

БІОТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

УДК 663.12/14

Н.І. Воробець, О.І. Вічко, В.Г. Червецова, Н.С. Щеглова, В.П. Новіков
Національний університет "Львівська політехніка",
кафедра біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

ПРИРОДНА АСОЦІАЦІЯ „ТИБЕТСЬКИЙ ГРИБОК” ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ ПРОМИСЛОВИЙ ПРОДУЦЕНТ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО МОЛОЧНОКИСЛОГО НАПОЮ

© Воробець Н.І., Вічко О.І., Червецова В.Г., Щеглова Н.С., Новіков В.П., 2008

Запропоновано оптимальні умови культивування природної асоціації "тибетський грибок" з метою отримання функціонального напою. Вивчено антибіотичну стійкість асоціації та антимікробні властивості напою, отриманого внаслідок культивування вищезгаданої асоціації. Досліджено мікробний склад природної асоціації "тибетський грибок".

Optimal cultivation terms of "tibet's fungi" were offered in order to get the functional drink. Antibiotic firmness and antibacterial properties of the drink were studied, which was received in the result of cultivation of this association. Bacterial composition of natural association "tibet's fungi" was investigated.

Постановка проблеми та її зв'язок з важливими науковими питаннями. Протягом останніх років в Україні і в світі активно розробляються нові види кисломолочних продуктів, які мали б позитивний, оздоровлювальний вплив на організм людини. Сьогодні кисломолочні біопродукти мають багатокомпонентний склад та задані функціональні властивості. Виробництво таких продуктів ґрунтується на вдосконаленні біотехнологічних процесів і зводиться, з одного боку, до використання традиційних для молочної промисловості штамів молочнокислих бактерій, а з іншого, – до створення нового покоління кисломолочних продуктів з використанням нових видів мікроорганізмів, що мають пробіотичні властивості. Остання група є найперспективнішою на міжнародному ринку [1].

В Україні існує багаторічний досвід побутового використання нетрадиційних збудників молочнокислого бродіння для отримання функціональних напоїв. Ці обставини спонукають до обґрунтованого вивчення природних асоціацій нетрадиційних заквасок і оптимізації процесу виробництва пробіотичних напоїв на основі промислово перспективних композицій мікроорганізмів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Вважається, що напій, отриманий внаслідок сквашування молока так званим "тибетським грибком", має цінні поживні та пробіотичні властивості, позитивно впливає на організм людини. Проте ці спостереження є суб'єктивними і наукові дослідження властивостей вищезгаданого напою не проводились, про що свідчить відсутність відповідних даних у науковій літературі. Також немає даних про впровадження технології виготовлення зазначеного напою у промислове виробництво.

Існує окрема інформація про мікробний склад асоціації „тибетський грибок”, проте вона недостатньо повна і в різних літературних джерелах подано розбіжні дані про кількісний і якісний склад мікрофлори в природній композиції "тибетський грибок" та отриманому напої [2, 3].

Мета роботи – дослідити антибіотичну стійкість асоціації "тибетський грибок" та анти-мікробні властивості кисломолочного продукту. Вивчити склад мікробіоти природної асоціації та функціонального напою, визначити оптимальні умови отримання цього пробіотичного продукту.

Об'єкти і методи досліджень. Мікробна асоціація "тибетський грибок" використовується на побутовому рівні для отримання смачного і корисного кисломолочного напою. Грибок має вигляд грудок білого кольору, без специфічного запаху, розміром від 3–6 мм (молодий грибок) до 5–6 см в діаметрі (грибок перед поділом), які у воді осідають на дно ємкості. Грудки складаються з округлих або овальних сироподібних гранул розміром 3–10 мм, з неоднорідною поверхнею (рис. 1).

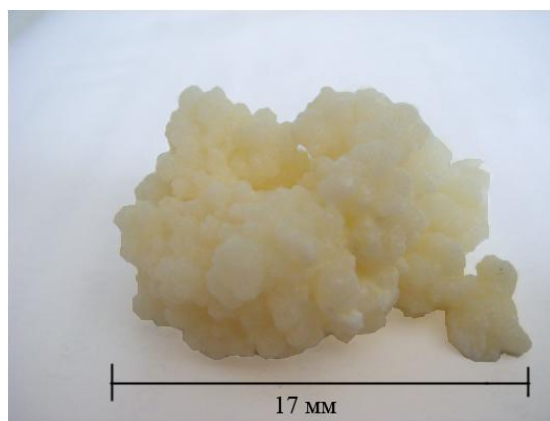


Рис. 1. Грудка "тибетського грибка"

Для отримання кисломолочного напою в стерильне молоко жирністю 2,5 % вносили 5 % посівного матеріалу і культивували до кінцевої кислотності середовища 85–120 °Т. Перед кожним пасажем біомасу відмивали в стерильному фізіологічному розчині. Кислотність продукту визначали за загальноприйнятою методикою [4].

Виділення мікроорганізмів, що входять до складу досліджуваної асоціації та культуральної рідини (функціонального напою), проводили на таких агаризованих середовищах: MRS [5], пивне сусло (6 °В), пивне сусло з крейдою, пивне сусло з етанолом [6], дріжджова вода з 3 %-м вмістом етанолу, середовище Сабуро [7], GYP, MYP [8].

Перед посівом біомасу гомогенізували у стерильному фізіологічному розчині. Подальші маніпуляції проводили згідно зі стандартними методиками [9]. Культивування здійснювали за температур 22 та 37 °С протягом 72 та 6 год відповідно.

Первинну ідентифікацію виділених культур проводили за допомогою тринокулярного світлопольного мікроскопа MBL2100 ("Kruss", Німеччина) за збільшення 20x100.

Антибіотичну стійкість та антимікробну активність функціонального напою вивчали на агаризованому пивному суслі після інкубаційного періоду 3 доби за оптимальної для кожної культури температури.

Для вивчення антибіотичної стійкості використовували стандартні диски з антибіотиками: ванкоміцином, левоміцетином, ристаміцином, оксациліном, ліндоміцином, канаміцином, ріфампіцином, ністатином, стрептоміцином, бензилпеніциліном.

Антимікробну активність напою вивчали методом лунок на тестових видах мікроорганізмів: *Escherichia coli*, *Bacillus mesentericus*, *Mycobacterium luteum*, *Proteus vulgaris*, *Aspergillus niger*.

Для оцінки результатів досліджень використовували такі критерії:

- відсутність зон затримки росту оцінювали як нечутливість мікроорганізмів до внесеного у лунку напою (стійкість мікробіоти напою до цього антибіотика);
- зони затримки росту діаметром близько 16 мм оцінювали як малу чутливість;

- зони затримки росту діаметром 17–25 мм визначали як показник середньої чутливості;
- зони затримки росту, діаметр яких перевищував 25 мм, свідчили про високу чутливість.

Обговорення результатів. У побутових умовах функціональний кисломолочний продукт можна отримати через 48 – 72 год. культивування природної асоціації "тибетський грибок" у молоці за кімнатної температури (18–22 °С). Впровадження виготовлення напою за такою схемою в промислове виробництво є технологічно і економічно не вигідним. Виявлено, що за 72 год культивування при 22°C кислотність досліджуваного напою становила 87 °Т, кількість бактеріальних клітин в 1 мл продукту – 4×10^5 , дріжджових клітин – 7×10^3 . Приріст біомаси при цьому становив 10 – 12 %. Досліджено, що за збільшення температури до 37 °С час культивування зменшувався до 6 год. При цьому кислотність становила 85 °Т, приріст біомаси – менше 1 %. Мікробний склад напою практично не змінювався: кількість бактеріальних клітин в 1 мл продукту – 1×10^7 , дріжджових клітин – 9×10^4 . Органолептичні показники напою відповідали споживчим вимогам.

Для вдосконалення умов проведення технологічного процесу отримання функціонального напою була досліджена оптимальна кількість посівного матеріалу. Показано, що культура, внесена в кількості 5–10 % (мас/об) за 6 год за температури 37 °С, зброджувала молоко до кислотності 85–110 °Т.

Проведені дослідження показали, що мікробна асоціація "тибетський грибок" складається з двох видів дріжджів та трьох видів бактеріальних клітин.

Один тип дріжджових клітин (тридобова культура на сусло-агарі) формує білі, матові, непрозорі, круглі колонії з лінзоподібним профілем, рівним краєм, діаметром 2–4 мм. На фарбованих мазках – це овальні клітини розміром 0,5–1х3–5 мкм, здатні до брунькування. За попередньою ідентифікацією ця культура віднесена до роду *Saccharomyces* (рис. 2).

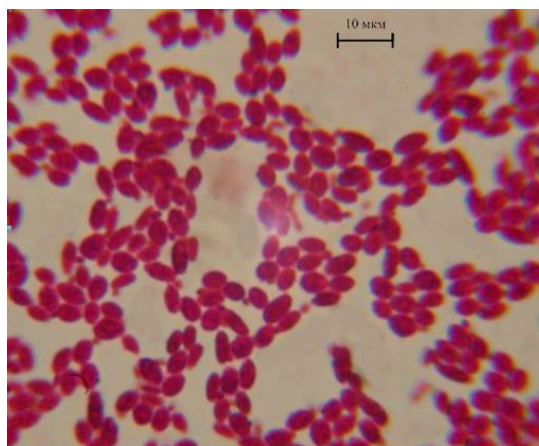


Рис. 2. Дріжджові клітини роду *Saccharomyces*

Клітини другого типу формували білі, глянцеві, круглі колонії з хвилястим краєм, кнопкоподібною поверхнею, діаметром 5–7 мм. На фарбованих мазках вони мали круглу та ледь овальну форму, здатні до брунькування, розміром 2–5 мкм в діаметрі (рис. 3). Видова належність культури остаточно не встановлена.

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

Один тип бактеріальних клітин формує прозорі точкові колонії діаметром, меншим за 1 мм, на селективному середовищі з CaCO_3 , навколо яких утворюються прозорі зони, що свідчить про продукування культурою кислоти. Це грам-позитивні, ледь подовжені палички розміром 0,5х1 мкм, що розташовуються парно (рис. 4), які за попередньою ідентифікацією віднесені до роду *Lactobacillus*.

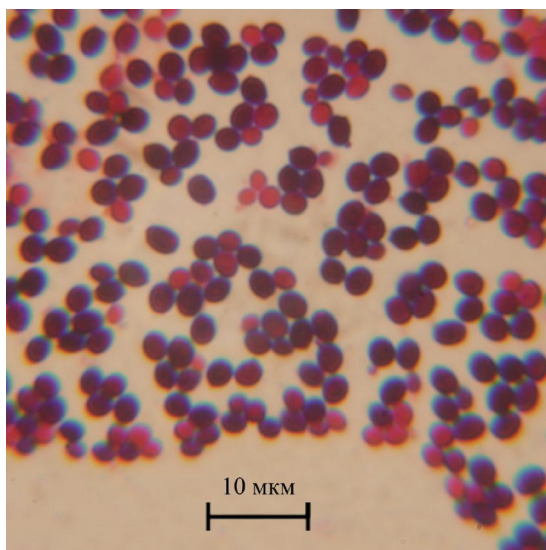
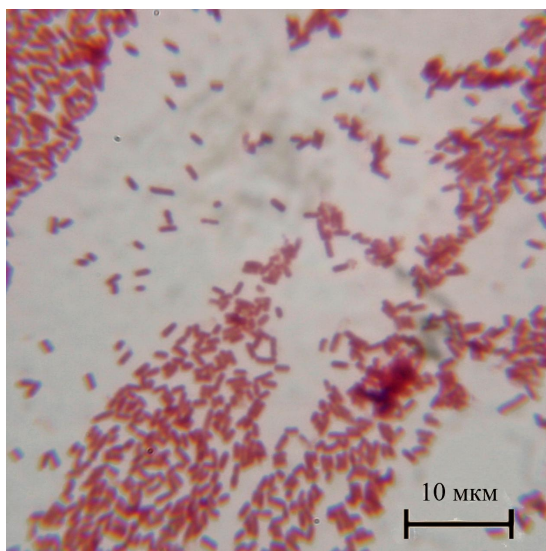
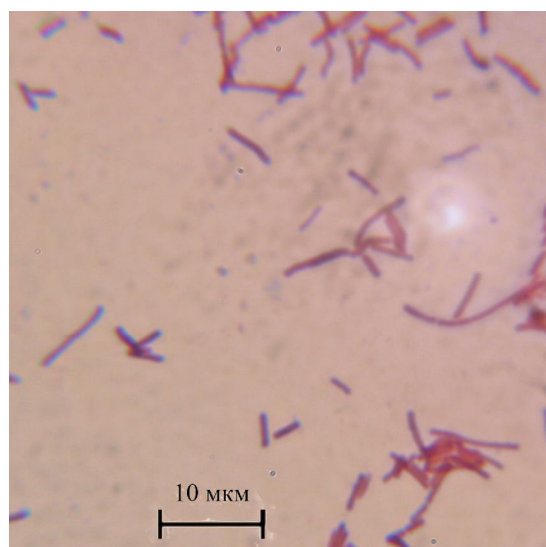


Рис. 3. Дріжджові клітини невизначеного типу



*Рис. 4. Бактеріальні клітини роду *Lactobacillus* першого типу*



*Рис. 5. Бактеріальні клітини роду *Lactobacillus* другого типу*

Другий тип клітин формує білі, непрозорі, матові круглі колонії діаметром приблизно 1 мм, на середовищі з CaCO₃ утворюються просвіти. Клітини мають форму довгих паличок (0,5x5–15 мкм), здатних формувати ланцюжки та зафарбовуватись за Граммом (рис. 5). За попередньою ідентифікацією віднесені до роду *Lactobacillus*. Внаслідок культивування посівного матеріалу на селективних твердих середовищах для оцтовокислих бактерій спостерігали формування точкових прозорих колоній розміром, меншим за 1 мм. Виділені мікроорганізми були паличкоподібною форми розміром 0,5–1 мкм, за Граммом не фарбувались (рис. 6).

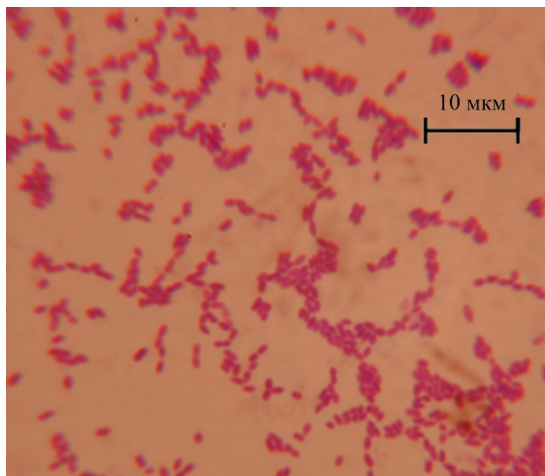


Рис. 6. Оцтовокислі бактеріальні клітини

Таблиця 1

**Антимікробна активність напою, одержаного
внаслідок культивування "тибетського грибка"**

№ з/п	Досліджувана культура мікроорганізму	Діаметр лунки, мм	Середній діаметр зони затримки росту, мм	Чутливість мікроорганізму до напою
1	<i>Escherichia coli</i>	9	16	мала чутливість
2	<i>Bacillus mesentericus</i>	9	23	середня чутливість
3	<i>Mycobacterium luteum</i>	9	25	середня чутливість
4	<i>Proteus vulgaris</i>	9	28	висока чутливість
5	<i>Aspergillus niger</i>	9	21	середня чутливість

Таблиця 2

**Антибіотична стійкість бактеріальних клітин, що входять
до складу мікробної асоціації "тибетський грибок"**

№ з/п	Досліджуваний антибіотик	Діаметр диска, мм	Середній діаметр зони затримки росту, мм	Чутливість мікроорганізму до антибіотика
1	Ванкоміцин	5	0	відсутня чутливість
2	Левоміцитин	5	20	середня чутливість
3	Ристаміцин	5	0	відсутня чутливість
4	Оксацилін	5	20	середня чутливість
5	Ліндоміцин	5	20	середня чутливість
6	Канаміцин	5	10	невелика чутливість
7	Стрептоміцин	5	18	середня чутливість
8	Бензилпеніцилін	5	0	відсутня чутливість

Проведені дослідження показали, що функціональний напій, одержаний внаслідок культивування "тибетського грибка", проявляє певну антибактеріальну та протигрибкову активність. Як тестові культури були використані бактерії *Bacillus mesentericus*, *Mycobacterium luteum*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* та мікроміцет *Aspergillus niger*.

Результати досліджень наведено в табл. 1.

Вивчення антибіотичної стійкості асоціації "тибетський грибок" показало, що фунгіцидну дію на дріжджові клітини проявив ністатин, при цьому середній діаметр зони затримки росту становив 23 мм.

Результати досліджень антибіотичної стійкості бактеріальних клітин, які входять до складу досліджуваної асоціації, наведені в табл. 2.

Висновок. Досліджено склад природної асоціації "тибетський грибок". Виявлено, що до її складу входить щонайменше два види дріжджів, один з яких віднесений нами до роду *Saccharomyces*, та трьох видів бактерій, два з яких становлять молочнокислі паличкоподібні бактерії роду *Lactobacillus*, а один – оцтовокислі бактерії. Вивчення пробіотичних властивостей напою на основі "тибетського грибка" довело його функціональність та активну антимікробну дію. Невисока чутливість мікробіоти напою до досліджуваних антибіотиків дає можливість застосовувати його для нормалізації мікрофлори кишківника людини під час лікування антибіотиками. Отримані результати дають змогу зробити висновки про перспективність використання цього продукту з лікувально-профілактичною метою.

1. Чагаровский В.П., Жолкевская И.Г. Биотехнология получения биоогуртов и биокефира, изучение их влияния на здоровье человека // *Мікробіол. журн.* – 2003. – Т.65, №6 – С. 67–73.
2. Елинов Н.П., Ларина О.Г. Микробиота природной ассоциации "Тибетский рис" // *Проблемы медицинской микологии.* – 1999. – Т. 1, № 1 – С.51–56.
3. Вічко О.І., Щеглова Н.С., Червецова В.Г., Губрій З.В., Швед О.В., Новіков В.П. Дослідження морфології мікробної асоціації "Тибетського грибка" // *Вісник Національного університету "Львівська політехніка" "Хімія, технологія речовин та їх застосування"*. – 2007. – № 590. – С. 125–127.
4. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу "Биотехнология виробництва цільномолочних продуктів та сирів" для студентів спеціальності 7.092902 "Биотехнология біологічно активних речовин" / Упор.: Р. Петріна, О. Іськів, Л. Слесарчук, В. Новіков. – Львів, 2003. – 45 с.
5. Квасников Е.И., Несторенко О.П. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1975. – 388 с.
6. Большой практикум по микробиологии // Под ред. проф. Г.Л. Селибера. – М.: Высш. шк., 1962. – 492 с.
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования // Под ред. М.О. Гиргера. – М.: Медицина, 1973. – 456 с.
8. Методы общей бактериологии // Пер. с англ.; Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1983. – 583 с.
9. Практикум по микробиологии // Под ред. И.С. Егорова. – М.: Узд. МГУ, 1986. – 278 с.