭИ запрещена

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Протокол испытаний



Испытательная региональная лаборатория инженерного профиля
«Научный центр радиэкологических исследований» ГУ им. Шакарима г. Семей
071412, г. Семей, ул. Физкультурная 4 «А»

Идентификационный номер ИРЛИП НЦРЭИ: 07-1

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИИ
№ 966 от «27» июня 2018 г.

всего листов 2
лист 1 из 2

1. Наименование образца продукции: творог (опытный образец)
2. Заказчик: докторант Утегенова А.О.
3. Заявка № 589 от «20» июня 2018 г.
4. Вид испытания: определение состава
5. Дата получения образца: «20» июня 2018 г.
6. Дата проведения испытания: «22» июня 2018 г.
7. Обозначение НД на продукцию: ЕСЭГТ, утв. реш. КТС №299 от 28.05.2010 г.
8. Испытания проведены при: температуре 22,0 °С, влажность не более 72%.

Наименование показателей, единицы измерения	Фактически получено	Обозначение НД на методы испытания
1	2	3
Вода, г/100 г	70,3	ГОСТ 3626-73
Белки, г/100 г	16,7	ГОСТ 23327-98
Аминокислотный состав, мг/100 г:		
Лейцин	1050	МВИ.МН 1363-200
Изолейцин	556	МВИ.МН 1363-200
Лизин	878	МВИ.МН 1363-200
Триптофан	138	МВИ.МН 1363-200
Валин	704	МВИ.МН 1363-200
Треонин	470	МВИ.МН 1363-200
Фенилаланин	890	МВИ.МН 1363-200
Лизин	310	МВИ.МН 1363-200
Метионин	215	МВИ.МН 1363-200
Цистин	98	МВИ.МН 1363-200
Жиры, г/100 г	9,0	ГОСТ 5867-90
Углеводы, г/100 г	3,1	ГОСТ 54667-2011

Содержание витаминов, мкг/100 г	57	ГОСТ 7047-55
А (ретинола ацетат)	210	ГОСТ 306273-98
Е (токоферол)		
Содержание минеральных веществ, мг/кг		
Железо	0,40	ГОСТ 31671-2012
Цинк	0,42	ГОСТ 31671-2012
Медь	0,078	ГОСТ 31671-2012

Ответственный за оформление протокола:  Д.Е.Иминова

Исполнитель:  Д.Е.Иминова

/ Руководитель ИРЛИП НЦРЭИ:  С.Т.Дюсембаев



Перепечатка настоящего протокола (полная или частичная) без разрешения ИРЛИП НЦРЭИ запрещена

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Протокол испытаний



ДП 3.02.26

Испытательный центр
Испытательная лаборатория по испытаниям продукции
Филиал «Семей»

АО «Национальный центр экспертизы и сертификации»

Юридический адрес: 071403, г. Семей, ул. Челюскинцев, 46 телефон 34 17 04, факс 34 07 18
Фактический адрес: 071403, г. Семей, ул. Челюскинцев, 46 телефон 34 17 04, факс 34 07 18
Аттестат аккредитации № KZ. T. 17. 0691 от 11 марта 2015 г. до 11 марта 2020 г.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 314/1 от 04 марта 2019 г.

Страница 1
Кол-во страниц 1

Основание для испытаний - Заявка № 282/1 от 28 февраля 2019 г.
Заявитель: ЧП Утегенова А. О., г. Семей, 3 лодочная 206
Наименование продукции: Творог 9%
Дата изготовления: дата отбора: 28.02.2019 г.
Изготовитель: к/х «Нұр», страна: Республика Казахстан
Количество отобранных образцов: 1
Дата поступления образца в испытательный центр: 28.02.2019 г.
Регистрационный номер образца: 314/1
Дата начала испытаний: 28.02.2019 г., дата окончания испытаний: 04.03.2019 г.
Обозначение НД на продукцию: ТР ТС 021/2011 от 09.12.2011 г ст. 7 п. 2 пр. 3 п. 2,
ТР ТС 033/2013
Вид испытаний: по заявке

Условия проведения испытаний: Температура 20 °С; Влажность 60 %.

№ п/п	Наименование показателей, единицы измерений	НД на методы испытаний	Нормы по НД	Фактически получено
1	Токсичные элементы мг/кг, не более: Свинец Мышьяк Кадмий Ртуть	ГОСТ 30178-96 ГОСТ 31266-2004 ГОСТ 30178-96 МУК 4.1.1472-03	0,3 0,2 0,1 0,02	Не обнаружено Не обнаружено Не обнаружено Не обнаружено
2	Микотоксины мг/кг, не более: Афлатоксин M ₁	ГОСТ 30711-2001	0,0005	Не обнаружено
3	Антибиотики, мг/кг, не более: Левомецетин Тетрациклиновая группа	СТРК 1505-2006 СТРК 1505-2006	Не допускается Не допускается	Не обнаружено Не обнаружено
4	Пестициды: мг/кг, не более: Гексахлорциклогексан (α,β,γ – изомеры) ДДТ и его метаболиты	ГОСТ 23452-2015 ГОСТ 23452-2015	1,25 1,0	Не обнаружено Не обнаружено
5	Радионуклиды Бк/кг: не более Цезий-137 Стронций-90	ГОСТ 32161-2013 ГОСТ 32163-2013	100 25	3,8 3,9

Исполнители:

Ответственный за подготовку протокола:

Начальник ИЦ


 О. Ломакина
 Е. Еранова
 А. Абиолла
 Р. Касенова

Протокол распространяется только на образцы, подвергнутые испытаниям
Полная или частичная перепечатка протокола без разрешения испытательного центра запрещена.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
ИНСТРУКЦИЯ
по применению биосенсорной тест-системы на стеклянной
поверхности и бумажной основе для качественного определения
фосфорорганического пестицида (карбофоса) в молоке.

Утверждаю
Председатель Правления-ректор
НАО «Университет имени
Шакарима города Семей»
Горембеков Б.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению биосенсорной тест-системы на стеклянной
поверхности и бумажной основе для качественного определения
фосфорорганического пестицида (карбофоса) в молоке.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Биосенсорные тест-системы на стеклянной поверхности и на бумажной основе предназначены для качественного определения фосфорорганического пестицида - карбофоса в молоке в полевых условиях и в сырьевых лабораториях молокоперерабатывающих предприятий.

1.2 Диагностическая значимость определения – качественное определение карбофоса в молоке дает возможность контролировать предельно допустимую концентрацию (0,05 мг/кг) фосфорорганического пестицида карбофоса.

1.3 Тест-системы предназначены для одноразового использования.

1.4 Область применения – лабораторная диагностика, экстренная экспресс диагностика.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА

2.1 Одна тест - система рассчитана на одно определение в молоке карбофоса.

2.2 Принцип работы. Тест-системы (на стеклянной поверхности и бумажной основе) реагирует на присутствие карбофоса в молоке уже в концентрации от 0,03 мг/кг и выше. В основе метода определения карбофоса лежит специфическая ферментативная реакция ингибирования фермента ацетилхолинэстеразы фосфорорганическим пестицидом. Под действием карбофоса в присутствии фермента ацетилхолинэстеразы происходит процесс ингибирования фермента и образования окрашивания тест-системы розового цвета в желтый.

2.3 Состав тест – систем:

- тест- система на стеклянной палочке (длина палочки -220 мм, диаметр – 5 мм) – 30 шт. с иммобилизованным ферментом;
- тест- полоски на основе хроматографической бумаги (длина полоски - 100 мм, ширина – 10 мм) – 30 шт. с иммобилизованным ферментом.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Молоко и карбофос.

3.2 Ограничение метода.

3.2.1 Тест-системы предназначены для однократного применения и только для качественного определения карбофоса в молоке.

3.2.2 Несоблюдение процедуры тестирования может отрицательно повлиять на процесс тестирования и привести к получению недействительных результатов.

3.2.3 Полученные результаты рекомендуется подтвердить путем проведения повторного анализа.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. **ВНИМАНИЕ!** Перед использованием внимательно ознакомьтесь с инструкцией по применению! Использовать строго согласно Инструкции по применению.

4.2. Все компоненты биосенсорных тест-систем являются нетоксичными.

4.3. Для сохранения активности тест-систем следует избегать прикосновений руками к сенсорному элементу.

4.4. Тест-система биологически безопасна, однако при работе с исследуемыми образцами рекомендуется использовать резиновые перчатки.

4.5. Беречь от детей.

4.6. Не использовать по истечении срока годности. Не использовать, если упаковка повреждена. Перед применением убедиться в целостности тест-системы путем визуального осмотра.

4.7. Не содержит каких-либо лекарственных средств для медицинского применения, а также материалов животного и человеческого происхождения.

4.8. Противопоказаний в рамках установленного назначения не имеет.

4.9. При использовании согласно инструкции по применению изделие является безопасным (не несет физических, экологических и иных рисков).

5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве анализируемого образца используется молоко коровье.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед началом исследования комплект(ты) с тест-системами и образцы молока довести до температуры 18-25°C.

6.1 Контроль проводить при температуре (+18–+25°C).

6.2 Вскрыть пакет, извлечь из него тест-систему.

6.3 Погрузить сенсорный(е) элемент(ы) тест-системы полностью в молоко.

Через 2-3 секунды извлечь тест-систему и наблюдать изменение окраски.

6.4 Во время проведения теста запрещается прикасаться руками к сенсорным элементам тест-системы.

6.5 Регистрация полученных результатов анализа проводится визуально.

7 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

7.1 Считывание результатов проводить через 1 минуту после извлечения тест-системы из исследуемого образца. Регистрация результатов анализа по истечении более чем 1 минуту недопустима, такие результаты являются не достоверными.

7.2 Изменение окраски сенсорного элемента (на стеклянной поверхности и бумажной основе) из розового цвета в желтый свидетельствует о наличии карбофоса в молоке (качественное определение). Неправильный результат.

8 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Информация, об особенностях транспортирования должна учитываться всеми лицами, участвующими в хранении, перевозке и утилизации (уничтожении) этого изделия.

8.1 Транспортирование.

8.1.1 Транспортирование тест-системы должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта при температуре 4 - 5°C.

8.1.2 Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

8.1.3 Свойства тест-систем допускают его немедленное применение для анализа после транспортирования при условии, что перед началом применения комплект с тест-системы доведены до температуры 18 - 25°C.

8.2 Хранение.

8.2.1 Тест-системы должны храниться в вакуумной оригинальной упаковке предприятия-изготовителя при температуре 4 – 5 °С (при отсутствии паров кислот, щелочей и органических растворителей) в течение всего срока годности для тест-системы на стеклянной палочке 30 дней, для тест-системы на бумажной основе – 20 дней.

8.2.2 Извлеченная из упаковки тест-система хранится в течении 10 минут при температуре 18–25°C.

8.2.3 Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

8.3 Эксплуатация.

8.3.1 После вскрытия индивидуальной упаковки с тест-системой анализ должен быть произведен в течении 10 минут при условии соблюдения температуры (18–25°C).

8.3.2 Тест-системы при соблюдении требований данной Инструкции стабильны в течении всего срока годности.

8.3.3 Не использовать тест-системы с истекшим сроком годности. Срок годности указан на внешней стороне упаковки.

8.3.4 Не использовать тест-системы, если упаковка повреждена.

8.3.5 Тест-системы, предусматривают только однократное применение. Не использовать повторно.

8.3.6 Необходимо предохранять тест-системы от повышенной влажности и воздействия прямых солнечных лучей. Следует избегать попадания прямых солнечных лучей на цветовую(ые) шкалу(ы).

8.3.7 Каждый раз после извлечения тест-системы из упаковки последний следует немедленно и плотно закрыть крышкой.

8.3.8 Тест-систему, вынутую из индивидуальной упаковки и не использованную в течение 10 минут, следует выбросить.

8.3.9 Запрещается прикасаться руками к сенсорному элементу тест-системы.

8.3.10 Неправильное обращение с тест-системой и изменение процедуры анализа могут повлиять на результаты. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению.

8.3.11 Изделия и/или компоненты тест-системы ремонту и техническому обслуживанию не подлежат.

8.4 Утилизация.

8.4.1 Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.


8.4.2 В случае профессионального использования, утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации отходов.

8.4.3 В случае самотестирования после использования все компоненты и упаковку выбросить в мусоросборник.

Разработано:

Согласовано:

Руководитель



Какимова Ж.Х.,
к.т.н., ассоц. профессор

Проректор по науке
и инновациям



Калибеккызы Ж.,
к.б.н. ассоц. профессор

Докторант



Утегенова А.О.

Заведующая кафедрой



Какимова Ж.Х.,
к.т.н., ассоц. профессор

Дата

« 12 » 09 2022 г.

Дата

« 12 » 09 2022 г.