

БИОМАСА *Streptococcus thermophilus* ТА *Bifidobacterium longum* У МОЛОЧНОМУ СЕРЕДОВИЩІ З ОБНІЖЖЯМ БДЖОЛИНИМ

Н. Н. Ломова¹
О. О. Сніжко²
С. А. Наріжний¹

¹Білоцерківський національний аграрний університет,
Біла Церква, Україна

²Національний університет біоресурсів і природокористування
України, Київ

E-mail: snezhko82@mail.ru

Отримано 10.12.2014

Здійснено аналіз даних щодо накопичення біомаси *Streptococcus thermophilus* та *Bifidobacterium longum* у молочному середовищі з обніжжям бджолиним. У роботі послуговувалися набором стандартних методів і методичних вказівок для визначення кількості біфідобактерій та молочнокислих мікроорганізмів. Підрахунок колонієутворювальних одиниць — КУО/см³ проводили з використанням середовищ М17 і MRS. Тривалість фаз росту визначали графічним методом.

Встановлено, що бджолине обніжжя за концентрації 0,2–1,0% стимулює накопичення біомаси стрептококів на 9–15%, біфідобактерій — на 2,3–12,7% і скорочує тривалість лаг-фази для обох видів мікроорганізмів майже до її повного зникнення. Внесення обніжжя у середовище розмноження *Str. thermophilus* скорочує лаг-фазу на 30–50%, а стаціонарну — подовжує на 20–30%. *B. longum* на внесення наповнювача реагує незначним подовженням лаг-фази та істотним (більш ніж у 2 рази за 1% обніжжя) — стаціонарної. Доза пилку в кількості 1,0% від маси живильного середовища забезпечує одержання біомаси у кількості $6 \pm 0,1 \times 10^9$ КУО/см³ (*Str. thermophilus*) та $2,8 \pm 0,1 \times 10^8$ КУО/см³ (*B. longum*).

Str. thermophilus та *B. longum* добре засвоюють есенціальні мікронутрієнти пилку. Складові бджолиного обніжжя можуть виступати стимуляторами росту для певних штамів. Ці дані буде покладено в основу біотехнології одержання кисломолочного напою з продуктами бджільництва.

Ключові слова: біомаса, обніжжя бджолине, стрептококи, біфідобактерії.

Здоров'я людини більш ніж на 40% зумовлено якістю її харчування [1]. Слід визнати, що властивості їжі, одержаної за допомогою сучасних технологій, часто не адекватні природним процесам асиміляції харчових речовин організмом людини. Окрім того, рафінованість і техногенність їжі може бути причиною порушення адаптаційних взаємодій організму з навколишнім середовищем, зниження захисного потенціалу та підвищення ризику розвитку захворювань.

З появою теорії адекватного харчування, складовою якої є класична теорія збалансованого харчування, розроблена академіком О. О. Покровським [2], почали приділяти належну увагу не лише первинним нутрієнтам (надходять ззовні), але й вторинним, які утворюються в організмі з первинних під дією біотрансформації та біосинтезу в результаті життєдіяльності нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту.

Дефіцит нормофлори можна до певної міри компенсувати пробіотиками.

Дослідження ефективності пробіотиків показали їх позитивний вплив на організм людини [3]. Досвід свідчить, що споживання молочнокислих бактерій, що входять до складу йогурту, стимулює ерадикацію (знищення) *Helicobacter pylori* в організмі людини [4].

Вивчено механізми дії в організмі пребіотиків та їхніх асоціацій з пробіотиками — синбіотиків, мультипробіотиків тощо. Вчені працюють над створенням та дослідженням нових мультипробіотичних заквасок, зокрема й таких, що містять апіпродукти (апібакт з витяжкою прополісу) [5, 6].

Доведено, що ефективність синбіотиків може змінюватися залежно від пробіотичного штаму і компонента, а також від низки інших чинників, таких як склад живильного середовища, в якому проходить ферментація, технологічні параметри тощо [7, 8].

Дослідження мікробіологічних процесів у кисломолочних продуктах з медом краще висвітлено в роботах закордонних науковців. Семенова Н. А., досліджуючи вплив меду бджолиного на кисломолочний процес, встановила, що він не справляє стимулювального ефекту на цей процес [9]. Проте за цих умов спиртове та оцтовокисле бродіння під час дозрівання кефіру проходило активніше. Доведено, що акацієвий і каштановий мед стимулюють накопичення біомаси *Bifidobacterium lactis Bb-12* як у козиному, так і в коров'ячому молоці. Підвищення концентрації меду в кисломолочних напоях сприяє збільшенню кількості біфідобактерій *Bifidobacterium Bifidum*. Водночас ці види меду виявляють інгібувальні властивості стосовно патогенного збудника *Listeria monocytogenes* [10].

Про те, що мед може бути біфідогенним фактором, свідчать дослідження впливу глюкози, фруктози і меду на *Streptococcus thermophilus* (St-133), *Lactobacillus acidophilus* (La-7), *Lactobacillus delbruekii subsp bulgaricus* (Lr-78) та *Bifidobacterium bifidum* (Bf-13), в яких встановлено, що найефективнішим стимулятором росту серед цих вуглеводів є мед. Проте він не впливає на життєдіяльність молочнокислих бактерій [11].

Дані, отримані Metry [12], та наші власні дослідження не збігаються з попередніми, оскільки вони свідчать про пребіотичні (стимулювальні) властивості меду для *Streptococcus thermophilus B-7026*, *Lactobacterium delbrueckii subspecies bulgaricum B-7036*, *Lactobacterium acidophilum B-7056* [13].

Наявність у живильному середовищі такого активного природного джерела біологічно активних речовин (БАР), як бджолине обніжжя (пиллок), імовірно, впливає на перебіг ферментації молока. Проте інформації про дослідження цього напрямку недостатньо. Відсутні також дані щодо впливу бджолиного обніжжя на життєздатність мікроорганізмів у поширених кисломолочних напоях.

З метою встановлення закономірностей накопичення біомаси мікроорганізмами *Streptococcus thermophilus B-7026* (*Str. thermophilus B-7026*), *Bifidobacterium longum B-7033* (*B. longum B-703*) здійснювали аналіз даних стосовно розмноження цих мікроорганізмів у молочному середовищі з обніжжям бджолиним.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були популяції мікроорганізмів, які росли на живильних середовищах різного складу. Контролем слугувало нормалізоване молоко з м. ч. жиру $3,2 \pm 0,2\%$, протеїну — $3,3 \pm 0,1\%$, титрованою кислотністю $19,0 \pm 0,5$ °Т, пастеризоване за температури $82,0 \pm 2,0$ °С, охолоджене до оптимальної для кожної культури температури культивування. Середовище 1 додатково містило $0,2 \pm 0,01\%$ обніжжя подрібненого [14], а 2 і 3 — $0,5 \pm 0,01\%$ і $1,0 \pm 0,01\%$ обніжжя, відповідно. Маса інокуляту монокультури становила $3 \pm 0,01\%$ (*B. longum B-7033*) і $1 \pm 0,01\%$ (*Str. thermophilus B-7026*) від маси готового згустку.

Критеріями оцінки ефективності культивування монокультур за умов різної концентрації обніжжя були накопичення біомаси та кінетика процесу утворення згустку.

Порівняльний аналіз динаміки контрольованих показників у середовищах з обніжжям проводили, зіставляючи дані дослідних зразків (середовища 1–3) із результатами монокультурних кисломолочних згустків (контроль), що не мали у своєму складі бджолиного обніжжя.

Застосовували набір стандартних методів та методичних вказівок для підрахунку біфідобактерій (МВК 10.10.2.2.-119-2005 Визначення кількості біфідобактерій у кисломолочних продуктах), молочнокислих мікроорганізмів (ГОСТ 10444.11-89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов). Тривалість фаз росту визначали графічним методом [15].

Усі дослідження проводили із триразовою повторюваністю. Статистичний аналіз експериментальних даних здійснювали за допомогою програми Excel, рівень достовірності $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Порівняльний аналіз кількості клітин *Str. thermophilus B-7026*, що утворилися під час біосинтезу цих мікроорганізмів у молочному середовищі різного складу, показав, що бджолине обніжжя справляє вплив на характер процесу культивування залежно від дози внесеного компонента. Тривалість, послідовність та інтенсивність накопичення біомаси різна в кожному з чотирьох живильних середовищ (рис. 1).

За концентрації обніжжя до 0,5% послідовність фаз росту зберігається, проте активність розмноження збільшується на

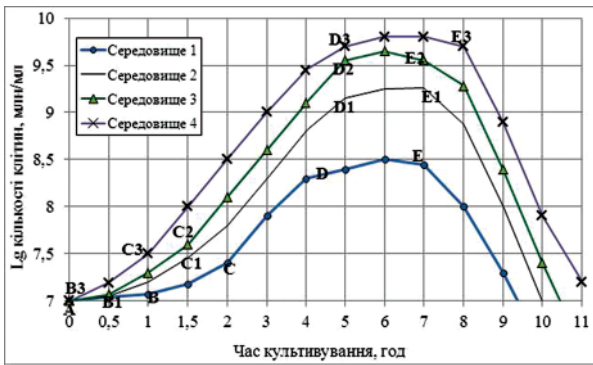


Рис. 1. Динаміка накопичення біомаси *Str. thermophilus* у молоці з різною концентрацією бджолиного обніжжя:

$P \leq 0,05$ для точок 0, 3, 7, 8, 9 год у середовищі 1;
0, 2, 6, 8 год у середовищі 2;
0, 3, 8, 10 год у середовищі 3

9–13,5%. У результаті на середовищі 1 і 2 було вирощено $1,8 \pm 0,1 \times 10^9$ і $4,5 \pm 0,2 \times 10^9$ життєздатних клітин *Str. thermophilus* B-702, а на контрольному — $3,2 \pm 0,1 \times 10^8$.

Тривалість лаг-фази АВ1 (адаптація бактерії до умов інкубації) у середовищах 1 і 2 скоротилася вдвічі порівняно з контролем (АВ) і становила 30 хв. У середовищі 3 фазу адаптації майже не спостерігали. Лаг-фаза (плавне наростання біомаси) для *Str. thermophilus* за концентрації пилку від 0,2 до 1,0% (В1С1, В1С2, В3С3) тривала протягом 1 год, що на 30% менше, ніж у контрольному середовищі (ВС). Це зменшує ризик розвитку небажаної мікрофлори на початкових етапах сквашування молока. Через скорочення попередніх фаз у дослідних зразках подовжилася на 50% фаза лінійного росту, що збільшило накопичення біомаси. Стаціонарна фаза (D3E3) для стрептококів, вирощених на середовищі 3, тривала найдовше — 3 год. Це на 30% довше порівняно із середовищами 2 і 3 і на 20% — порівняно з контролем. Фаза відмирання розпочалася майже одночасно для клітин контрольного зразка та середовищ 1 і 2 — на $7 \pm 0,12$ год культивування. У середовищі 3 вона затрималася, можливо, за рахунок подовження попереднього періоду на 1 год.

Найвищу інтенсивність накопичення біомаси *Str. thermophilus* спостерігали в середовищі з найбільшою (1,0%) концентрацією пилку. За $6 \pm 0,1 \times 10^9$ КУО/см³. Збагачення на 1% молочного середовища бджолиним обніжжям забезпечує приріст біомаси стрептокока на 15%. Для *Str. thermophilus* B-702, що розвивався у середовищі 3, характерна відсутність лаг-фази. Це істотно мінімізує вірогідність

розвитку сторонньої мікрофлори на початку сквашування, коли концентрація молочної кислоти є низькою.

Такий вплив бджолиного обніжжя на активність термофільного стрептокока, на нашу думку, зумовлений високим вмістом вітамінів, доступних для метаболізму вуглеводів та інших есенціальних речовин [13].

На рис. 2 подано криві росту біфідобактерій у молоці з обніжжям бджолиним (середовища 1–3) та без нього (контроль). Унаслідок додавання пилку динаміка росту біфідобактерій порівняно з контролем змінювалася. За культивування біфідобактерій з додаванням 0,2% пилку тривалість лаг-фази (АВ1) скорочується більш ніж на 50%, що знижує ризик розвитку сторонньої мікрофлори на початковому етапі сквашування, коли інтенсивність кислотоутворення незначна. Для біфідобактерій, інокульованих у середовища 2 і 3 (0,5 і 1% пилку) лаг-фаза майже не виражена. У контролі фаза поступового (експоненціального) зростання через $8 \pm 0,25$ год змінилася значним посиленням росту, що виявлялось у вигляді підняття С на кривій. У середовищі 1 такий результат спостерігали через $6 \pm 0,3$ год, а у 2 і 3 — раніше на $1,75 \pm 0,4$ год. Тобто, завдяки внесенню у живильне середовище пилку процес розмноження бактерій у молоці інтенсифікувався на 30%.

У досліджуваних зразках фаза лінійного росту (стрімке збільшення кількості біфідобактерій), що позначена на рис. 2 літерами С і D, мала різну тривалість. За відсутності обніжжя бджолиного і за його концентрації 0,2 та $0,5 \pm 0,01\%$ вона становила 12, 14

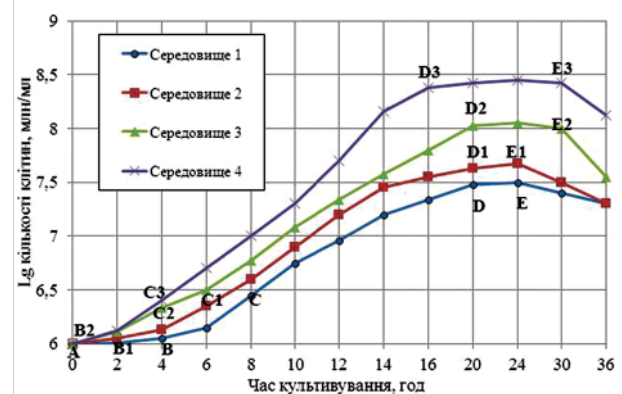


Рис. 2. Динаміка накопичення біомаси *B. longum* у молоці з різною концентрацією бджолиного обніжжя:

$P \leq 0,05$ для точок 0, 2, 8, 10, 20, 24 год у середовищі 1,
для точок 0, 2, 6, 8, 10, 14, 24 год — 2;
0, 4, 10, 24 — 3

і $16 \pm 0,12$ год відповідно. Отже, зі збільшенням бджолиного обніжжя від 0,2 до 0,5% спостерігається пропорційне подовження тривалості лінійного накопичення біомаси. Подальше збільшення пилку в молочному середовищі до $1,0 \pm 0,01\%$, порівняно з рештою дослідних зразків, призвело до скорочення цієї фази до рівня, що відзначається в контролі (12 год). Проте це не завадило накопиченню тут найбільшої кількості КУО на 1 см^3 згустку, до того ж тривалість стаціонарної фази ДЗЕЗ (понад 14 год) свідчить, що доза пилку $1,0 \pm 0,01\%$ подовжує тривалість життя біфідобактерій.

Найменшу тривалість стаціонарної фази спостерігали у контрольному зразку. Доза пилку 0,2% не затримує процес відмирання *B. longum B-7033*, на відміну від 0,5% пилку. У середовищі 1 із зазначеною концентрацією наповнювача життєдіяльність *B. longum B-7033* подовжується більш ніж у 2 рази. Це дає змогу отримати кисломолочні синбіотики з подовженим терміном придатності. З графічного зображення темпів росту *B. longum B-7033* (рис. 2) видно, що стаціонарна фаза ДЗЕЗ в середовищі 3 тривала найдовше ($13 \pm 0,7$ год). Можливо, це відбувалося через зникнення лаг-фази.

Встановлено, що в разі культивування *B. longum B-7033* у середовищі 3 за концентрації пилку 1% клітини біфідобактерій

розмножуються до кількості $2,8 \pm 0,1 \times 10^8$ КУО/см³ за 24 год ± 9 хв. За такий самий час у контролі та середовищах 1, 2 може накопичитись лише $3,2 \pm 0,1 \times 10^7$, $4,7 \pm 0,1 \times 10^7$ та $1,1 \pm 0,1 \times 10^8$ КУО/см³, відповідно. Тобто за цими результатами можна зробити висновок, що збагачення молочного середовища бджолиним обніжжям у дозі 0,2–1% забезпечить приріст біомаси *B. longum B-7033* від 2,3 до 12,7%.

Отже, можна стверджувати, що досліджувані культури *Str. thermophilus B-7026* та *B. longum B-7033* добре засвоюють внесені з пилком есенціальні мікронутрієнти. За швидкістю росту і накопиченням біомаси вони перевершують ті штами, що росли на молочному середовищі без пилку. Це ознака того, що складові бджолиного обніжжя можуть виступати стимулятором росту (біфідогенним фактором) для певних штамів.

Бджолине обніжжя у кількості 0,2–1,0 г/100г кисломолочного згустку стимулює ріст і розвиток *Str. thermophilus B-7026* та *B. longum B-7033*, скорочує на 50% або усуває фазу адаптації до середовища та підготовку до розмноження. Ці дані можуть бути використані для розроблення біотехнології одержання ферментованого молочного напою з натуральними продуктами бджільництва.

REFERENCES

- Gubyna Y. V. The fibers «Cytry-Faj» in the products functional purposes. *Molochnaya promyshlennost*. 2014, V. 2, P. 74. (In Russian).
- Gavrilova N. B. Biotechnology of combined dairy products. *Omsk: Variant-Sibir*. 2004. 224 p. (In Russian).
- Ejtahed H. S., Mohtadi-Nia J., Homayouni-Rad A., Niafar M., Asghari-Jafarabadi M., Mofid V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*. 2012, V. 28, P. 539–543.
- Sheu B. S., Cheng H. C., Kao A. W., Wang S. T., Yang Y. J., Yang H. B., Wu J. J. Pretreatment with Lactobacillus and Bifidobacterium containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 83 (4), 864–869.
- Torgalo Je. O. Alanine aminotransferase activity in rats of different and in conditions of periodical injection of multiprobiotic «Symbiter acidophilic». *Svit medytsyny ta biologii*. 2012, V. 2, P. 163–166. (In Ukrainian).
- Pylypenko S. V., Korotkyy O. G., Karpovych T. P., Ostapchenko L. I. Cytomorphological state of lymphoid organs of rats with long-term gastric hypoacidity and at introduction of multiprobiotic «Apibact». *Problemy ekolohichnoi ta medytsynskoi henetyky i klinichnoi immunologii*. 2014, V. 3, P. 36–44. (In Ukrainian).
- Sanders M. E., Tompkins T., Heimbach J. T., Kolida S. Weight of evidence needed to substantiate health effect for probiotics and prebiotics. *Eur. J. Nutr.* 2005, V. 44, P. 303–310.
- Heller K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, V. 73, 374S–379S.
- Semjonova N. A. The research of technological features production of fermented milk drinks with natural bee honey (Ph. D. dissertation). *Kemerovo*: 2008, 140 p. (In Russian).
- Lučan M., Slačanac V., Hardi J., Mastanjević K., Babić J., Krstanović V., Jukić M. Inhibitory effect of honey-sweetened goat milk. *Mljekarstvo*. 2009, 59 (2), 96–106.
- Chick H., Shin H. S., Ustunol Z. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *J. Food Sci.* 2001, V. 66, P. 478–481.

12. Metry W. A., Owayss A. A. Influence of incorporating honey and royal jelly on the quality of yoghurt during storage. *Egypt. J. Food Sci.* 2009, V. 37, P. 115–131.
13. Lomova N. M., Narizhnyy S., Snizhko O. Influence of incorporating honey, royal jelly and pollen on the biotechnological processes of dairy drink. *Vostochno-evropejskiy zhurnal peredovykh tehnologiy.* 2014, 2/12 (68), 62–65. (In Ukrainian).
14. Lomova N., Narizhnyy S., Snezhko O. Yoghurt enrichment with natural bee farming products. *Ukrainian Food J.* 2014, 3 (3), 405–411.
15. Pirt S. J., Walach M. Biomass yields of *Chlorella* from iron (Yx/Fe) in iron-limited batch cultures. *Arch. Microbiol.* 1978, 116 (3), 293–296.

БИОМАССА *Streptococcus thermophilus* И *Bifidobacterium longum* В МОЛОЧНОЙ СРЕДЕ С ПЧЕЛИНОЙ ОБНОЖКОЙ

Н. Н. Ломова¹
О. О. Снежко²
С. А. Нарижный¹

¹Белоцерковский национальный аграрный университет, Белая Церковь, Украина
²Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев

E-mail: snezhko82@mail.ru

Осуществлен анализ данных по накоплению биомассы *Streptococcus thermophilus* и *Bifidobacterium longum* в молочной среде с пчелиной обножкой. В работе использовали набор стандартных методов и методических указаний для подсчета бифидобактерий и молочнокислых микроорганизмов. Подсчет колониеобразующих единиц — КОЕ/см³ проводили с использованием сред М17 и MRS. Продолжительность фаз роста определяли графическим методом.

Установлено, что пчелиная обножка в концентрации 0,2–1,0% стимулирует накопление биомассы стрептококков на 9–15%, бифидобактерий — на 2,3–12,7% и сокращает продолжительность лаг-фазы для обоих видов микроорганизмов почти до ее полного исчезновения. Внесение обножки в среду размножения *Str. thermophilus* сокращает лаг-фазу на 30–50%, а стационарную — удлиняет на 20–30%. *B. longum* на внесение наполнителя реагирует незначительным удлинением лаг-фазы и значительным (более чем в 2 раза при 1% обножки) — стационарной. Доза пыльцы в количестве 1,0% от массы питательной среды обеспечивает получение биомассы в количестве $6 \pm 0,1 \times 10^9$ КОЕ/см³ (*Str. thermophilus*) и $2,8 \pm 0,1 \times 10^8$ КОЕ/см³ (*B. longum*).

Str. thermophilus и *B. longum* хорошо усваивают эссенциальные микронутриенты пыльцы. Составляющие пчелиной обножки могут выступать стимуляторами роста для определенных штаммов. Эти данные будут положены в основу биотехнологии получения кисломолочного напитка с продуктами пчеловодства.

Ключевые слова: биомасса, пчелиная обножка, стрептококки, бифидобактерии.

THE BIOMASS OF *Streptococcus thermophilus* AND *Bifidobacterium longum* IN DAIRY MEDIUM WITH BEE POLLEN

N. N. Lomova¹
O. O. Snezhko²
S. A. Narizhnyy¹

¹Bila Tserkva National Agrarian University, Ukraine

²National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: snezhko82@mail.ru

The present study was carried out to investigate the effect of different concentrations of bee pollen on the biomass accumulation of *Streptococcus thermophilus* and *B. longum* in the dairy environment. To calculate the amount of bifidobacteria and lactobacilli the standard methods of analysis were used. The count of CFU of *Str. thermophilus* and *B. longum* was carried out by using M17 and MRS agar media. The duration of growth phases was determined graphically.

It was established that bee pollen taken in the concentration of 0.2–1.0% stimulated the accumulation of biomass of *Str. thermophilus* on 9–15%, and *B. longum* — on 2.3–12.7%. Bee pollen reduced the duration of the lag phase for both types of microorganisms almost to its complete disappearance (1.0%). Pollen (1%) prolonged stationary phase for streptococci and bifidobacteria to 30% and 20%, respectively. This dose also provided the biomass accumulation in the amount of $6 \pm 0.1 \times 10^9$ CFU/cm³ (*Str. thermophilus*) and $2.8 \pm 0.1 \times 10^8$ CFU/cm³ (*B. longum*).

Str. thermophilus and *B. longum* readily assimilated essential micronutrients of the pollen. Components of bee pollen can be considered as growth stimulants for the studied strains. The obtained data could be used as the basis of biotechnology of dairy drink with bee products.

Key words: biomass, bee pollen, streptococci, bifidobacteria.