

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РИСОВОГО ГРИБА *ORYZAMYCES INDICI* КАК НОВОГО СБРАЖИВАЮЩЕГО КОМПОНЕНТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗАЛКОГОЛЬНЫХ НАПИТКОВ БРОЖЕНИЯ

*Е.А. Цед, З.В. Василенко, Л.М. Королева, С.В. Волкова,
Е.Н. Писаренко*

Экспериментально исследовано влияние соотношений сахарозы и рисового гриба *Oryzamyces indici* в питательной среде на метаболизм исследуемой биокультуры при получении безалкогольных напитков брожения. Установлено, что весовые количества сбраживающего компонента и сахарозы, а также время ферментации оказывают существенное влияние на характер обмена веществ биокультуры *Oryzamyces indici*.

Введение

Технология получения ферментированных напитков основывается на процессах брожения, обусловленных развитием микроорганизмов. Они представляют собой саморегулирующие системы, находящиеся в тесной зависимости от среды обитания и функционирующие как единое целое в условиях внешней среды [1].

По мнению ряда исследователей, главной функцией живого организма является обмен веществ – метаболизм [2,3]. Он представляет собой совокупность биохимических реакций, обуславливающих процессы анаболизма и катаболизма, направленных на непрерывное обновление живого организма и обеспечение его необходимой энергией. Причем для каждого вида микроорганизма характерен особый генетически закрепленный обмен веществ, интенсивность и направленность которого обеспечиваются путем сложной регуляции синтеза и активности ферментов. Благодаря обменным процессам происходят химические изменения питательной среды, в которой развиваются микроорганизмы, приводящие к обогащению субстрата их продуктами жизнедеятельности, которые и обеспечивают органолептические и физико-химические параметры готового продукта. В связи с этим одной из главнейших задач биотехнологии в области создания продуктов брожения является изыскание новых микроорганизмов и усиление их природной способности продуцировать определенные продукты жизнедеятельности. Причем качественный и количественный состав метаболитов, обеспечивающий заданные показатели готового продукта, напрямую зависит от полноценности и сбалансированности питательного субстрата, применяемого для культивирования микроорганизмов [4–6].

Естественной питательной средой для культивирования рисового гриба *Oryzamyces indici* является водный раствор сахарозы с добавлением растительной добавки – винограда сушеного.

Целью работы являлась оптимизация состава питательной среды для развития рисового гриба как источника брожения для получения безалкогольных ферментированных напитков, поскольку таковые исследования являются первоочередными и главенствующими с технологической точки зрения.

Результаты исследований и их обсуждение

Для выявления оптимальных условий культивирования рисового гриба *Oryzamyces indici* научно-практический интерес представляло изучение влияния весовых количеств сбраживающего компонента (рисового гриба) и основного углевода (сахарозы) в питательной среде

на жизнедеятельность данной биокультуры.

Для этого были приготовлены питательные среды с различными весовыми частями рисового гриба и сахарозы в 1 дм³ воды: 1:1, 1:2, 2:2, 2:3, 2:4, 3:3, 3:4, 4:4. При этом одна весовая часть рисового гриба и сахарозы соответствовала 24 г; количество задаваемой воды и винограда сушеного оставались величинами постоянными.

Полученные питательные среды засеивали расчетным количеством рисового гриба *Oryzomyces indicī* и выдерживали при комнатной температуре в течение 5 суток. Через каждые сутки культивирования определяли интенсивность метаболизма рисового гриба по накоплению промежуточных (катаболитов) и конечных (метаболитов) продуктов его обмена веществ: редуцирующих веществ, этилового спирта, летучих кислот, изменению содержания сухих веществ (отброя), титруемой кислотности среды как важнейших показателей качества безалкогольных напитков брожения. Кроме того, определяли активность фермента β-фруктофуранозидазы, гидролизующего основной углевод питательной среды – сахарозу. Полученные результаты представлены на рисунках 1–6.

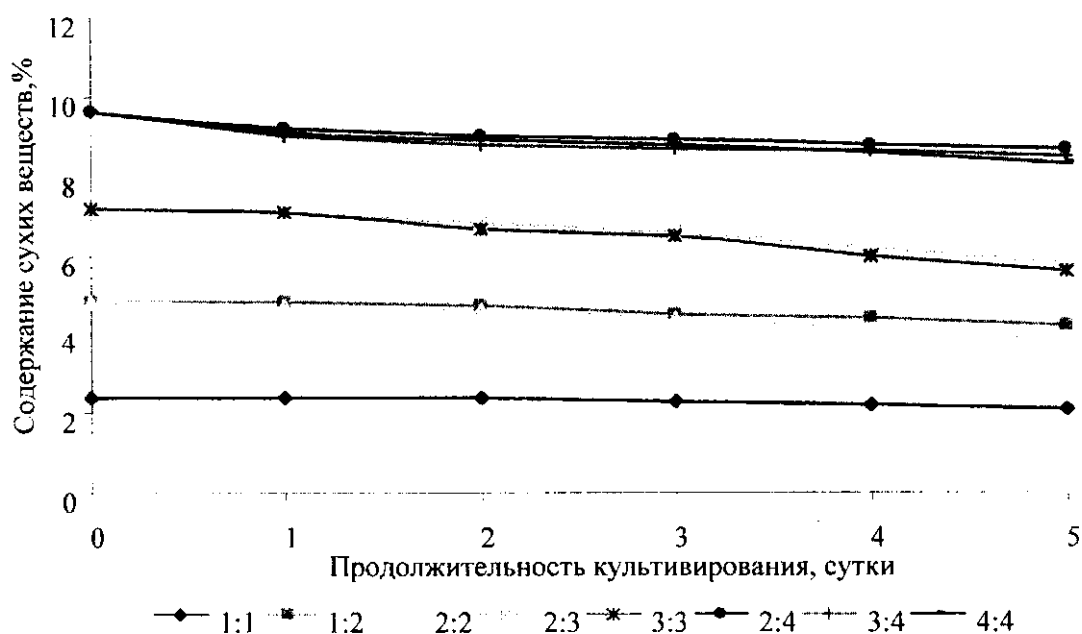


Рисунок 1— Влияние весовых частей рисового гриба *Oryzomyces indicī* и сахарозы в 1 дм³ воды на содержание сухих веществ в питательной среде

Из данных, представленных на рисунке 1, следует, что динамика изменения сухих веществ в питательной среде носила прямолинейный характер и характеризовалась снижением их содержания в течение всего периода брожения. Наиболее интенсивно этот процесс происходил в средах с весовым количеством компонентов 2:2; 2:3 и 3:3 (отброд при данных концентрациях составлял соответственно 1,1; 1,0; 1,6%), что, вероятно, объясняется более высокой скоростью потребления моносахаридов клетками рисового гриба *Oryzomyces indicī*.

Динамика изменения содержания редуцирующих веществ, представленная на рисунке 2, характеризовалась параболической зависимостью – увеличением их количества в первый период брожения и последующим снижением – к концу ферментации. Такая зависимость является вполне логичной: накопление наиболее легко усвояемых сахаров в первый период брожения, источником которых является сахароза, сменяется их утилизацией на конструктивные и энергетические процессы клеток рисового гриба.

Максимальное образование редуцирующих веществ наблюдалось в питательных средах с весовыми количествами компонентов 3:3, 2:2 и 2:3 и к концу третьих суток культивирования составляло соответственно 4,94; 4,62; 4,23 г/100 см³. Это коррелирует с проявлением на третьи сутки брожения наиболее высокой активности адаптивного фермента β-фруктофуранозидазы, составлявшей соответственно 8,3; 7,8 и 6,7 ед/г (рисунок 3).

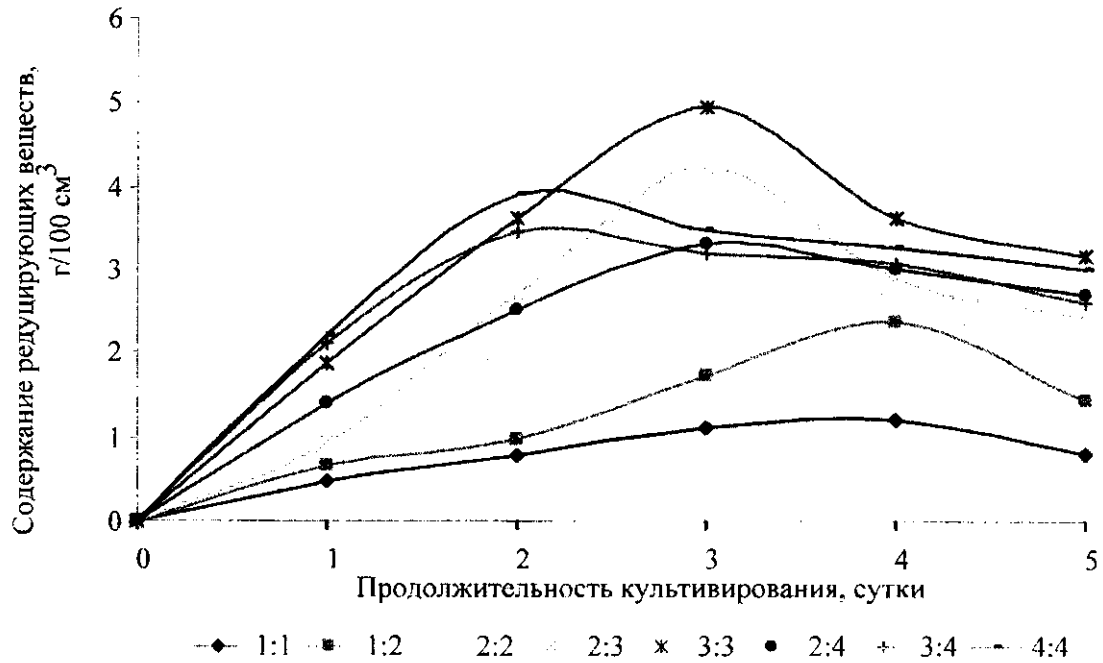


Рисунок 2 – Влияние весовых частей рисового гриба *Oryzamyces indicis* и сахарозы в 1 дм³ воды на содержание редуцирующих веществ в питательной среде

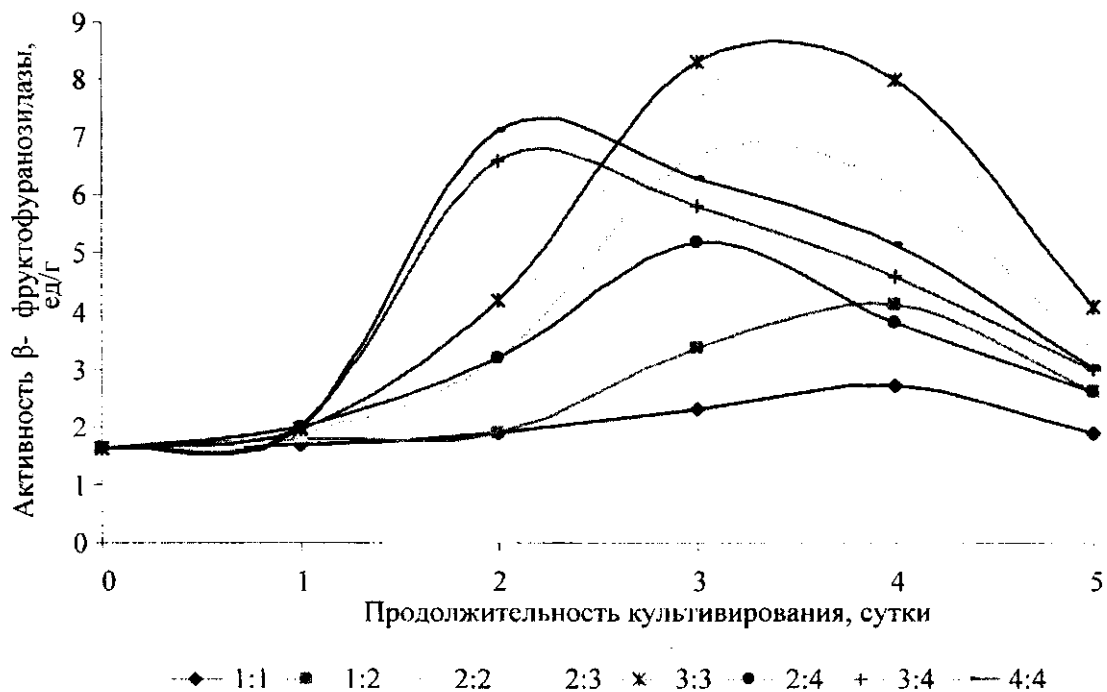


Рисунок 3 – Влияние весовых частей рисового гриба *Oryzamyces indicis* и сахарозы в 1 дм³ воды на активность β-фруктофуранозидазы

В средах с весовым количеством компонентов 1:1 и 1:2 увеличение содержания редуцирующих веществ наблюдалось несколько позднее (к четвертым суткам культивирования соответственно 1,21 и 2,36 г/100 см³), чем в питательных средах с вышеуказанным весовым количеством компонентов среды и рисового гриба. Вероятно, это является следствием «недостатка» сбраживающего компонента *Oryzamyces indicis*. Полученные результаты согласуются с литературными данными по ферментативному катализу, согласно которым скорость ферментативной реакции значительно снижается как при недостатке фермента, так и при его избытке [7, 8].

Образование редуцирующих веществ в питательных средах с весовым количеством ком-

понентов 2:4; 3:4 и 4:4 также происходило параболически, но с точкой экстремума на вторые сутки при весовом количестве компонентов 3:4 и 4:4 (соответственно 3,46 и 3,90 г/100 см³), а при весовом количестве 2:4 (3,31 г/100 см³) – на третьи сутки культивирования.

Причем содержание редуцирующих веществ в данных питательных средах, несмотря на изначально более высокую концентрацию сахарозы в среде, было существенно ниже (от 3,31 до 3,90 г/100 см³), чем в средах с более низкой концентрацией исходных сухих веществ (например, при весовом количестве компонентов 3:3, 2:2 и 2:3), что, по-видимому, является следствием недостаточности концентрации сбраживающего компонента по отношению к субстрату (сахарозе).

Одним из катаболитов рисового гриба являются летучие кислоты (уксусная, масляная, пропионовая, валерьяновая, изовалерьяновая и др.), превалирующей из которых является уксусная. Это обусловлено наличием в составе рисового гриба *Oryzomyces indicis* уксуснокислых бактерий, продуктом жизнедеятельности которых является данная кислота.

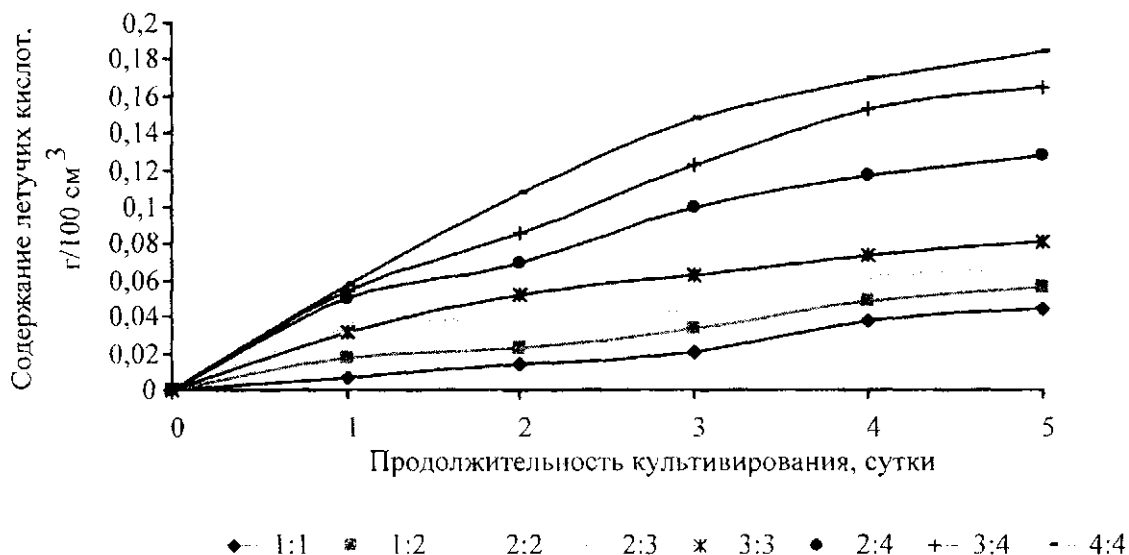


Рисунок 4 – Влияние весовых частей рисового гриба *Oryzomyces indicis* и сахарозы в 1 дм³ воды на содержание летучих кислот в питательной среде

Как следует из данных, представленных на рисунке 4, динамика образования летучих кислот, в отличие от редуцирующих веществ, характеризовалась прямолинейной зависимостью, выражающейся в увеличении их содержания с течением времени культивирования рисового гриба. Причем по мере повышения исходной концентрации сухих веществ и сбраживающего компонента в питательной среде происходило увеличение концентрации летучих кислот.

Наиболее интенсивно процесс образования летучих кислот происходил в средах с весовым количеством компонентов 2:4, 3:4 и 4:4 (соответственно 0,128; 0,165; 0,185 г/100 см³), что приводило соответственно и к более высокой титруемой кислотности данных питательных сред. Как видно из данных, представленных на рисунке 5, титруемая кислотность при вышеуказанных соотношениях концентраций к пятым суткам ферментации составляла от 2,2 до 3,0 см³ 1 моль/дм³ NaOH на 100 см³ среды.

Данный аспект имеет весьма существенное значение, так как кислотность среды является одним из определяющих факторов, оказывающих влияние на формирование органолептических показателей готового напитка.

Из графиков, представленных на рисунке 6, следует, что этиловый спирт как один из основных продуктов жизнедеятельности дрожжевых клеток обнаруживался на вторые сутки в средах с весовым количеством компонентов 3:4 и 4:4 и на третьи сутки – во всех других исследуемых случаях.

Максимальное накопление этанола отмечалась на четвертые сутки культивирования в пи-

тательных средах с весовым количеством компонентов 3:3; 2:2 и 2:3 (соответственно 0,29, 0,22 и 0,20% об); минимальное – в среде с весовым количеством компонентов 1:1, составившее 0,06% об. Наблюдаемое снижение содержания этилового спирта при увеличении концентрации рисового гриба и сахарозы в питательной среде (весовые количества компонентов 2:4, 3:4 и 4:4) объясняется, вероятно, усиленным окислением образовавшегося этанола в уксусную кислоту уксуснокислыми бактериями, входящими в состав рисового гриба *Oryzomyces indicii*. Это вполне коррелирует с увеличением титруемой кислотности сред, наблюдаемой при данных весовых количествах компонентов (от 2,20 до 2,97 см³ 1 моль/дм³ NaOH на 100 см³ среды).

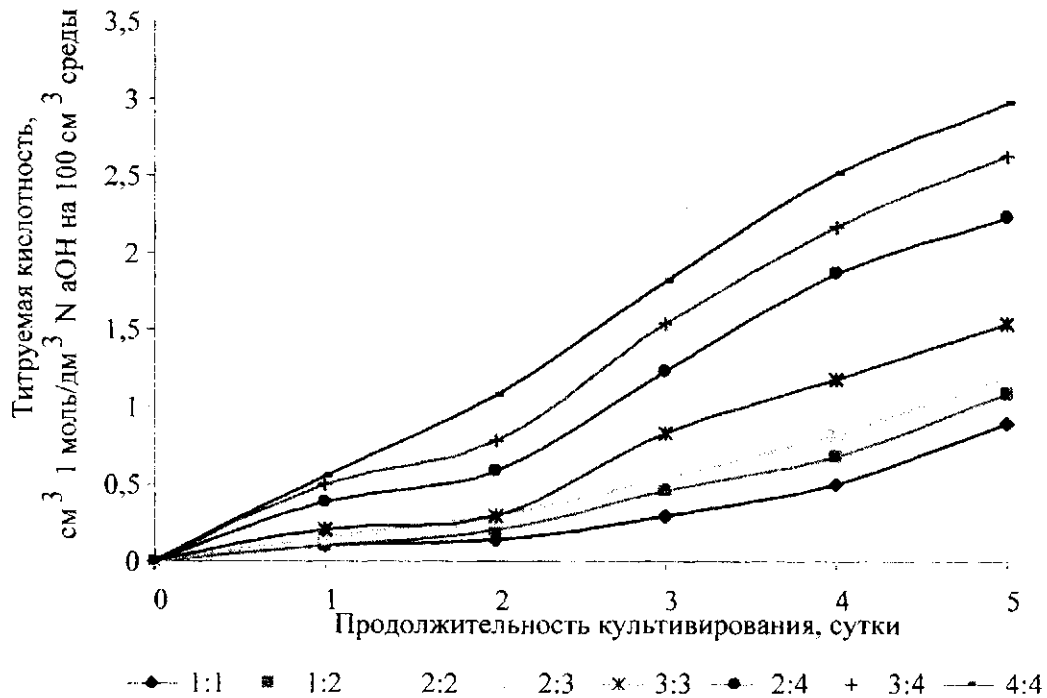


Рисунок 5 – Влияние весовых частей рисового гриба *Oryzomyces indicii* и сахарозы в 1 дм³ воды на титруемую кислотность питательной среды

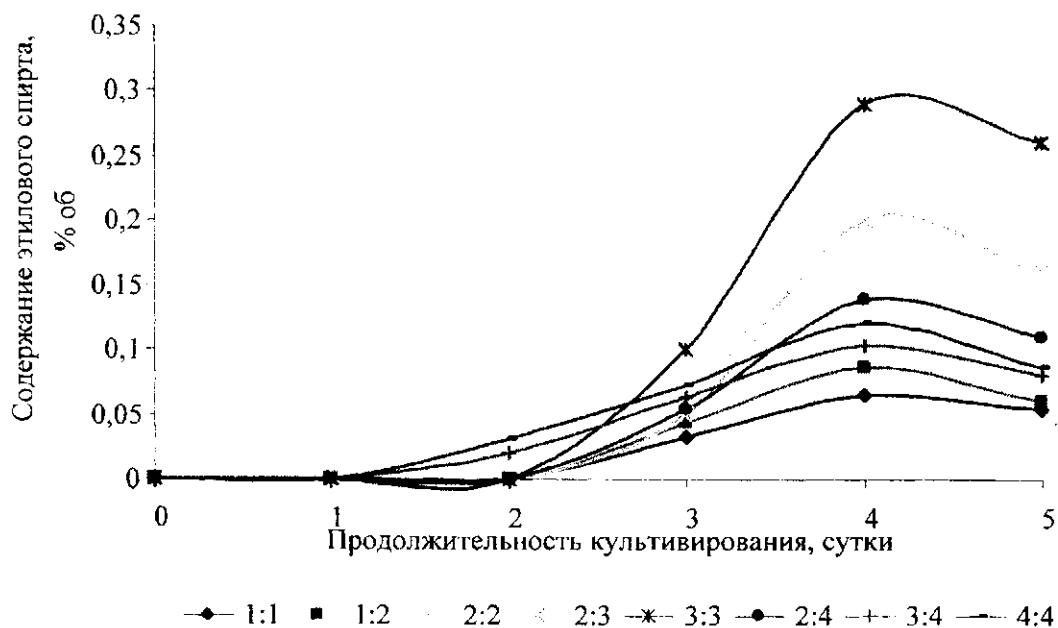


Рисунок 6 – Влияние весовых частей рисового гриба *Oryzomyces indicii* и сахарозы в 1 дм³ воды на содержание этилового спирта в питательной среде

Такая различная динамика образования метаболитов и катаболитов при культивировании изучаемой биокультуры микроорганизмов рисового гриба *Oryzomyces indicī* объясняется тем, что живые клетки представляют собой открытые системы, постоянно обменивающиеся веществами и энергией с окружающей средой и никогда не достигающие состояния полного равновесия [9]. Живая клетка в каждый временной момент находится в стационарном состоянии, при котором определенной скорости «притока» веществ и энергии соответствует определенная скорость «оттока», что и подтверждают наши исследования.

Накопление образовавшихся метаболитов в ходе жизнедеятельности рисового гриба зависело не только от соотношения весовых количеств рисовый гриб:сахароза, но и от продолжительности культивирования сбраживающего компонента. Исходя из этого представляло интерес определить вкусовые показатели сброженных рисовым грибом субстратов, которые впоследствии будут определять органолептический фон получаемых напитков брожения. Гармоничность вкусовых ощущений оценивали по соотношению кислотности и сладости напитка (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние продолжительности культивирования и весовых частей сбраживающего компонента и сахарозы на вкусовые свойства сброженных питательных сред

Весовые части рисовый гриб:сахароза в 1 дм ³ воды	Продолжительность культивирования, сутки				
	1	2	3	4	5
1:1	-	-	-	-	-
1:2	-	-	-	-	-
2:2	-	-	++	-	-
2:3	-	-	+ -	-	-
3:3	-	-	++	-	-
2:4	-	+ -	-	-	-
3:4	-	+ -	-	-	-
4:4	-	+ -	-	-	-

(++) – гармоничный вкус

(+ -) – недостаточно гармоничный вкус

(-) – негармоничный вкус

Анализ полученных результатов исследований показал, что оптимальной питательной средой для культивирования рисового гриба *Oryzomyces indicī* является среда с весовым соотношением рисовый гриб:сахароза – 2:2/дм³ и 3:3/ дм³, продолжительность культивирования трое суток. Именно при данных весовых частях сбраживающего и углеводного компонентов питательной среды и срока культивирования жизнедеятельность рисового гриба находилась в стадии наивысшей активности, и сброженные среды приобретали наиболее гармоничные вкусовые качества.

Дальнейшее увеличение сроков брожения приводило к значительному увеличению титруемой кислотности, что негативно сказывалось на органолептических свойствах продукта.

Таким образом, в результате экспериментальных исследований установлено, что весовые количества сбраживающего компонента и сахарозы существенно влияют на характер обмена веществ биокультуры, что выражалось в различном содержании катаболитов и метаболитов в питательной среде при культивировании рисового гриба *Oryzomyces indicī*.

Заключение

Получены новые данные об оптимальном составе питательной среды для культивирования рисового гриба *Oryzomyces indicī*, используемого в качестве сбраживающего компонента при производстве безалкогольных напитков брожения. Установлено, что наиболее интенсивные обменные процессы в биокультуре наблюдались при весовых количествах рисового гри-

ба и сахарозы в граммах на 1 дм³ питательной среды – 48 и 48 или 72 и 72, что соответствует их весовому соотношению 2:2/дм³ и 3:3/дм³, оптимальное время культивирования – трое суток.

Литература

- 1 Матвеев, В.Е. Научные основы микробиологической технологии / В.Е. Матвеев. – М.: Агропромиздат, 1985. – 224 с.
- 2 Безбородов, А.М. Биохимические основы микробиологического синтеза / А.М. Безбородов. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1984. – 304 с.
- 3 Голубев, В.Н. Пищевая биотехнология / В.Н. Голубев, И.Н. Жиганов. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 123 с.
- 4 Рогов, И.А. Пищевая биотехнология: В 4 кн. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Г.П. Шуваева. – М.: КолосС, 2004. – 440 с.
- 5 Цед, Е.А. Рисовый гриб – основа безалкогольных напитков / Е.А. Цед, Л.М. Королева, В.Л. Прибыльский, Л.И. Рыдвская. // Пиво и напитки. – 2001. – №5. – С.38.
- 6 Королева, Л.М. Идентификация микробного состава поликультуры рисового гриба как основы получения ферментированных безалкогольных напитков / Л.М. Королева, Е.А. Цед, Н.К. Коваленко, С.С. Нагорная // Пиво и напитки. – 2007. – №2. – С.40–42.
- 7 Ленинджер, А. Биохимия / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1974. – 957 с.
- 8 Мудрецова-Висс, К.А. Микробиология: учебник для товаровед. и технол. фак. торг. вузов. / К.А. Мудрецова-Висс. – 5-е изд. – М.: Экономика, 1985. – 256 с.
- 9 Коновалов, С.А. Биохимия дрожжей / С.А. Коновалов. – М.: Пищевая пром-сть, 1980. – 271 с.

Поступила в редакцию 24.11.2010