

О.В. Клеп, Н.Є. Стадницька, В.Г. Червецова,
З.В. Губрій, О.В. Швед

Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно-активних сполук, фармації та біотехнології

ОПТИМІЗАЦІЯ РЕЖИМУ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРИРОДНОЇ АСОЦІАЦІЇ “МОРСЬКИЙ ГРИБОК”

Ї Клеп О.В., Стадницька Н.Є., Червецова В.Г., Губрій З.В., Швед О.В., 2011

Досліджено параметри культивування природної асоціації «морський грибок» для підвищення біологічної активності культуральної рідини, що може бути використана як функціональний напій.

Ключові слова: культивування, мікробіологічна асоціація, культуральна рідина, функціональний напій.

Parameters of cultivation of natural association marine fungus studied for a biological activity of culture liquid, which can be used as a functional drink.

Key words: cultivation, microbiological association, culture liquid, functional drink.

Постановка проблеми. Сучасною медичною наукою встановлено, що порушення структури харчування – головний фактор, який завдає непоправної, набагато більшої, ніж екологічна забрудненість, шкоди нашому здоров'ю. Згідно з останніми даними фахівців, для повного задоволення життєвих потреб їжа людини повинна містити 600 груп макро- і мікронутрієнтів, які включають понад 20 тис. різноманітних сполук рослинного, тваринного і мікробного походження. Нині людина зі звичною змішаною дієтою не одержує й половини необхідних нутрієнтів.

Функціональні напої, як складова поняття “функціональні продукти”, – це такі напої, які, окрім відомих властивостей втамовувати спрагу, приносити насолоду тощо, приносять додаткову користь для здоров'я людини. У розвинутих країнах сектор функціональних напоїв має головне значення – це найзручніша, природна форма збагачення організму вітамінами, макро- і мікроелементами, поліфенолами.

Як складова щоденної дієти, функціональні напої беруть участь у регулюванні захисних біологічних механізмів, підвищують стійкість до захворювань, сповільнюють старіння та покращують емоційний стан людини [1].

Комплексне медико-біологічне дослідження властивостей напоїв підтвердило їх лікувально-профілактичну дію (антиоксидантну, протизапальну, імунорегульвну) та відсутність протипоказів до використання в раціоні харчування для усіх категорій населення.

Ринок функціональних напоїв в Україні поки що не сформувався [2]. Він представлений в основному енергетичними напоями. У світовій практиці «функціональними» вважаються напої, які характеризуються додатковою корисністю, тобто містять різні корисні для організму компоненти (15–20 % від добової норми). Вони проявляють підтримувальну дію. На зарубіжному ринку постійно зростає популярність функціональних напоїв. Частка сегменту функціональних напоїв у загальному обсязі ринку біологічно активних напоїв (БАН) у західних країнах близько 5 %, хоча середньорічні темпи росту досягають 20 %.

Науково-теоретичні та медико-біологічні аспекти використання мікроорганізмів у ферментованих напоях досліджують як дієтологи і харчовики, так і біотехнологи, що є достатньо складним через багатокомпонентність природної сировини та природної мікробіоти, що здатна перетворити сировину на функціональний корисний ферментований напій (молочний, оцтовий, чайний, сахарозний, глюкофруктозний тощо).

Мета роботи. Вивчити морфологічні властивості мікробної асоціації «морський грибок», дослідити динаміку росту асоціації в різних умовах культивування, визначити оптимальні умови культивування мікробної асоціації «морський грибок»

Аналіз досліджень та публікацій. Мікробна асоціація «морський рисовий грибок» використовується на побутовому рівні для одержання смачного і корисного ферментованого напою типу квас [3].

Використання у виробництві квасу пророслого зерна, присутність у готовому напої корисних мікроорганізмів та вміст широкого спектра біологічно-активних речовин може поставити його в число найбільш біологічно повноцінних харчових продуктів. Однак, враховуючи принципи нешкідливості харчових продуктів і те, що значна частина квасу виробляється з використанням пресованих хлібопекарських дріжджів, що містять контамінантну мікрофлору (часто патогенні види дріжджів роду *Candida*, бактерії родів *Pseudomonas* і *Bacillus*, бактерії кишкової групи), напій являє собою розбалансований за складом харчовий продукт. Використання на деяких заводах чистих культур дріжджів і молочнокислих бактерій, внаслідок їх низької антагоністичної активності, незадовільного санітарно-гігієнічного стану виробництва, а також недостатньої вивченості біологічної дії використовуваних рас і їх метаболітів на організм людини, не виправляє недоліків.

Тому останнім часом у розвинених країнах світу проводяться науково-дослідні роботи з розроблення напоїв з високою біологічною цінністю, технологія яких передбачає використання спеціально колекціонованих культур мікроорганізмів. Чайний гриб, тибетський гриб, «морський рис» – мікробіоти, які впродовж тисячоліть використовують люди для приготування нетрадиційних настоїв, що мають не лише хороший смак, але і лікувальні властивості [4–6].

Індійський «морський рис» – це культура мікроорганізмів, яка складається з різних видів дріжджів і оцтовокислих бактерій, має вигляд сірувато-білих різних за формою та величиною крупинок, які дещо нагадують рисові зерна, які під час ферментації дають напій, настій чи гель, який утворюється за певних умов, збільшуючись за розмірами крупинок та за масою. За переконанням багатьох дослідників наявність в настій індійського гриба фолієвої кислоти, ферментів, коензиму Q, наявність глюконової, п-кумарової, оцтової, щавлевої, лимонної, молочної кислоти, а також вітамінів C, D матиме велике значення в уповільненні старіння організму та для вітамінотерапії; у складі настою можуть бути також дубильні речовини, полісахариди, альдегіди, холін, жири і смолянисті речовини, алкалоїди, глюкозиди, що потребує ретельного дослідження впливу на характеристики напою складу вихідного розчину, умов ферментації та складу консорціуму мікробіоти. Лікувальні властивості настою індійського гриба довів у клінічних умовах лікар Т. Громак. Настій гриба є біологічно активною харчовою добавкою (БАД), що допомагає лікувати низку захворювань.

Проте виготовлення в деяких країнах світу (Корея, Китай) традиційних національних напоїв шляхом «самозброджування» різної рослинної чи підсолодженої сировини внаслідок неконтрольованості збудників бродіння може нести небезпеку здоров'ю споживача. Тому при виробництві ферментованих напоїв особливу увагу треба приділяти використанню безпечних культур мікроорганізмів, незалежно від того, використовується монокультура чи асоціація мікроорганізмів. Причому підбір і виділення нових штамів, що мають антагоністичні властивості стосовно супутньої мікрофлори, дозволить надати напоєм антибіотичних і бактеріостатичних властивостей.

Методи досліджень. Мікроскопування проводили за допомогою світлопольного тринокулярного мікроскопа MBL2100 («Kruss», Німеччина) при збільшенні 20x100.

Для визначення цукристих речовин використовували метод, оснований на відновленні міді з розчину Фелінга цукристими речовинами, що містяться в культуральній рідині і на кількісному визначенні міді йодометричним методом.

Визначення інвертного цукру проводили за методом Офнера (розчин редуруючої речовини містить CuSO_4 , сегнетову сіль, соду для зменшення концентрації йонів OH^- і запобігання

окисненню сахарози, сегнетова сіль не відновлює мідь (II), відновлення редуруючих речовин відбувається дещо повільніше).

Розміри клітин визначали під мікроскопом за допомогою окулярної лінійки (мікромметра) або окулярного гвинтового мікромметра .

Препарати для мікроскопування готували фіксованим фарбуванням.

Вміст вологи в біоті та приріст біомаси культури визначали ваговим методом.

Кислотність досліджуваного напою (°T) та загальний білок в напої (%) визначали методом об'ємного титрування лугом в присутності індикатора та зміни забарвлення паралельних проб.

Величину світлопропускання визначали методом фотоколориметрії.

Кількість етанолу, що утворився під час бродіння, визначали оксидиметричним методом, який базується на окиснюванні етилового спирту до оцтової кислоти і води сумішшю біхромату калію із сірчаною кислотою:



По закінченні окислення спирту надлишок біхромату відтитровували розчином солі Мора:



По кількості біхромату, витраченого на окиснення, обчислювали концентрацію спирту (найточніші результати метод дає при вмісті спирту в рідині в межах 1–2 %, тому при більш високих концентраціях спирту розбавляли культуральну рідину, а при менших – розчини солі Мора і біхромату).

Основні результати досліджень. Характеристика посівного матеріалу. Грибок своєю структурою нагадує розварені рисові зерна, від чого і походить одна з народних назв консорціуму «морський рис». Біомаса є білого кольору, майже прозора, може набувати забарвлення різних відтінків фіолетового і червоного кольору, в залежності від сорту родзинок, які використовуються при приготуванні поживного середовища. Розміри «рисинок» від 0,2 до 1,5 см в залежності від віку культури. Консистенція «рисинок» є досить рихлою, при натисканні розламується на менші частинки (рис. 1).

В результаті проведених досліджень було встановлено, що вміст вологи в тілі гриба становить від 84 до 88 %.



Рис. 1. Зовнішній вигляд консорціуму «морський грибок»

Дослідження морфологічного складу мікробної асоціації «морський грибок»

В результаті мікроскопування препарату з відбитку тіла гриба було виділено п'ять видів клітин:

- невеликі дріжджові клітини з діаметром клітини 1–2 мкм (рис. 2, а);
- великі дріжджові клітини з діаметром 6–8 мкм (рис. 2, б);
- паличкоподібні клітини довжиною до 6–8 мкм (рис. 2, в);

- коки з розмірами клітини до 0,2 мкм (рис. 2, з);
- паличкоподібні клітини довжиною до 1,5 мкм (рис. 2, д).

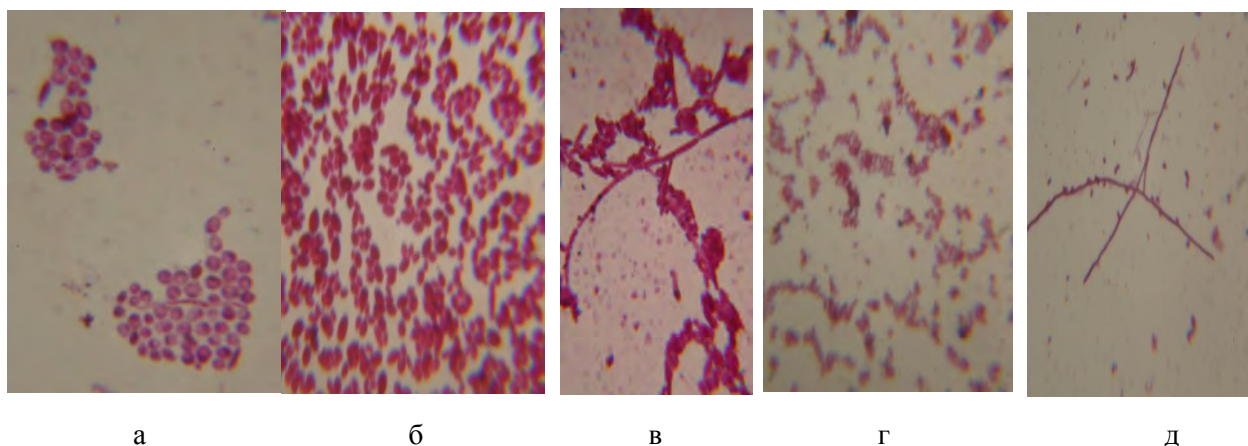


Рис. 2. Мікроскопічний вигляд клітин мікробіоти

Для встановлення видової належності виділених штамів мікроорганізмів було здійснено пересів на селективні середовища, які дозволили ідентифікувати окремих представників.

Вивчення мікробіоти «морський грибок» проводили за таких умов:

- як посівний матеріал використовували гомогенізовану суспензію з біомаси, отриманої в результаті культивування асоціації. Клітинне навантаження – 10^6 клітин в 1 мл суспензії. Гомогенізація досягалась за рахунок розтирання 1 г тіла гриба з подрібненим склом (розміри крупинок скла від 10 до 50 мкм) у стерильній ступці;
- використовували тверді поживні середовища – сусло-агар з додаванням карбонату кальцію, середовище Чапека, середовище для оцтовокислих бактерій;
- мікроскопування і зовнішній огляд колоній проводили через 24 і 48 год.

Таблиця 1

Середовища для дослідження морфології клітин асоціації «морський грибок»

№ з/п	Середовище	Температура	Кількість колоній
1	Середовище Чапека	28	12
2	Середовище для оцтовокислих	35	15
3	Пивне сусло з карбонатом кальцію	35	23

В результаті культивування на цих середовищах було виявлено, що асоціація складається з двох видів дріжджів і трьох видів бактерій.

Один тип дріжджових клітин (1 добова культура на середовищі Чапека) формує білі, глянцеві, непрозорі, круглі колонії з лінзоподібним профілем, рівним краєм, діаметром 4–6 мм, на 48 годину – до 12 мм (рис. 3).

На фарбованих мазках – це овальні клітини розміром 1×2 мкм, здатні до брунькування. За попередньою ідентифікацією ця культура віднесена до роду *Saccharomyces* (рис. 2, б).

Клітини другого типу формували білі, матові, круглі колонії з хвилястим краєм, кнопкоподібною поверхнею, діаметром 4–8 мм (рис. 4).

На фарбованих мазках вони мали круглу та ледь овальну форму, здатні до брунькування, розміром 6–8 мкм в діаметрі (рис. 2, а). Видова належність культури остаточно не встановлена.



Рис. 3. Висів дріжджових клітин – круглі лінзоподібні колонії

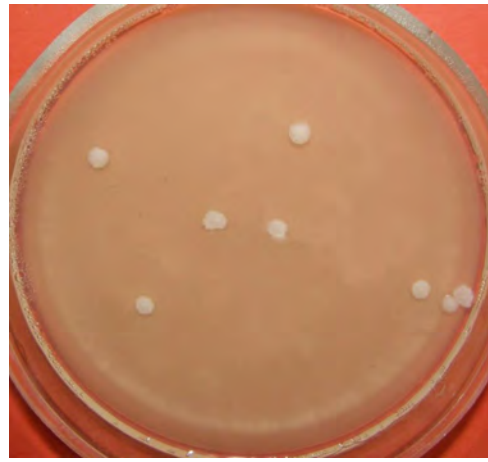


Рис. 4. Висів дріжджових клітин – овальні приплющені колонії

Серед бактеріальних культур виділено два види молочнокислих та один вид оцтовокислих мікроорганізмів.



Рис. 5. Висів бактеріальних клітин – круглі та точкові колонії (молочнокислі)

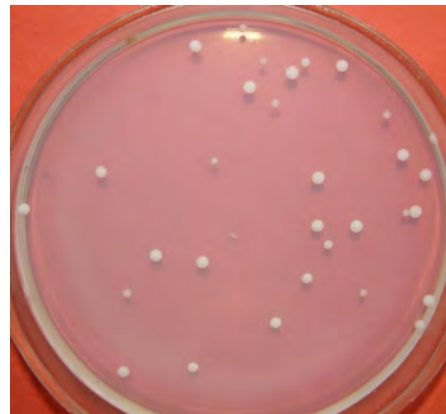


Рис. 6. Висів бактеріальних клітин – круглі колонії (оцтовокислі)

Бактеріальні клітини формують прозорі точкові колонії діаметром 1–2 мм на селективному середовищі з CaCO_3 , навколо яких утворюються прозорі зони (рис. 5), що свідчить про продукування культурою кислоти. Це палички, розміром до 1,5 мкм (рис. 2, д), які за попередньою ідентифікацією віднесені до роду *Lactobacillus*.

Другий тип клітин формує білі, непрозорі, матові круглі колонії, діаметром приблизно 3–5 мм. Клітини мають форму коків з діаметром до 0,5 мкм (рис. 2, г), остаточна ідентифікація ще не проведена.

Третій тип клітин формує білі, непрозорі, матові круглі колонії, діаметром приблизно 1–3 мм (рис. 6). Клітини мають форму довгих паличок довжиною 6–8 мкм (рис. 2, в). За попередньою ідентифікацією віднесені до роду *Acetobacter*, оскільки ростуть на селективному поживному середовищі, в якому як джерело вуглецю виступає лише етиловий спирт.

Для культивування мікробної асоціації «морський грибок» як живильне середовище використовували:

- 2,5–3 %-й розчин цукру з родзинками з винограду киш-миш;
- 2,5–3 %-й розчин цукру з родзинками з темних сортів винограду;
- 2,5–3 %-й розчин цукру з родзинками з червоних сортів винограду.

Культивуючи консорціум на цих середовищах, одержані такі характеристики цього напою:

Таблиця 2

Результати культивування консорціуму на різних поживних середовищах

Середовище	Візуальна характеристика напою	Смакові якості напою	Час зброджування, год
розчин цукру з родзинками з винограду киш-миш	безколірний	Відчувається неприємний запах бродіння, смак неприємний	24–30
розчин цукру з родзинками з темних сортів винограду	легкий фіолетовий відтінок	Запах бродіння менш виразний, приємний освіжаючий смак	24–30
розчин цукру з родзинками з червоних сортів винограду	легкий червоний відтінок	Запах бродіння такий як і в попередньому, смак дещо кисліший	24–30

Середовище на основі родзинок темних сортів винограду за органолептичними показниками є найоптимальнішим і тому обране нами для подальшого дослідження.

Гриб після кожного циклу промивали під проточною водою, надлишок відділяли, і повторювали цикл. Кількість посівного матеріалу, що береться для посіву становила 4–10 % від маси настою, який додають, оскільки при меншій концентрації час зброджування значно збільшується, що підвищує імовірність зараження сторонньою мікрофлорою, а концентрації більше 10 % економічно не вигідні.

Культивування мікробіоти на цукровмісному середовищі дало можливість одержати напій світлофіолетового забарвлення, з приємним ароматом та освіжаючим смаком, що характеризується параметрами, наведеними в табл. 3.

Таблиця 3

Властивості ферментованого напою мікробіоти «морський рис»

№ з/п	Температура культивування, °С	Тривалість ферментації, год	Величина світлопропускання, %	pH розчину	Вміст спирту, %	Конверсія цукру, %	Кислотність, °Т
1	22	30	93	3,6	<0,5	28	37
2	26	24	93	3,7	<0,5	31	36
3	30	16	94	3,7	<0,5	32	37

За органолептичними характеристиками найкращим виявився продукт, одержаний культивуванням при температурі 26 °С, хоча при цій температурі час культивування більший, ніж при 30 °С. В результаті проведених дослідів були встановлені такі фізико-хімічні показники напою: кислотність 35–40 °Т, вміст цукру 1–1,5 %, рН в межах 3,6–3,7.

Висновки. Встановлено, що природна асоціація „морський грибок” складається з п’яти типів мікроорганізмів, які за попередньою ідентифікацією, належать до оцтовокислих і двох видів молочнокислих бактерій та до двох видів дріжджів.

Нами були визначені оптимальні технологічні умови культивування асоціації та отримання функціонального напою: оптимальна температура отримання напою становить 26 °С; кількість внесеного посівного матеріалу – 5 %; поживне середовище на основі темних сортів родзинок; концентрація цукру в середовищі – 2,5–3 %.

1. Домарецький В.А., Прибильський В.Л., Михайлов М.Г. *Технологія екстрактів, концентратів і напоїв із рослинної сировини*. Вінниця: Нова Книга, 2005.– 408 с. 2. Новіков В.П., Сидоров Ю.І., Швед О.В. *Тенденції розвитку комерційної біотехнології // Вісник НАН України*. – 2008. – № 2. – С. 25–39. 3. Клеп О.В., Клеп О.В., Червецова В.Г., Стадницька Н.С., Губрій З.В., Швед О.В. *Оптимізація біотехнології функціональних напоїв «чайного гриба» та «морського гриба» // Нац.*

Конф. з Між народ. Уч. «Аналітичні проблеми синтезу і створення нових біологічно активних та фармпрепаратів». – Львів: НУ ЛП, 2008. – С. 237. 4. Вічко О.І., Щеглова Н.С., Червецова В.Г., Губрій З.В., Швед О.В., Новіков В.П. Дослідження морфології мікробної асоціації «тибетський грибок» // Вісник Нац. ун-ту «Львівська політехніка». – 2007. – № 580: Хімія, технологія речовин та їх застосування. – С. 125–127. 5. Вічко О.І., Щеглова Н.С., Червецова В.Г., Губрій З.В., Швед О.В., Новіков В.П. Дослідження мікробіоти «тибетський грибок» для розроблення функціонального композиційного мікробного препарату // Науковий вісник Ужгородського університету. – 2008. – № 24. – С. 114–116. 6. Клеп О.В., Червецова В.Г., Губрій З.В., Швед О.В., Новіков В.П. Морфолого-фізіологічні характеристики природної асоціації «чайний грибок» // Вісник Нац. ун-ту «Львівська політехніка». – 2010. – № 667: Хімія, технологія речовин та їх застосування. – С. 176–181.

УДК 54.567+547.333.2

О.М. Фігурка, І.Р. Бучкевич, М.О. Платонов,
М.В. Стасевич, Р.Я. Мусянович, В.П. Новіков
Національний університет «Львівська політехніка»,
кафедра технології біологічно-активних сполук, фармації та біотехнології

СИНТЕЗ І ВЛАСТИВОСТІ АЦИЛІЗОТІОЦАНАТНИХ ПОХІДНИХ 1,4-НАФТОХІНОНУ

© Фігурка О.М., Бучкевич І.Р., Платонов М.О., Стасевич М.В., Мусянович Р.Я., Новіков В.П., 2011

Синтезовано нові ацилізотіоціанати та тіосечовини на основі амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону. Проведено попередній біологічний скринінг за допомогою програми PASS, одержані результати вказують на доцільність подальших досліджень.

Ключові слова: ацилізотіоціанати та тіосечовини, біологічний скринінг, програма PASS.

New acylisothiocyanates and thioureas on the basis of amino acid derivatives of 1,4-naphthoquinone were synthesized. For all obtained compounds was carried out prediction of pharmacological effects by PASS, these results indicate feasibility of further research.

Key words: acylisothiocyanati and tiosechevini, biological skринing, program PASS.

Постановка проблеми і її зв'язок з важливими науковими завданнями. Впродовж багатьох років досліджуються і описані у багатьох наукових працях сполуки на основі похідних 1,4-нафтохінону, котрі проявляють бактеріостатичну, бактерицидну [1–3], фунгіцидну [4, 5] активність, також вони можуть використовуватись також як інсектициди [6, 7]. Було виявлено, що існують похідні 1,4-нафтохінону, котрі проявляють протиракову, противірусну [8], протитуберкульозну [9], антибіотичну [10], антималярійну дію [11], можуть застосовуватись як фармакологічні препарати для лікування респіраторних захворювань [12].

У той же час, не досліджено синтез ацилізотіоціанатів 1,4-нафтохінону та їх похідних. Для досягнення поставленої мети попередньо було отримано взаємодією амінокислотні похідні 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону за відомими методиками [1] які взаємодією з роданідами були перетворені до ацилізотіоціанатів.

Мета. Одержання нових біологічно активних сполук шляхом поєднання корисних властивостей амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону та ізотіоціанатної групи, синтез на основі одержаних сполук деяких відповідних тіосечовин та гетероциклів.