

1. БІОТЕХНОЛОГІЯ КОНСТРУЮВАННЯ, ВИРОБНИЦТВА ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

УДК 636.09:615.375

АКИМЕНКО Л.І., к.біол. наук, e-mail: larysaakymenko55@gmail.com

ГОРДІЄНКО О.І., к.біол. наук, e-mail: gordienko_1952 @i.ua

ТИНДИК В.С.,

МАНДЗЯ І.М.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

ЗНАЧЕННЯ ФІТОКОМПОНЕНТА В СЕРЕДОВИЩІ КУЛЬТИВУВАННЯ ДЛЯ ПРОДУЦЕНТІВ НОВИХ СИНБІОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Препарати з пробіотичними властивостями на основі активних пробіотичних штамів мікроорганізмів і фітокомпонентів сприяють нормальному розвитку тварин, опірності до негативних впливів довкілля. Поєднання екстракту амаранта і сироватки молока забезпечує умови для значного накопичення біомаси при культивуванні різних пробіотичних видів мікроорганізмів та сприяє виготовленню нових синбіотичних препаратів і, відповідно, їх високій активності.

Приведено результати дослідження динаміки накопичення біомаси мікроорганізмів з природної асоціації бродильного процесу на сироватко-рослинному середовищі в порівнянні з традиційними середовищами культивування, визначена активність кислотоутворення в процесі культивування і тинкторіальні властивості виділених культур.

Ключові слова: *амарант, асоціація мікроорганізмів, сироватка молока, поживне середовище.*

Вступ. Застосування кормових пробіотичних препаратів в практиці тваринництва дозволяє удосконалити існуючі системи розведення тварин, сприяє створенню збагачених раціонів. На сучасному ринку пробіотиків переважають комбіновані препарати [1]. Штами бактерій, що входять в комплексний пробіотик, відбираються по здатності штамів продукувати різні біологічно активні речовини так, щоб вони доповнювали один одного. Крім того, для отримання нових полікомпонентних препаратів комбінують багатоштамові культури з пробіотичними властивостями та пребіотичними субстанціями [2]. Пребіотики - субстрати, які стимулюють природну мікрофлору, не перетравлюються і не всмоктуються в шлунку і тонкому відділі кишкового (лактозу, глюкозу, протеїни, амінокислоти, вітаміни і мінерали, пектини, інулін, каолін, харчові волокна, дріжджі). Потрапляючи в товстий відділ кишкового, пребіотики сприяють розвитку нормальної мікробіоти [3]. У ссавців в перші дні після народження основним пребіотичним субстратом є лактулоза, що входить до складу молока. З переходом на змішане годування субстратом, що сприяє розвитку нормальної мікробіоти, стають структурні елементи рослинних тканин. Тому, для підвищення перетравлюваності і засвоюваності кормів, стимуляції розвитку тварин, зміцнення неспецифічного імунітету застосовуються ферментні, пробіотичні, пребіотичні і комбіновані ферментно-пробіотичні препарати, а також комплексні пробіотичні препарати, збагачені фітокомпонентами.

Консорціум мікроорганізмів відкриває необмежені можливості для пошуку нових формул пробіотиків. Консорціуми в межах виду, роду, між-родові бактерійні, поєднання

бактерій та дріжджів перспективні для біотехнологічних препаратів. Пробиотики кормового призначення розглядаються провідними фахівцями як "...частина раціонального потенціалу тварин, підтримка їх здоров'я і отримання продукції високої якості, безпечної як в бактерійному, так і в хімічному відношенні" [4, 5]. Часткова заміна молочної сировини рослинною сприяє збагаченню раціону біологічно активними речовинами, підвищенню опірності організму до несприятливих чинників зовнішнього середовища. До складу цих продуктів окрім білкових речовин входять вітаміни, мінеральні солі, органічні кислоти, харчові волокна і інші цінні компоненти у вигляді природних сполук, і тому, фізіологічні для організму.

Вибір амаранту для дослідження обумовлений тим, що в його складі присутня велика кількість білку (16-18%), 10% незамінних амінокислот, до того ж, лізину в 30 разів більше ніж у зернових культурах. Також, полінасичені жирні кислоти, 14% клітковини, 18% протеїну, 18% цукру, 5-6% жиру та 55-62% крохмалю та пектинів, 8% сквалену. Відмічають високий рівень вмісту мінеральних речовин (залізо, фосфор, калій, кальцій, магній) та вітаміну Е, вітамінів групи В, жовчних кислот, фосфоліпідів, стероїдів та фітостероїдів, вуглеводнів та флавоноїдів, що є показником біологічної цінності рослини [5]. Використання препаратів з пробіотичними властивостями має актуальне значення не лише для тваринництва, але і для охорони здоров'я людини шляхом зниження ризику захворюваності людей і підвищення екологічної безпеки сільськогосподарської продукції [6].

Мета роботи - розробити поживне середовище на основі сироватки молока та продуктів переробки рослинної сировини (амаранту) та визначити динаміку накопичення біомаси мікроорганізмів, активність кислотоутворення та видовий склад мікроорганізмів природної асоціації бродильного процесу на початкових етапах розробки рідкого синбіотичного препарату.

Матеріали і методи досліджень. Для розробки середовища була використана сироватка молочна, водний екстракт диких видів амаранту, сироватко-амарантова суміш компонентів 1:1, природні асоціації мікроорганізмів бродильного процесу (ферментація томатів). Культивування асоціації мікроорганізмів проводили за температури 37°C на рідких поживних середовищах MRS, ТСБ, МПА, Сабуро, капустиному, сироватці молока, екстракту амаранту і суміші компонентів 1:1 з метою максимального виділення чистих культур мікроорганізмів. Підготовлені зразки суміші охолоджували до температури закваски (40±2) ° і вносили асоціацію мікроорганізмів у кількості 5 % від маси суміші. З метою максимального виділення всіх складових асоціації мікроорганізмів чисті культури отримували на традиційних поживних середовищах: MPC (MRS), середовище Ли (Lee), біфідум-середовище, триптон-соєве, капустає, Сабуро, МПА, МПБ. Облік результатів проводили по загальноприйнятій схемі на рідких поживних середовищах за допомогою вимірювання оптичної щільності по Мак - Фарланду в динаміці культивування та на твердих поживних середовищах для визначення культурально-морфологічних показників. У роботі використано стандартизовані методи досліджень у відповідності до ДСТУ 8666:2016, ДСТУ 8710:2017, ДСТУ 8712:2017 [7, 8, 9]. В ході процесу ферментації активність кислотоутворення визначали титриметричним методом по Тернеру з періодичністю 24 години. Для визначення амінного азоту у середовищах культивування асоціації мікроорганізмів використовували метод формольного титрування.

Для вирішення завдання була розроблена процедура отримання екстракту амаранту в такій послідовності:

- траву амарант без коріння висушували за кімнатної температури у темному місці 14 діб;

- подрібнювали суху траву амаранту методом нарізування на 0,5-1,0 см шматки;
- роблять наважку сухої подрібненої сировини амаранту 50 г , заливали 1000 мл дистильованої води;
- проводили екстракцію та стерилізацію одночасно автоклавуванням при 1 атм (121°) 20 хвилин.
- фільтрування в стерильних умовах;
- визначають амінний азот методом формольного титрування.

Для приготування сироватко - рослинного середовища культивування змішували екстракт амаранту з молочною сироваткою в співвідношенні 1:1 відповідно. Виготовлене середовище має легку опалесценцію.

Результати досліджень та їх обговорення. Для оцінювання ростових властивостей запропонованого сироватко - рослинного середовища виділені культури мікроорганізмів паралельно культивували на середовищах MRS бульйоні, МПБ, ТСБ. Результати досліджень наведені в Таблиці 1.

Таблиця 1

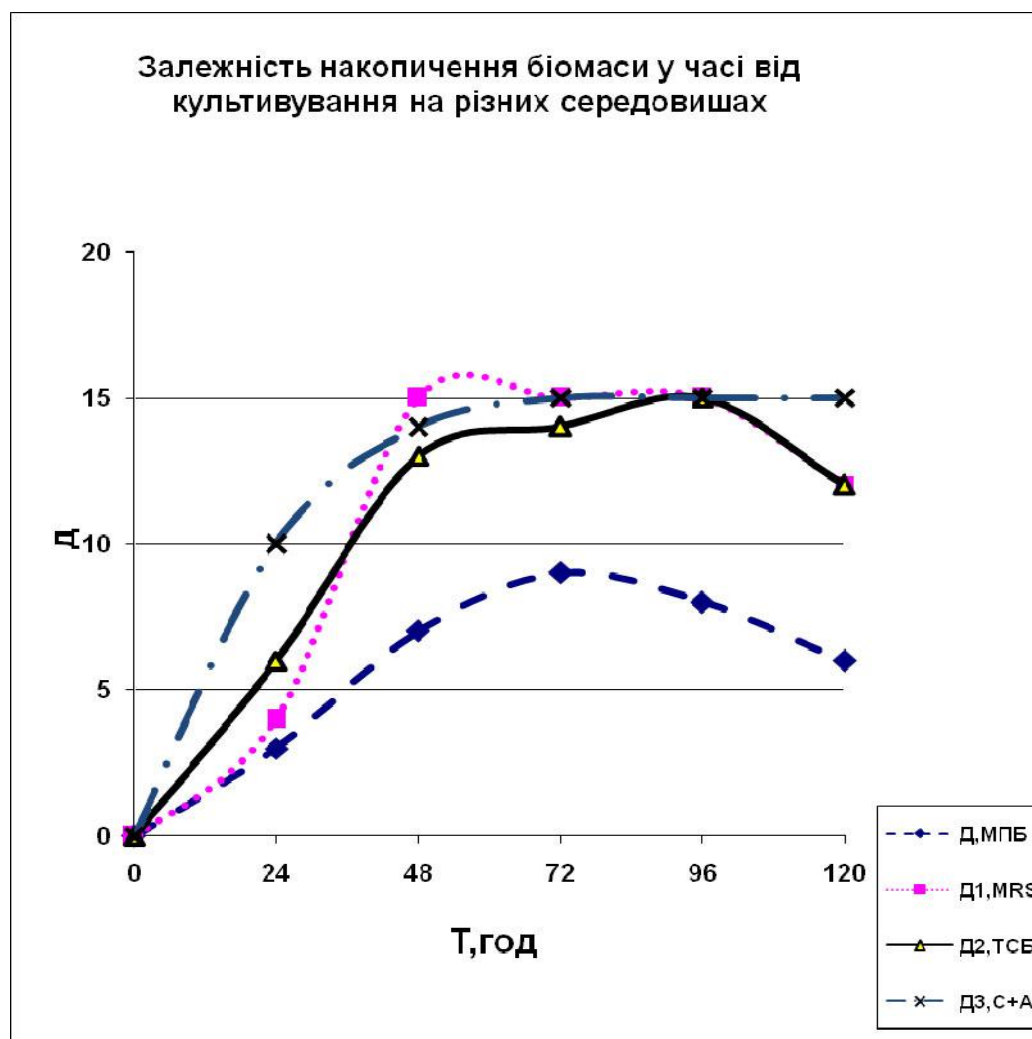
Визначення динаміки накопичення біомаси бактеріально-дріжджової асоціації мікроорганізмів на різних середовищах культивування

Назва середовища культивування	Оптична щільність культурального середовища			Коефіцієнт приросту біомаси	
	Початкова	З посівним матеріалом 0 год.	На 48 год.	Відносний за 1 год.	Відносний за 24 год.
MRS	1,93	4,1	11,7	0,2	4.88
МПБ	0,16	2,63	6,7	0,13	3.27
ТСБ	0,43	6,9	9,0	0,17	4.28
C+A	7,4	7,9	12,66*	0,37	8.95

- зразок розведений в 2 рази
- P<0,05

За результатами, що внесені в таблицю 1 можна зробити висновок, що в екстракті амаранту, багатим за хімічним складом, присутні речовини - стимулятори росту, характерні для амаранту: білки, незамінні амінокислоти, мікроелементи, вітаміни. Амінний азот у середовищі культивування сироватка молока + екстракт амаранту становив 44,1мг%, у МПБ (Нім) - 47,6мг%, у MRS (Нім) 161 мг%. За кількісним показником амінного азоту найбільш поживним має бути середовище MRS. Але визначення коефіцієнту добового приросту біомаси мікроорганізмів за показником оптичної щільності при культивуванні на різних середовищах вказує на те, що значний приріст біомаси на сироватко-амарантовому середовищі C+A (сироватка + амарант) – 8.95. Тоді як на середовищі MRS – 4,88, МПБ – 3,27, ТСБ - 4,28.

Результати наступних досліджень (графік 1) підтвердили раніше отриманий результат: за показником щільності вища концентрація накопичення біомаси спостерігається при культивуванні на авторському сироватко-рослинному поживному середовищі (C+A, суміш сироватки молока та екстракту амаранту в співвідношенні 1:1)



Д – щільність по МакФарланду ($1 - 3 \times 10^8$ концентрація живих клітин в 1 мл)

Рис.1. Динаміка накопичення біомаси асоціації мікроорганізмів на різних поживних середовищах.

Накопичення біомаси асоціації мікроорганізмів за показником оптичної щільності при культивуванні на різних поживних середовищах при всіх інших рівних умовах культивування становив на: МПБ - 8; MRS - 16; ТСБ - 13; (С+А)- 15. Лаг-фаза починається на 48 ± 2 годину культивування на всіх експериментальних середовищах. На 72 - ї годині культивування завершується лаг-фаза накопичення біомаси лактобактерій при культивуванні на середовищах з максимальними показниками щільності : МПБ - 8; MRS - 15; ТСБ - 12; С+А - 15. З цього часу накопичення клітин практично не відбувається. Після 96 години культивування показник щільності зменшується завдяки лізису живих клітин культури на всіх середовищах крім авторського (С+А) завдяки пролонгації лаг-фази до 120 годин.

При висіві на MRS агар клітин з культуральної суспензії на рідкому авторському середовищі (С+А) було одержано ріст колоній різних культур та проведена їх початкова диференціація фарбуванням за Грамом та подальшим мікроскопіюванням.

Мікроскопіювання клітин суспензії після фарбування за Грамом підтвердило присутність в мазках асоціації молочнокислих мікроорганізмів та дріжджів (12-14 видів клітин), рисунки: 2 - 8 (Збільшення мікроскопу 10×100)

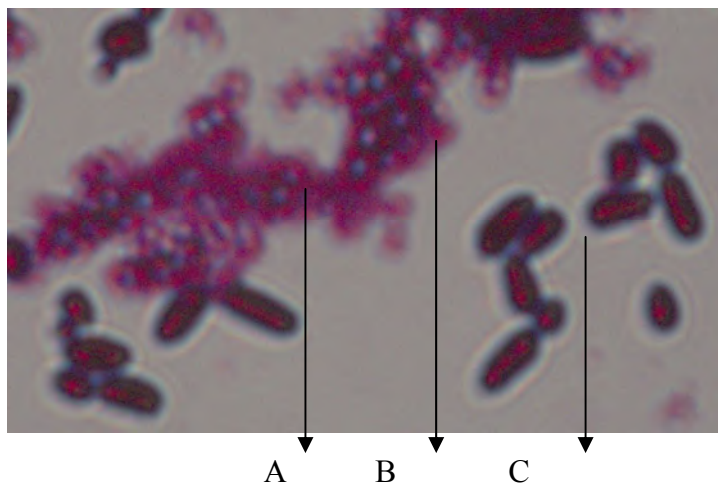


Рис 2. Асоціація трьох типів клітин, грам-позитивних (B, C) за розміром дріжджі та грам-негативних (A) за розміром бактерії

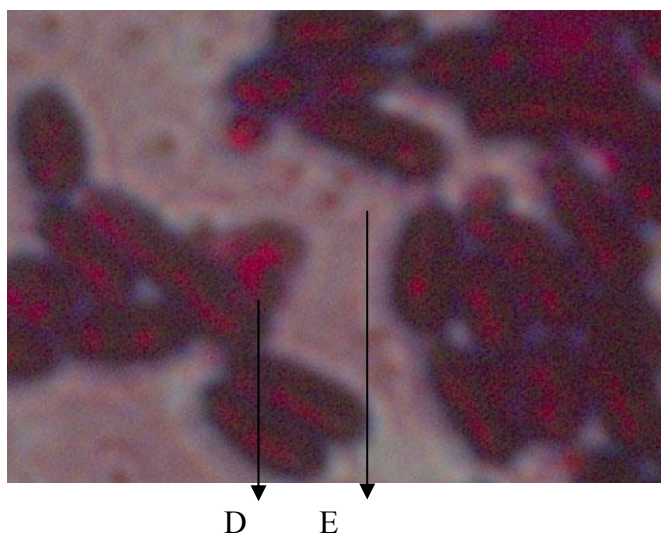


Рис 3. Асоціація двох типів клітин, грам-негативних (D, E) за розміром дріжджі – D; за розміром бактерії – E

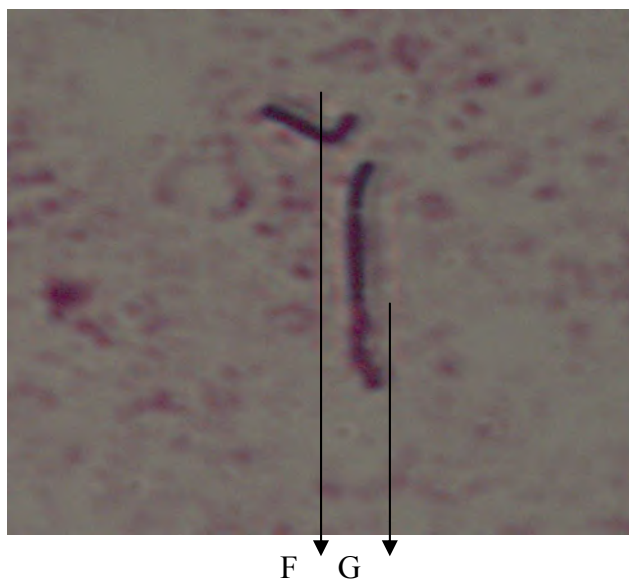
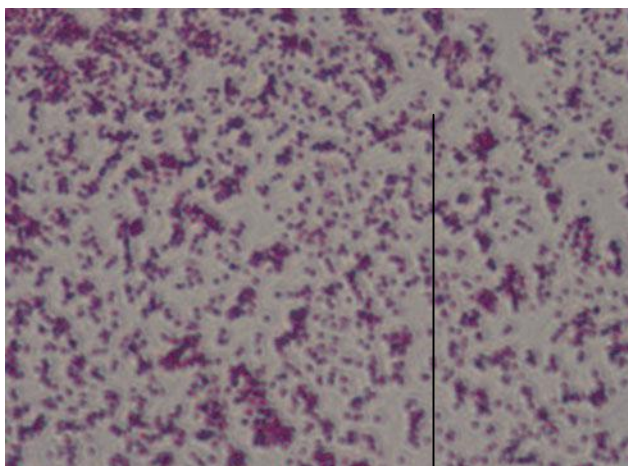
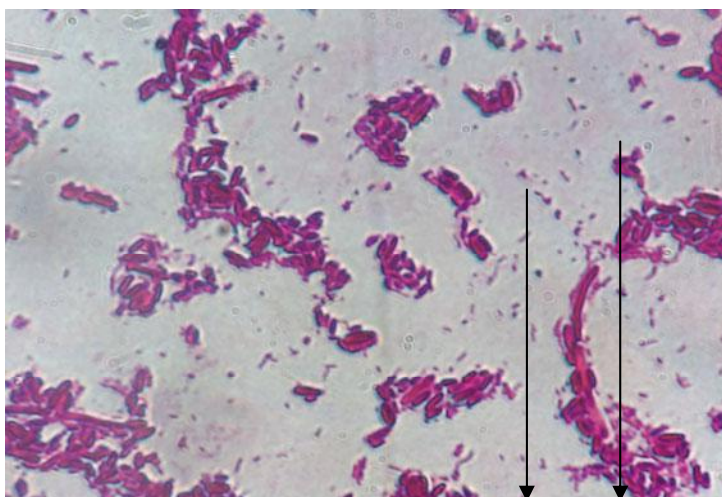


Рис.4 Асоціація двох типів бацилярної (G) та бактеріальної (F) форм, грам-позитивної та грам-негативної відповідно



Н

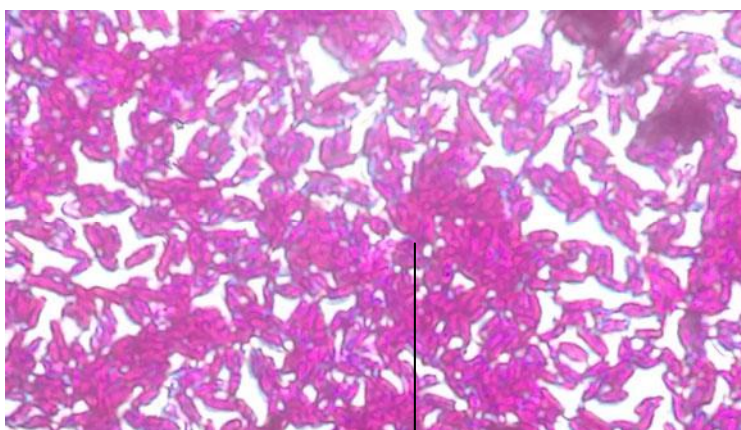
Рис.5 Один тип клітин кокової форми (Н), грамнегативні за розміром бактерії



Ж

Р

Рис.6 Два типи клітин, грамнегативні (Ж, Р) за розміром бактерії



К

Рис.7 Один тип клітин (К), грамнегативні за розміром бактерії

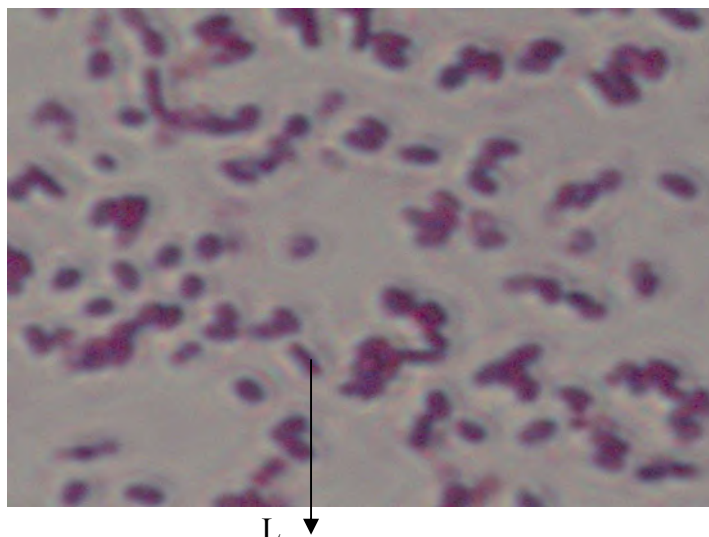


Рис.8 Один тип клітин (L), грампозитивні за розміром дріжджів

Отриманий результат важливий на етапі виділення активних культур мікроорганізмів і в подальшому для дослідження стабільності асоціації і визначення складу виробничих штамів.

Щодо дослідження активності кислотоутворення (по Тернеру) в процесі культивування асоціації мікроорганізмів, то цей показник дозволяє зробити перші висновки щодо накопичення активних метаболітів в культуральному середовищі. Зміна показника активної кислотності в динаміці свідчить про зміну активності мікроорганізмів у складі асоціації. Тому, в залежності від наміченого функціонального призначення, можна поетапно отримати препарати різні за складом корисних метаболітів. Мінімальне накопичення органічних кислот визначено на 48 годину культивування. Це свідчить про активний ріст дріжджових культур в перші години культивування, а з 48 години збільшується кількість молочнокислих мікроорганізмів.

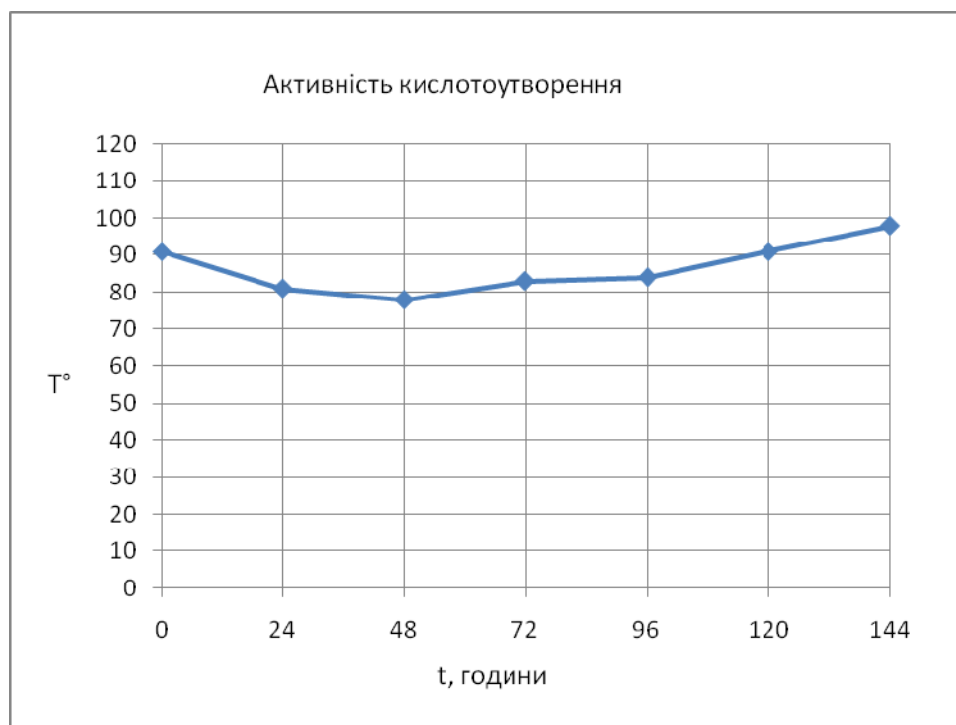


Рис.9. Рівень кислотності культурального середовища.

Запропоноване поживне середовище просте в приготуванні, не шкідливе для зовнішнього середовища і може використовуватися в мікробіологічних, науково - дослідних та виробничих лабораторіях на початкових етапах роботи по виділенню активних культур з пробіотичними властивостями. Подальша стандартизація запропонованої основи для синбіотичного препарату повинна включати константні показники якості компонентів, які забезпечують якість препарату [10, 11].

Висновки та перспективи подальших досліджень:

Запропоноване середовище для культивування мікроорганізмів на основі молочної сироватки і екстракту амаранту забезпечує значний приріст біомаси на 48 годину культивування і дозволяє виділити більшу кількість чистих культур мікроорганізмів (14) в порівнянні з традиційними середовищами (4-8).

Зміна показника кислотоутворення в процесі культивування дозволяє отримати препарати різні за функціональним призначенням: з підвищеним вмістом кисломолочних бактерій чи дріжджів.

Для розробки біотехнології отримання препарату з пробіотичними властивостями доцільно використовувати середовище на основі молочної сироватки і екстракту амаранту (1:1) та біомаси асоціації мікроорганізмів бродильного процесу з метою виділення активних штамів з пробіотичними властивостями.

Подальше дослідження в першу чергу передбачає ідентифікацію виділених культур та дослідження стабільності асоціації, як основної складової препарату. Стандартизація і дослідження синбіотичного препарату буде проведено у відповідності до міжнародних вимог.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Feed probiotics market - segmented by type, animal type and geography (2017 - 2022) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-probiotics-market-industry?gclid=cjwkcaiaqbvtbrapeiwanekycp63p0fvnulzit-tj4f1wol6xkmininv74r5pl6mfahs72bw5igxqzxoctyoqavd_bwe
2. Тарасенко Н.А. Кратко о пребиотиках: история, классификация, получение, применение / Н.А.Тарасенко, Е.В.Филиппова //Фундаментальные исследования.-2014.-№ 6-1.-С.33-35.
3. Лахтин В.М. Стратегические аспекты конструирования пробиотиков будущего / В.М.Лахтин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин //Вестник Российской АМН. -2008. - №2. – С.33-45.
4. Шендеров, Б.А. Пробиотики, пребиотики и синбиотики. Общие и избранные разделы проблемы / Б.А. Шендеров // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. - 2005. - № 2. - С. 23-26.
5. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения / Н.А. Ушакова, Р.В. Некрасов, Правдин В.Г., Л.З. Кравцова, О.И.Бобровская, Д.С. Павлов //Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1. – С. 184-192.
6. Особенности микроструктуры и химического состава продуктов переработки зерна амаранта [Електронний ресурс] / [Н.А. Шмалько., И.А Чалова., Н.А. Моисеенко, Н.Л. Ромашко] – Режим доступу: <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-mikrostruktury-i-himicheskogo-sostava-produktov-pererabotki-zerna-amaranta>
7. ДСТУ 8710:2017. Препарати ветеринарні біологічні. Пробиотики. Методи ідентифікації специфічних мікроорганізмів. Наказ №149 від 12 червня 2017 року (ДП «УкрНДНЦ») Надати чинності з 01.січня 2018 року.– Режим доступу: <http://document.ua/standarty-alyuminii-str0001267.html>

8. ДСТУ 8712:2017. Препарати ветеринарні біологічні. Пробиотики. Методи ідентифікації специфічної активності. Наказ №149 від 12 червня 2017 року (ДП «УкрНДНЦ») Надати чинності з 01.січня 2018 року.– Режим доступу: <http://document.ua/standarty-alyuminii-str0001267.html>

9. ДСТУ 8666:2016. Препарати ветеринарні біологічні. Пробиотики. Методи визначення інгібіторів росту. Наказ № 238 від 11 серпня 2016. Дата введення в дію: 01.10.2017 – Режим доступу: <http://document.ua/standarty-alyuminii-str0001267.html>

10. Лахтин В.М. Стратегические аспекты конструирования пробиотиков будущего / В.М. Лахтин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин //Вестник Российской АМН. -2008. - №2. – С.33-45.

11. Probiotics: A ConsumerGuide for Making Smart Choices [Електронний ресурс] / International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. – Режим доступу: <http://www.isapp.net/Portals/0/docs/Consumer%20Guidelines%20probiotic.pdf>– 05.03.2015 р. – Загол. з екрану.

ЗНАЧЕНИЕ ФИТОКОМПОНЕНТА В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ ПРОДУЦЕНТОВ НОВЫХ СИНБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ / Акименко Л.И., Гордиенко О.И., Тындык В.С., Мандзя И. Н.

Препараты со свойствами пробиотиков на основе активных штаммов микроорганизмов и фитоконпонентов содействуют нормальному развитию животных, увеличению сопротивляемости к негативным влияниям окружающей среды. Сочетание экстракта амаранта и сыворотки молока создает условия для значительного накопления биомассы при культивировании разных пробиотических видов микроорганизмов и содействует изготовлению новых симбиотических препаратов и, соответственно, их высокой активности..

Приведены результаты исследования динамики накопления биомассы ассоциации микроорганизмов на сывоточно-растительной среде по сравнению с традиционными средами культивирования, определена активность кислотообразования в процессе культивирования и тинкториальные свойства выделенных культур.

Ключевые слова: амарант, ассоциация микроорганизмов, сыворотка молока, питательная среда.

THE VALUE OF PHYTOCOMPONENT IN THE CULTURE MEDIUM FOR NEW SYNBIOTIC PREPARATIONS/Акуменко L. I., Gordienko O.I., Tyndyk B. C., Mandzya I.N.

Introdaction.*The combined probiotics preparations prevail at the modern market.*

The amaranth was elected as prebiotic. The use of probiotics preparations has an actual value not only for a stock-raising but also for a health man protection by the decline of people morbidity risk of safety of agricultural productes.

The goal of work : *To create medium on the basis of lactoserum and amaranth extract, to determine the optimal terms for natural microorganisms association cultivation for creation of liquid synbiotic preparation.*

Materials and methods of research. *The serum milk and aquatic extract of amaranth on the mixture of components of 1:1 was used for medium development, the natural microorganisms associations of fermenting process was researched. The standardized research methods was used in accordance to SSTU 8666:2016, SSTU 8710:2017, SSTU of 8712:2017. The acidity of fermentation activity was determined by a titrimetric method for Terner with periodicity 24 hours.*

Results of research discussion. *The evaluation of new medium properties and tradition was compared. The determination of day's microorganisms increase confirmed: the higher concentration of cages of day's culture is observed at cultivation on an authorial medium (C+A) – 8.95. While on the MRS – 4.88, MPB – 3.27, TSB – 4.28. The culture of lactate microorganisms and yeasts (12-14 types of cages) was isolation. A minimum accumulation of organic acids is certainly on a 48 o'clock of cultivation. It testifies to the height of yeasts , and the amount of lactate microorganisms increases from 48 hour. The further standardization of the synbiotic preparation must include constant indexes of components, which provide quality of preparation .*

REFERENCES

1. 1.Feed probiotics market - segmented by type, animal type and geography (2017 - 2022)/ Retrieved from https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-probiotics-market-industry?gclid=cjwkcaiaqbvtbrapeiwanekycp63p0fvnulzit-tj4f1wol6xkmninv74r5pl6mfahs72bw5igxqzxoctyoqavd_bwe
- 2..Tarasenko N.A. Kratko o prebiotikah: istorija, klassifikacija, poluchenie, primenenie [Tekst]. N.A.Tarasenko, E.V.Filippova//Fundamental'nye is-sledovanija.-2014.-№ 6-1.-S.33-35.
3. Lahtin V.M. Strategicheskie aspekty konstruirovaniya probiotikov budushhego /V.M.Lahtin, S.S. Afanas'ev, V.A. Aleshkin //Vestnik Rossijskoj AMN. -2008. - №2. – S.33-45.
4. Shenderov, B.A. Probiotiki, prebiotiki i sinbiotiki. Obshhie i izbrannye razdely problemy / B.A. Shenderov // Pishhevyje ingredijenty. Syr'e i dobavki. - 2005. - № 2. - S. 23-26.
5. Novoe pokolenie probioticheskikh preparatov kormovogo naznachenija / N.A. Ushakova, R.V. Nekrasov, Pravdin V.G., L.Z. Kravcova, O.I.Bobrovskaja, D.S. Pavlov //Fundamental'nye issledovanija. – 2012. – № 1. – S. 184-192.
6. Osobennosti mikrostruktury i himicheskogo sostava produktov pererabotki zerna amaranta [Elektronnij resurs] / [N.A. Shmal'ko., I.A Chalova., N.A. Moiseenko, N.L. Romashko] – Retrieved from : <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-mikrostruktury-i-himicheskogo-sostava-produktov-pererabotki-zerna-amaranta>
7. DSTU 8710:2017. Preparati veterinarni biologichni.Probiotiki. Metodi identifikacii specifichnih mikroorganizmiv.Nadati chinnosti z 01.sichnja 2018 roku. Retrieved from <http://document.ua/standarty-alyuminii-str0001267.html>
8. DSTU 8712:2017. Preparati veterinarni biologichni.Probiotiki. Metodi identifikacii specifichnoi aktivnosti. Nadati chinnosti z 01.sichnja 2018 roku. Retrieved from <http://document.ua/standarty-alyuminii-str0001267.html>
9. .DSTU 8666:2016 Preparati veterinarni biologichni. Probiotiki. Metodi viznachennja ingibitoriv rostu. Nadati chinnosti z 11.sichnja 2016 roku
10. Lahtin V.M. Strategicheskie aspekty konstruirovaniya probiotikov budushhego / V.M. Lahtin, S.S. Afanas'ev, V.A. Aleshkin //Vestnik Rossijskoj AMN. -2008. - №2. – S.33-45.
11. Probiotics: A ConsumerGuide for Making Smart Choices [Електронний ресурс] / International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. – Retrieved from <http://www.isapp.net/Portals/0/docs/Consumer%20Guidelines%20probiotic.pdf>– 05.03.2015 p. – Загол. з екрану.