

Висновки. Математично вираховано, що для зниження токсичності і підвищення безпечності, БАД чемерника слід корегувати пребіотичними харчовими волокнами та пробіотиками, за рахунок чого зменшиться вміст порошку кореневищ з корінням чемерника до 2 %.

1. *Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия: Учебн. пособие / Под. ред. Г.П. Яковлева. – СПб.: СпецЛит, 2006. – 845 с.* 2. *Основы органической химии пищевых, кормовых и биологически активных добавок / А.Т. Солдатенко и др: Учеб. пособие. – М.: Химия, 2006. – 278 с.* 3. *Турова А.Д., Сапожникова Э.Н. Лекарственные растения СССР и их применение. – 4-е изд., стереотип. – М.: Медицина, 1984. – 304 с.* 4. *Науковий вісник “Лісове та садово-паркове господарство” Національного лісотехнічного університету України // Зб. н-т праць. – 2008. – Вип. 18.7. – С. 69–72.* 5. *Коротченко В.В., Бідніченко Ю.І. Порівняльний аналіз вмісту корельборину-П у підземних та наземних органах рослин роду HELLEBORUS L.*

УДК 663.577

О.В. Клеп, В.Г. Червецова, З.В. Губрій, О.В. Швед, В.П. Новіков
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

МОРФОЛОГО-ФІЗІОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИРОДНОЇ АСОЦІАЦІЇ «ЧАЙНИЙ ГРИБОК»

© Клеп О.В., Червецова В.Г., Губрій З.В., Швед О.В., Новіков В.П., 2010

З метою інтенсифікації параметрів культивування природної асоціації «чайний грибок» досліджено його морфологію, вплив температури та складу середовища на якість ферментованого напою типу чайний квас.

In order to intensify biotechnological parameters of cultivation of natural association “tea fungus” its morphology, the influence of temperature, composition of the cultural medium on the quality of fermented drink were investigated.

Постановка проблеми. Асортимент безалкогольних напоїв у розвинених країнах світу представлений доволі широко: від напоїв типу кола, пепсі, оранж – до натуральних фруктових і овочевих соків, проте їх основу переважно становлять концентровані соки, есенції, мінеральні води, штучні композиції [1].

Тенденції виробництва ферментованих функціональних напоїв протягом останніх років і в Україні, і в світі скеровуються до розробок нових видів функціональних напоїв, які мали б позитивні характеристики та оздоровлювальний вплив на організм людини [2, 3], а саме:

- смаково-ароматичні;
- освіжаючі;
- поживні з мікроелементами;
- лікувально-профілактичні.

Сьогодні активно розробляються нові функціональні напої на різних основах:

- хімічно одержані розчини чи суспензійні напої, які містять синтетичні вітаміни;
- зброжені соки та кваси на основі натуральних компонентів;
- енергетичні напої;
- еубіотичні напої з корисними мікроорганізмами шлунково-кишкового тракту.

Одним з перспективних напрямків є одержання функціональних напоїв на основі натуральної сировини і природних асоціацій мікроорганізмів.

Науково-теоретичні та медико-біологічні аспекти використання мікроорганізмів у ферментованих напоях є предметом багатьох сучасних досліджень [4]. Велика увага приділяється створенню збалансованих за складом харчових продуктів, безпечних та корисних для здоров'я.

Виробництво таких продуктів, що мають багатокomпонентний склад та задані функціональні властивості, ґрунтується на вдосконаленні біотехнологічних процесів з використанням композицій мікроорганізмів, призначених для нормалізації і підтримки мікробіоценозу кишківника та утворення життєво важливих біополімерів та біорегуляторних речовин.

Серед населення України доволі популярними є безалкогольні ферментовані напої переважно на основі хлібної сировини (зокрема, хлібний квас), а також напої, отримані в домашніх умовах в результаті зброджування натуральної сировини нетрадиційними природними мікробними асоціаціями типу молочний грибок, кефірний грибок, оцтовий грибок, рисовий грибок, чайний грибок тощо [6].

Безалкогольний ферментований напій типу квасу, зокрема на основі чаю, збродженого так званим «чайним грибком», вважається смачним та корисним, має цінні поживні та пробіотичні властивості, позитивно впливає на організм людини.

Аналіз досліджень та публікацій. Нетрадиційні ферментовані напої, отримані за допомогою природних мікробіот, стали основою науково-дослідних робіт для розробки напоїв з високою біологічною цінністю. Так, у Німеччині розроблено напої на основі зернових, які залежно від призначення, можуть бути окислені, ароматизовані, підсолоджені, містити діоксид вуглецю, а також утворену при бродінні молочну кислоту.

Із ферментованих напоїв, що схожі з хлібним квасом, але відрізняються сировиною, заслуговують на увагу розроблені в США природно-газовані напої, одержані під час зброджування суслу двома культурами мікроорганізмів – дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* і *Kluveromyces lactis* та бактеріями *Lactobacillus casei* у певних співвідношеннях [4].

З інших ферментованих напоїв, розроблених за кордоном, слід відзначити плодово-ягідні соки, які збагачені α^+ -молочною кислотою, зброджені дріжджами овочі або фрукти з вмістом до 1 % мас. етанолу, молочнокислий овочевий сік для діабетиків тощо [5].

Українські дослідники багато уваги приділяють розробленню та промислового виробництва ферментованих функціональних напоїв, в результаті чого на основі консорціуму *Medusomices gisevii* V отриманий напій «ВІТАЛОН» [4].

Мета роботи – вивчити морфологічні властивості природної асоціації «чайний грибок», органолептичні та фізико-хімічні властивості функціонального напою, що в подальшому дасть можливість, визначивши оптимальні умови росту та технологічні параметри отримання напою на основі науково обґрунтованих результатів, розробити принципову схему промислового виробництва функціонального напою.

Об'єкти та методи досліджень. Об'єктом досліджень була природна асоціація «чайний грибок» та напій, одержаний в результаті її культивування.

Для визначення оптимальних органолептичних властивостей напою мікробіоту «чайний грибок» культивували у таких середовищах: запари чорного або зеленого чаю; запари суміші чорного та зеленого чаїв; запари суміші чорного, зеленого чаїв та м'яти; запари суміші чорного, зеленого чаїв, м'яти, материнки і шипшини. Для цього залежно від експерименту на 1 л киплячої води додавали 1 г чорного чаю, 3 г зеленого чаю, 0,2 г м'яти, 0,1 г материнки, 1 г шипшини і настоювали 10–15 хв. Після цього в середовище вносили 8 % харчового цукру. Після остигання розчину до 25–28 °С вносили «чайний грибок» в кількості 3–15 % мас.

Грибне тіло після кожного циклу промивали під проточною водою, у разі відшаровування нового гриба його розділяли на дві частини.

Титровану кислотність вимірювали загальноприйнятим методом [8], рН середовища визначали потенціометрично, вміст цукру – згідно з методикою [10].

Вміст вологи у біомасі визначали ваговим методом.

Визначення приросту біомаси «чайного грибка» проводили в такий спосіб: в кожному з 10 однакових пробірок вносили 14 мл стерильного поживного середовища (запару чаю і трав з цукром) і додавали 1 мл гомогенізованої біомаси. Через кожні 24 год з однієї з пробірок увесь вміст відфільтровували через фільтрувальний папір, який попередньо зважували. Фільтрувальний папір висушували в сушильній шафі до постійної маси. Маса біомаси знаходили за різницею маси чистого фільтрувального паперу і маси фільтрувального паперу після фільтрації.

Для ідентифікації мікроорганізмів, що входять до складу мікробіоти, «чайний грибок» використовували такі середовища: середовище Чапека для виявлення дріжджів, агаризоване спиртове середовище – для виявлення оцтовокислих бактерій, агаризоване пивне сусло (6^0B) з CaCO_3 – для виділення молочнокислих бактерій [8].

Перед посівом на чашки Петрі 1 г тіла гриба розтирали з подрібненим склом (розміри крупинок скла від 10 до 50 мкм) у стерильній ступці, з гомогенізованої в такий спосіб суспензії робили відповідні розведення. Засіяні чашки Петрі поміщали в термостати за температур 28 і 35 °С.

Мікроскопування фіксованих фарбованих препаратів мікроорганізмів проводили за допомогою світлопольного тринокулярного мікроскопа MBL2100 («Kruss», Німеччина) за збільшення 20x100.

Результати досліджень та їх обговорення

Визначення приросту біомаси «чайного грибка»

Внаслідок морфологічних особливостей мікробіоти «чайний грибок» біомасу визначали в усьому об'ємі середовища, де вона вирощувалась. З табл. 1 бачимо, що культура росте повільно, час подвоєння біомаси становив приблизно три доби.

Таблиця 1

Приріст біомаси мікробіоти залежно від часу культивування

№ з/п	Кількість годин, год	Маса сухої культури, г/15 мл
1	0	0
2	92.5	0.043
3	118	0.059
4	136	0.069
5	165	0.095
6	184.5	0.105
7	328.5	0.121

Дослідження морфології мікробіоти «чайного грибка» та створення на його основі ферментованого функціонального напою типу чайного квасу становить частину роботи з розроблення технології виробництва зазначеного напою.

Характеристика посівного матеріалу

Мікробіота «чайний грибок» ззовні нагадує медузу, має шарову структуру і є природною асоціацією мікроорганізмів. Забарвлення може бути різних відтінків коричневого кольору, залежно від чаю, який використовується як поживне середовище. Товщина тіла гриба залежить від його віку (рис. 1).

Вміст вологи в тілі «чайного грибка» становить від 86 до 90 %.

Згідно з попередніми даними, природна асоціація «чайний грибок» складається з кількох видів мікроорганізмів, тому був проведений посів гомогенізованої суспензії тіла грибка на різні елективні середовища (табл. 2).

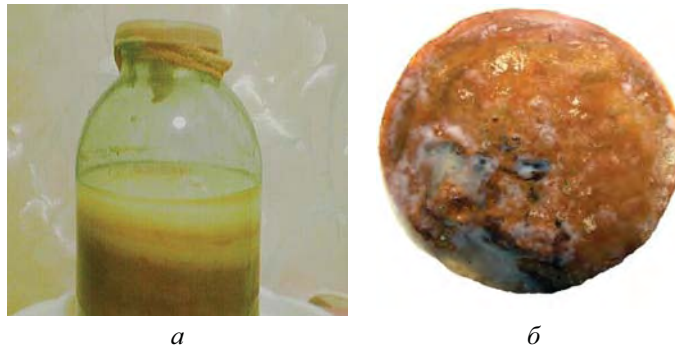


Рис. 1. Зовнішній вигляд консорціуму чайний грибок:
а – вид збоку; б – вид зверху

Таблиця 2

Визначення колоній мікробіоти «чайний грибок» на твердих живильних середовищах

№ з/п	Середовище	Температура культивування, °С	Кількість колоній
1	Середовище Чапека для дріжджів	28	4
2	Середовище спиртове для оцтовокислих бактерій	35	9
3	Середовище з пивного сусла з карбонатом кальцію для молочнокислих бактерій	35	12

Встановлено, що природна асоціація «чайний грибок» складається з чотирьох типів мікроорганізмів, які, за попередньою ідентифікацією, належать до оцтовокислих і молочнокислих бактерій та двох видів дріжджів з певними морфологічними особливостями.

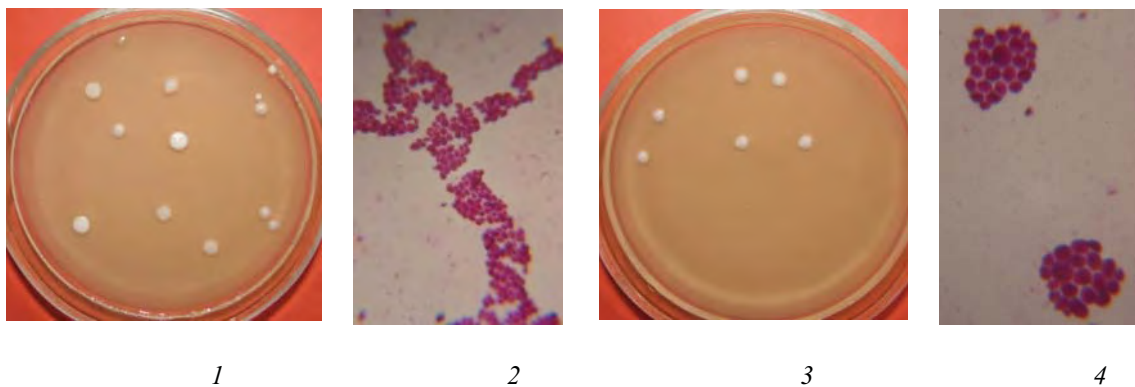


Рис. 2. Морфологічне дослідження дріжджових культур мікробіоти «чайний грибок»: 1 – колонії малих дріжджових клітин; 2 – фіксований фарбований препарат малих дріжджових клітин; 3-колонії великих дріжджових клітин; 4-фіксований фарбований препарат великих дріжджових клітин

Один тип дріжджових клітин формує білі, глянцеві, непрозорі, круглі колонії з лінзоподібним профілем, рівним краєм, діаметром 6–10 мм (рис. 2).

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)

Клітини другого типу утворювали білі, матові, 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 8–11 мкм в діаметрі. Видова належність культури остаточно не встановлена (рис. 2).

Морфологічне дослідження бактеріальних культур дало можливість виявити присутність одного виду молочнокислих та одного виду оцтовокислих мікроорганізмів.

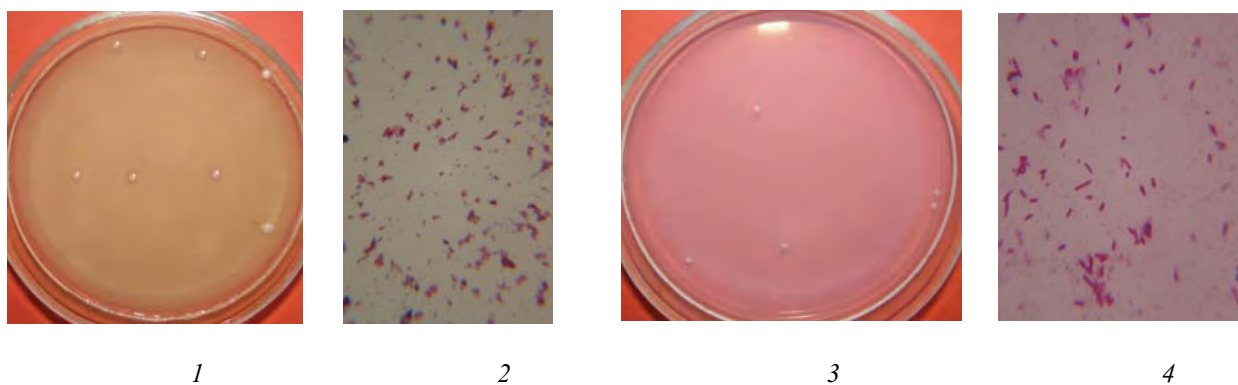


Рис. 3. Бактеріальні культури мікробіоти «чайний грибок»: 1 – колонії молочнокислих бактерій; 2 – фіксований фарбований препарат лактобацил; 3 – колонії оцтовокислих бактерій; 4 – фіксований фарбований препарат оцтовокислих бактерій

Бактеріальні клітини формують прозорі точкові колонії діаметром 1–2 мм на селективному середовищі з CaCO_3 , навколо яких утворюються прозорі зони, що свідчить про продукування культуурою кислоти. Це палички, розміром 0,5x1 мкм, що розташовуються попарно, які за попередньою ідентифікацією віднесені до роду *Lactobacillus* (рис. 3).

Другий тип клітин формує білі, непрозорі, матові круглі колонії діаметром приблизно 1 мм. Клітини мають форму довгих паличок розміром 0,3–0,5x6–8 мкм. За попередньою ідентифікацією віднесені до роду *Acetobacter*, оскільки ростуть на селективному поживному середовищі, в якому як джерело вуглецю виступає лише етиловий спирт (рис. 3).

Характеристика ферментованого напою

В результаті культивування мікробіоти «чайний грибок» на середовищі, яке містить запар чаю та цукор, утворюється напій з приємним кислуватим смаком. Для отримання ферментованого напою з найкращими органолептичними властивостями вирощували «чайний грибок» на середовищах різного складу (табл. 3).

Таблиця 3

Культивування «чайного грибка» на різних поживних середовищах

Середовище	Візуальна характеристика ферментованого напою	Органолептичні властивості ферментованого напою	Наявність CO_2	Час збродження, доба
Запар чорного чаю	Темно-коричневий колір, майже не прозорий	Відчувається характерний запах бродіння, смак не дуже приємний	-	5
Запар зеленого чаю	Світло-коричневий, прозорий	Запах бродіння менш виразний, смак більш терпкуватіший	-	5
Запар суміші зеленого і чорного чаїв	Коричневий розчин, помірної прозорості	Запах бродіння такий, як на зеленому чаї, смак приємніший, ніж у попередніх	-	4
Запар суміші зеленого, чорного чаю і м'яти	Світло коричневий, з бульбашками газу	Сильний неприємний запах бродіння, смак гіркуватий, неприємний	+	4
Запар суміші зеленого, чорного чаю, м'яти, материнки і шипшини	Світло коричневий, прозорий	Приємний яблучний запах, повністю відсутній запах бродіння, на смак нагадує яблучний сік, освіжаючий	-	6

З табл. 3 зрозуміло, що найкращий смак був у напою, отриманого із середовища 5.

В результаті проведених досліджень встановлено такі фізико-хімічні показники напою: титрована кислотність – 65–70 °Т, вміст цукру – 3,5 %, рН в межах – 3,5–4,7. Кількість посівного матеріалу – 4–5 % мас., оптимальна температура культивування – 22 °С.

Встановлено, що забарвлення біомаси залежить від температурних умов культивування: за нижчих температур одержують темно-коричневий відтінок, а за вищих – світло-жовтий, аж до білого.

З метою здешевлення вартості напою як джерела вуглецю спробували використати не цукор, а неохмелене пивне сусло, однак за таких умов культура росла погано, розшаровувалась, органолептичні якості отриманого напою були незадовільними.

Виявлено, що витримка квасу за низьких температур (-24 °С) протягом доби не знищує культур симбіозу – частина клітин залишається життєздатною і регенерує тіло “гриба”.

Також встановлена висока стійкість до теплової обробки: частина клітин витримувала короткотривале нагрівання до +60 °С і після цього знову відновлювала свої нормальні функції.

Висновки. Встановлено, що природна асоціація „чайний грибок” складається з чотирьох типів мікроорганізмів, які, за попередньою ідентифікацією, належать до оцтовокислих і молочнокислих бактерій та двох видів дріжджів. Вивчені морфологічні особливості мікроорганізмів, що входять до складу асоціації. За попередньою оцінкою до складу асоціації входять бактерії родів *Lactobacillus* і *Acetobacter*, дріжджі роду *Saccharomyces*, другий вид дріжджових клітин не ідентифіковано.

Визначено оптимальну температуру культивування «чайного грибка» та основні фізико-хімічні характеристики отриманого ферментованого напою: світло-коричневого (чайного) кольору, з характерним яблучним ароматом та приємним освіжаючим смаком, титрована кислотність – 65–70 °Т, вміст цукру – 3,5 %, – рН – в межах 3,5–4,7.

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. Потемська О., Ушакова В., Рожанська О., Кігель Н. *Перспективні штами для продуктів спеціального призначення. Антагоністична активність як критерій відбору культур молочнокислих та біфідобактерій* // Харчова і переробна пром. – 2000. – №1. – С.17–19. 3. Коваленко Н.К., Касумова С.А., Мучник Ф.В. *Скрининг штамов молочнокислих бактерій, що володіють гіпохолестеринемічною активністю, і їх практичне використання* // Мікробіол. журн. – 2004. – Т.66, №3 – С. 33–41. 4. Вітряк О.П. *Удосконалення технології безалкогольних напоїв бродіння з використанням нетрадиційних культур мікроорганізмів.* – К., 2002 – 19 с. 5. Прибильський В.Л. *Розробка ефективних технологій біологічно активних ферментованих напоїв: Автореф. дис... докт. техн. наук: 05.18.07* – К.: НУХТ, 2004. – 40 с. 6. Елинов Н.П., Ларина О.Г. *Мікробіота природної асоціації «Тибетський рис»*//Проблеми медичинської мікології – 1999. – Т.1, №1. – С. 51–56. 7. Квасников Е.И., Несторенко О.П. *Молочнокислые бактерии и пути их использования.* – М.: Наука, 1975. – 388 с. 8. Квасников Е.И., Щепанова И.Ф. *Дрожжи. Биология. Пути использования.* – К.: Наук. думка, 1991. – 328 с. 9. Bradford M.M. *Rapid and sensitive method for the quantitation of mg quantities of protein*// *Anal. Biochem.* – 1976. – V.72, N. 1–2. – P. 248–254. 10. Мамай О.І., Сльозко Г.Ф., Стоянова О.В. *Хімічний і технологічний контроль виноробства.* – К.: Фірма «ІНКОС», 2004. – 224 с.