

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПОЛУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЗАТА РИСОВОГО ГРИБА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЕГО В СПИРТОВОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

*Е.А. Цед, З.В. Василенко, Л.М. Королева, С.В. Волкова,
А.Н. Мыслицкая, Д.О. Ткаченко*

Экспериментально исследовано влияние концентраций сахарозы и сбраживающего компонента в питательной среде на гидролитическую способность и химический состав метаболита, получаемого в ходе ферментации питательной среды рисовым грибом *Oryzomyces indicī*. Установлено, что метаболит рисового гриба обладает всеми видами гидролитической активности, которые необходимы для биоконверсии веществ спиртового сула при получении пищевого этилового спирта.

Введение

Метаболит представляет собой культуральную жидкость, образующуюся в ходе жизнедеятельности рисового гриба *Oryzomyces indicī*, который является сложной ассоциативной полисимбиотической культурой микроорганизмов. Микробный состав рисового гриба представлен двумя видами дрожжей (*Zygosaccharomyces fermentati* Naganischi, *Pichia membranofaciens* Hansen), двумя видами молочнокислых (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*) и одним видом уксуснокислых (*Acetobacter aceti*) бактерий [1].

Развиваясь в замкнутой системе – микробиоценозе, указанные микроорганизмы обогащают питательный субстрат не только основными продуктами своей жизнедеятельности (этиловый спирт, молочная, уксусная кислоты), но и целым рядом других биологически ценных веществ – витаминами (В₁, В₂, В₃, В₉, В₅, Е, С), аминокислотами (серин, треонин, глицин, аланин, аргинин, пролин, валин, метионин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, цистеин, лизин, гистидин, тирозин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты) и т.д. [2,3]. Учитывая, что адаптационные возможности любого живого существа связаны со способностью продуцировать индуцибельные гидролитические ферменты, расширяющие его пищевой диапазон, то можно предположить наличие такой способности у рисового гриба как биокультуры, сложившейся в ходе длительной эволюции и сохранившейся по настоящее время. Наличие такой ферментативной способности позволит расширить сегмент использования рисового гриба в пищевой и, в частности, в спиртовой промышленности, в которой при получении спиртового сула широко применяются гидролитические ферменты.

Химический состав метаболита и его ферментативная активность напрямую зависят от интенсивности обмена веществ микрофлоры рисового гриба, который в свою очередь лимитируется составом применяемой для культивирования указанной биокультуры питательной среды. В связи с этим целью настоящей работы являлись исследования по оптимизации состава питательной среды для получения метаболита рисового гриба с высокой концентрацией гидролитических ферментов, принимающих участие в процессах подготовки спиртового сула к сбраживанию.

Результаты исследований и их обсуждение

В первой части нашей работы были проведены исследования по определению влияния концентрации сухих веществ питательного субстрата, используемого для жизнедеятельности рисового гриба, на уровень амилолитической (АС), осахаривающей (ОС), протеолитической (ПС) и декстринолитической (ДС) способности получаемого метаболита.

Для этого были приготовлены питательные среды с концентрацией сухих веществ в

диапазоне от 0,5 % до 2 %. Затем в питательную среду вносили рисовый гриб в количестве 24 г/дм³, что было принято за 1 условную весовую единицу, и виноград сушеный согласно ранее подобранной концентрации – 3 г/дм³ [4]. Затем полученные пробы термостатировали при температуре 30 °С в течении 5-ти суток. По истечении каждых суток культивирования в метаболизате определяли физико-химические показатели – содержание сухих веществ, редуцирующих веществ, аминного азота, титруемую кислотность. Полученные результаты представлены на рисунках 1–8.

Анализ экспериментальных данных показал, что амилолитическая активность в метаболизате изменялась в течение всего времени культивирования рисового гриба, причем наибольшее ее значение обнаруживалось на первые-вторые сутки культивирования и существенное ее снижение – к пятым суткам ферментации (рисунок 1). Максимальное значение АС (7,214 ед/г) в исследуемом метаболизате наблюдалось на вторые сутки культивирования при концентрации сухих веществ питательной среды – 2 %.

Динамика изменения ОС и ДС метаболизата (рисунки 2,3) была аналогична динамике изменения амилолитической способности. Указанные активности увеличивались на первые-вторые сутки культивирования и снижались – к пятым суткам. Наибольшее значение ОС и ДС (соответственно 10,87–12,55 и 0,09–0,11 ед/г) наблюдалось при начальной концентрации сухих веществ в питательной среде 2 %.

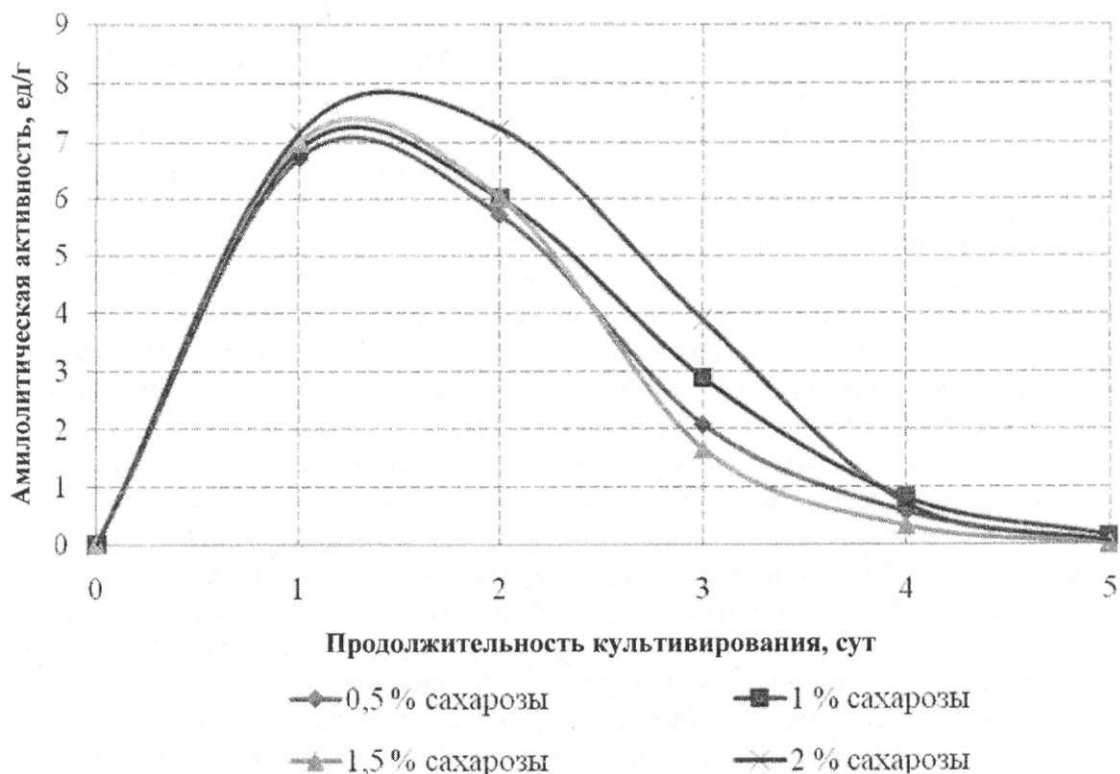


Рисунок 1 – Влияние концентрации сахарозы в питательной среде на амилолитическую активность получаемого метаболизата

Протеолитическая активность, представленная на рисунке 4, во всех исследуемых случаях возрастала ко вторым суткам культивирования, и затем постепенно снижалась к пятым. Максимальное значение протеолитической активности (67,4 ед/г) наблюдалось при использовании питательной среды с содержанием сухих веществ – 2 %.

Полученные экспериментальные данные показывают, что метаболизат рисового гриба характеризуется значительной ферментативной способностью, проявляющейся на первые-вторые сутки культивирования биокультуры при концентрации сухих веществ в питательной среде 2 %.

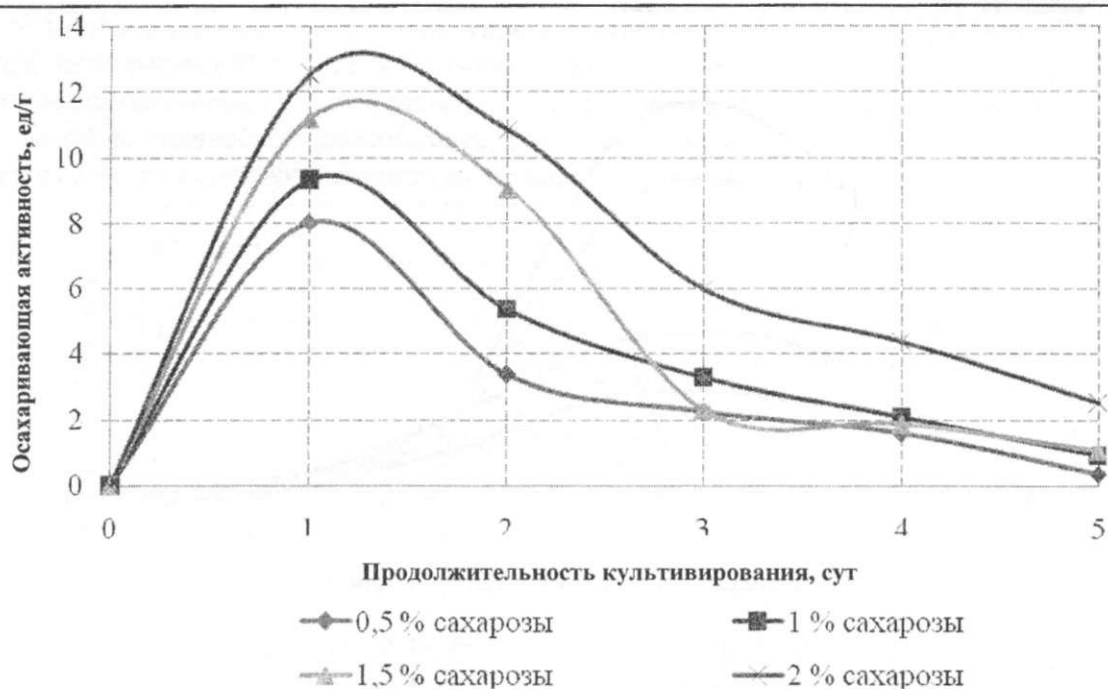


Рисунок 2 – Влияние концентрации сахарозы в питательной среде на осаживающую активность получаемого метаболита

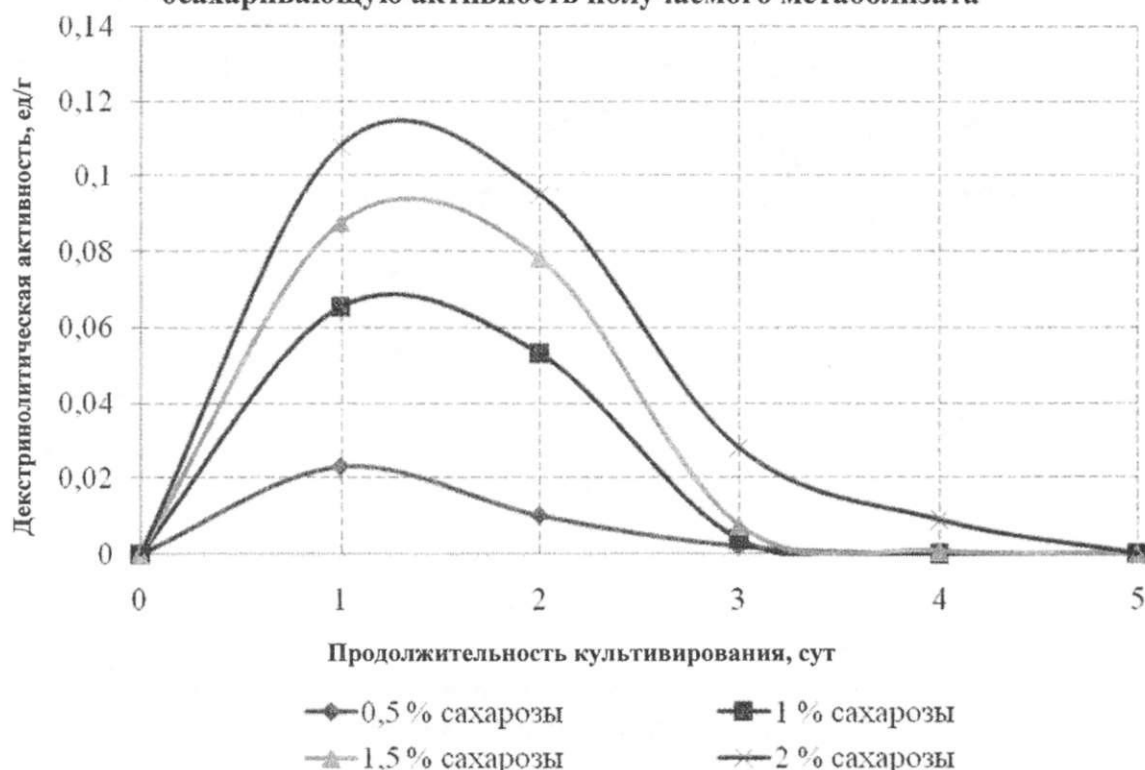


Рисунок 3 – Влияние концентрации сахарозы в питательной среде на декстринолитическую активность получаемого метаболита

Анализ физико-химических показателей метаболита рисового гриба, представленный на рисунках 5–7, показал, что с течением времени культивирования биокультуры происходило изменение химического состава исследуемого метаболита, что связано с обменными процессами микроорганизмов, входящих в состав рисового гриба.

Так, содержание редуцирующих веществ (рисунок 5) возрастало во всех исследуемых образцах ко вторым суткам культивирования, причем наибольшее их образование (0,49 г/100 см³) отмечалось в образце с начальным содержанием сухих веществ 2%.

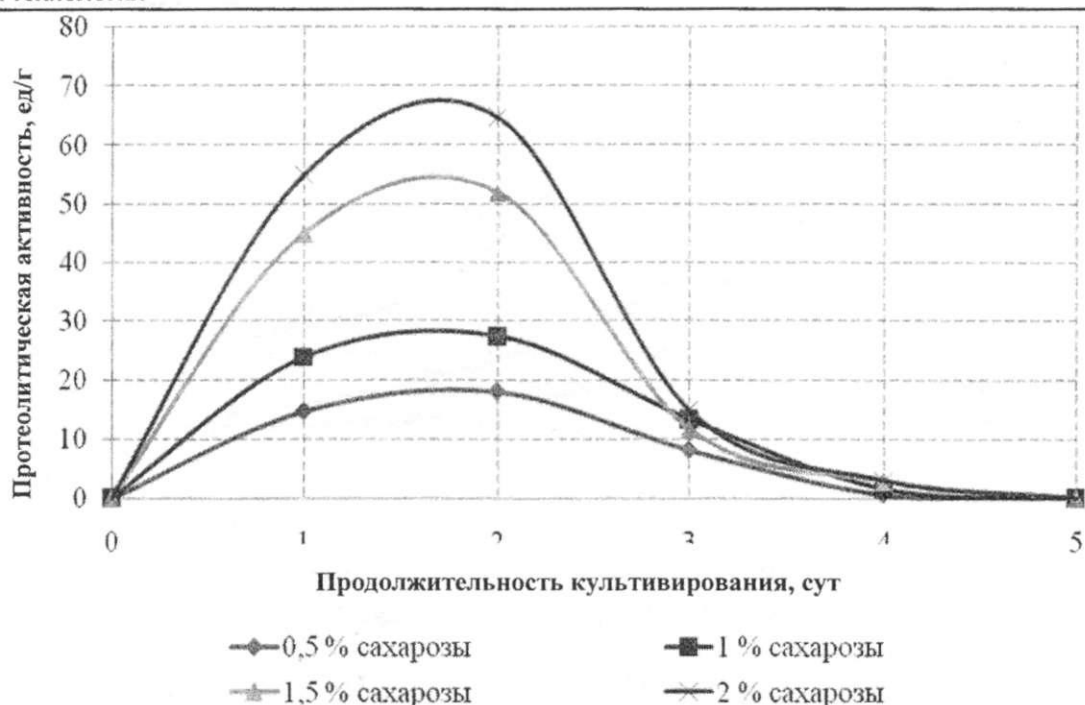


Рисунок 4 – Влияние концентрации сахарозы в питательной среде на протеолитическую активность получаемого метаболита

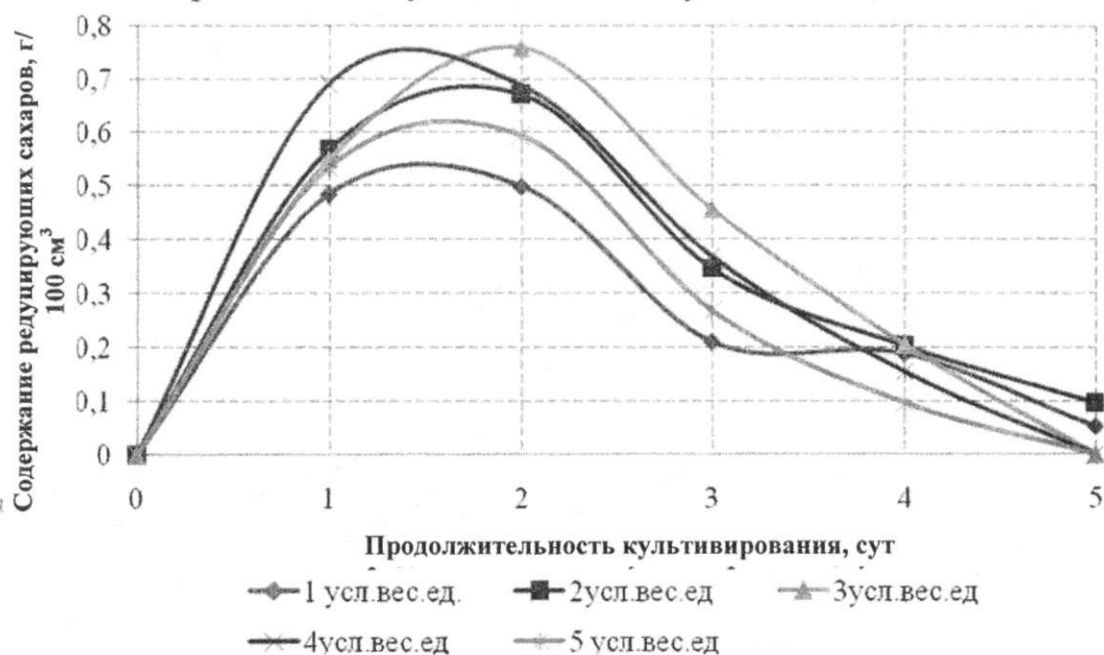


Рисунок 5 – Влияние концентрации сахарозы в питательной среде на содержание редуцирующих веществ в метаболите рисового гриба

Динамика изменения аминного азота в метаболите рисового гриба была неоднородной: его концентрация увеличивалась ко вторым суткам культивирования, несколько уменьшалась – к третьим суткам и возрастала к пятым суткам ферментации (рисунок 6). Максимальное содержание аминного азота ($115,36 \text{ мг}/100 \text{ см}^3$) отмечалось в метаболите вторых суток культивирования с начальным содержанием сухих веществ в сусле 2 %.

С увеличением продолжительности культивирования рисового гриба происходило увеличение титруемой кислотности, что обусловлено накоплением органических кислот (уксусная, масляная, пропионовая, валерьяновая, изовалерьяновая), продуцируемых молочнокислыми и уксуснокислыми бактериями, входящими в состав данной поликультуры.

Совокупность полученных экспериментальных данных показал, что жизнедеятельность

биокультуры рисового гриба существенно зависит от исходных параметров питательной среды, используемой для ее культивирования. Оптимальной концентрацией углеводного компонента (сахарозы) в питательной среде, при которой наблюдается максимальное значение как гидролитической способности, так и физико-химических показателей метаболита является 2 %, а продолжительность культивирования составляет двое суток.

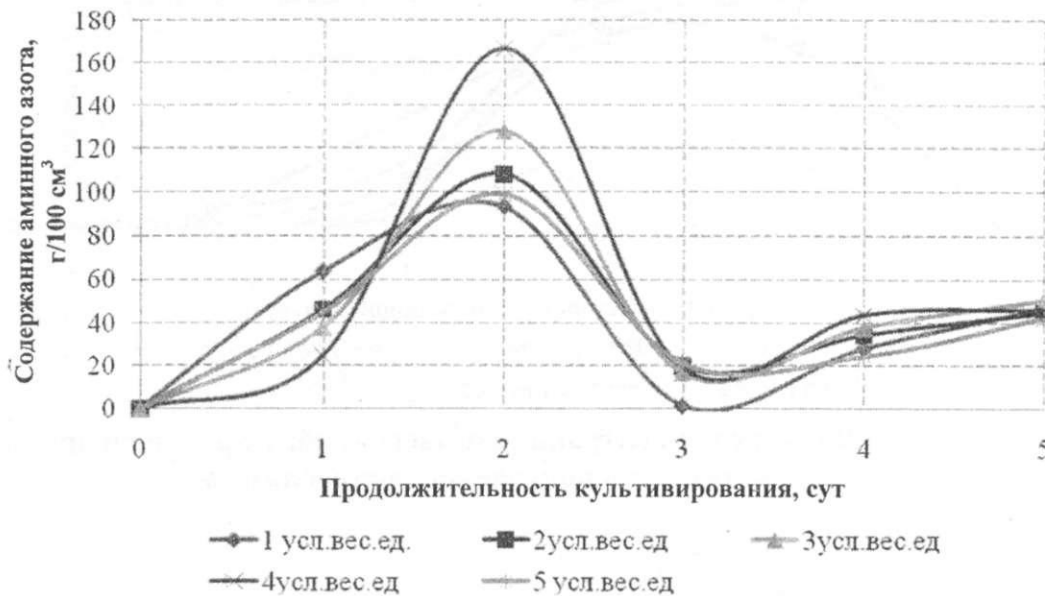


Рисунок 6 – Влияние концентрации сахарозы в питательной среде на содержание аминного азота в метаболите рисового гриба

Согласно теории ферментативного катализа, скорость ферментативных реакций в клетке зависит как от концентрации субстрата, на который действует фермент, так и от концентрации самого фермента [5]. Учитывая сложность микробного состава изучаемой биокультуры, необходимо было исследовать влияние концентрации сбраживающего компонента – рисового гриба – на ферментативную активность получаемого метаболита и его физико-химические параметры. Для этого готовили питательные среды с оптимально подобранными концентрациями: сахарозы – 2 %, винограда сушеного – 3 г/дм³, в которые затем вносили рисовый гриб в количестве от одной до пяти условных весовых единиц.

По истечении каждых суток культивирования в метаболите определяли аналогичные предыдущим исследованиям показатели: гидролитическую способность (АС, ОС, ДС, ПС) и физико-химические параметры (содержание сухих веществ, редуцирующих веществ, аминного азота, титруемую кислотность). Результаты исследований представлены на рисунках 7–10. Анализ данных показал, что концентрация рисового гриба оказывает существенное влияние на изменение гидролитической способности метаболита. Так, наибольшее значение амилолитической активности в метаболите обнаруживалось при внесении трех условных весовых единиц сбраживающего компонента и продолжительности культивирования в одни-двое суток (рисунок 7).

Аналогичная динамика отмечалась и в отношении осаживающей и декстринолитической способностей: наибольшие их значения, составившие соответственно 16,27–17,66 и 0,36–0,37 ед/г, приходилось на первые-вторые сутки ферментации, но при использовании рисового гриба в концентрации четыре условные весовые единицы (рисунки 8,9).

Заслуживает особого внимания установленный нами факт наличия высокой протеолитической способности исследуемого метаболита. Это связано с тем, что ферментативный протеолиз обеспечивает полноценность питательной среды по азотному питанию для дрожжевых клеток, которые осуществляют процесс спиртового брожения. Максимальное значение ПС наблюдалось на вторые сутки культивирования при концентрации сбраживающего компонента – четыре условные весовые единицы (410,66 ед/г) (рисунок 10).

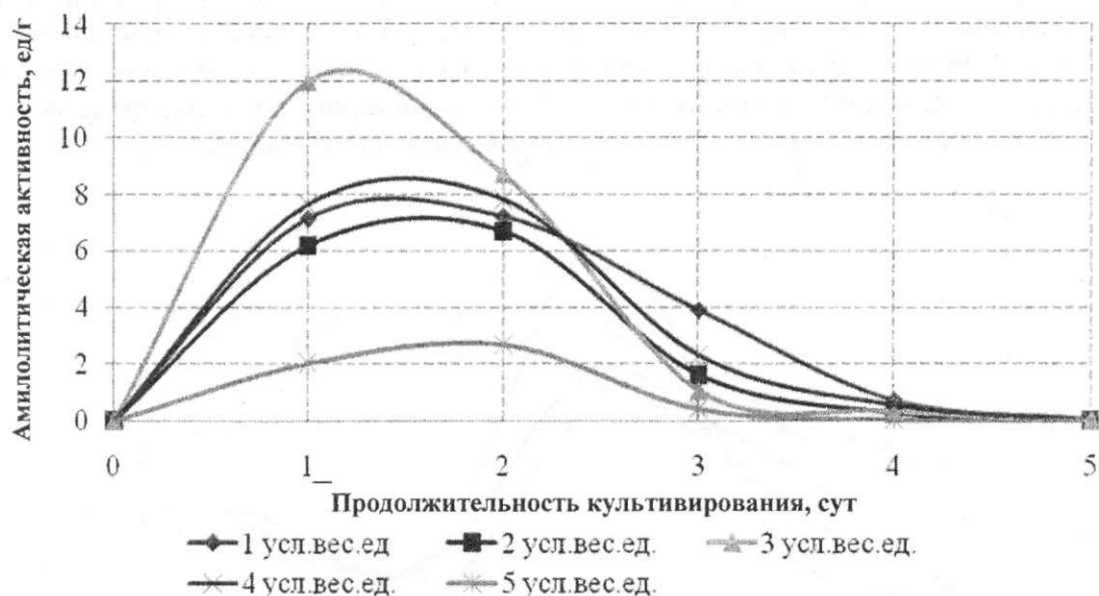


Рисунок 7 – Влияние концентрации рисового гриба на амилолитическую активность получаемого метаболита

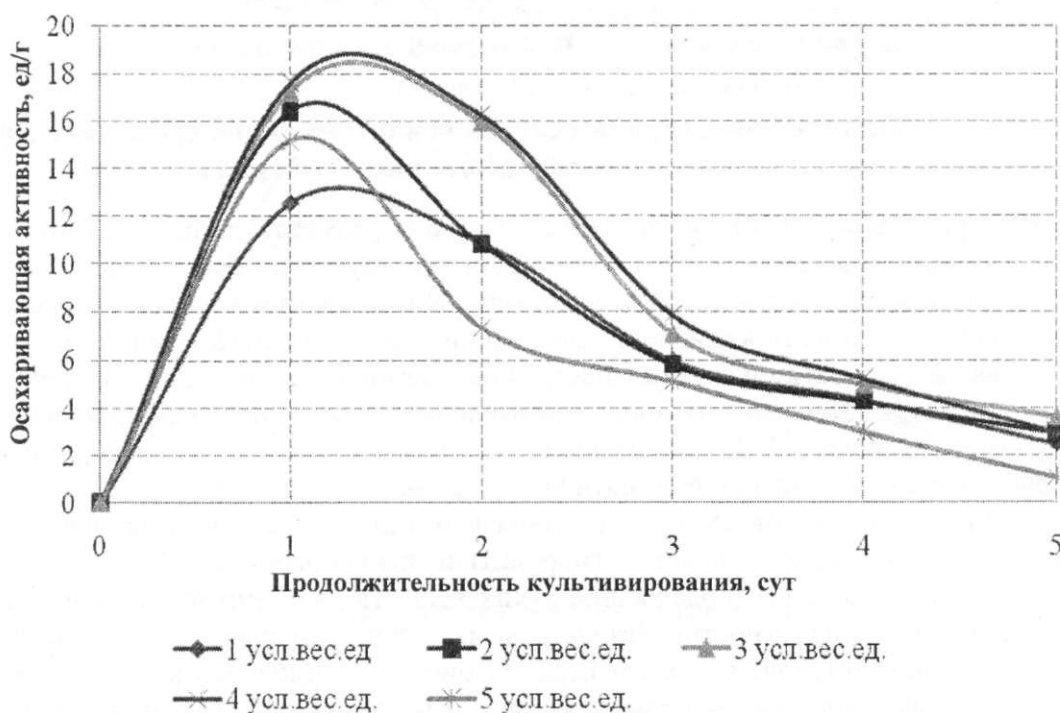


Рисунок 8 – Влияние концентрации рисового гриба на осажаривающую активность получаемого метаболита

Из полученных экспериментальных данных следует, что гидролитическая способность метаболита рисового гриба зависит не только от концентрации углеводного компонента питательной среды, в которой развивается рисовый гриб, но и от его концентрации в ней.

Наибольшая ферментативная способность метаболита проявлялась при внесении сбраживающего компонента в количестве четыре условные весовые единицы на первые-вторые сутки культивирования.

Анализ физико-химических параметров метаболита рисового гриба показал, что степень изменения химического состава культуральной среды также зависела от концентрации внесенного рисового гриба: наиболее активные обменные процессы в биокультуре происходили

в питательной среде при концентрации рисового гриба три-четыре условные весовые единицы. Из выше сказанного следует, что наибольшей ферментативной способностью и наилучшими физико-химическими показателями характеризовался метаболит рисового гриба, полученный при внесении в культуральную среду сбраживающего компонента в количестве трех-четырех условных весовых единиц рисового гриба, что соответствует его концентрации 72–96 г/дм³.

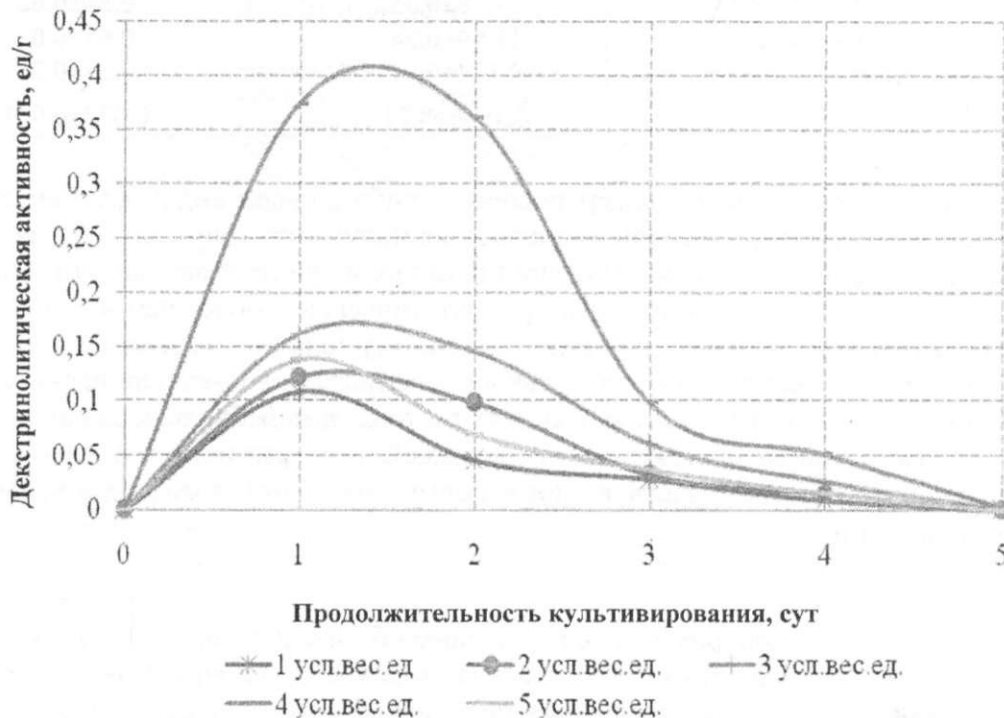


Рисунок 9 – Влияние концентрации рисового гриба на декстринолитическую активность получаемого метаболита

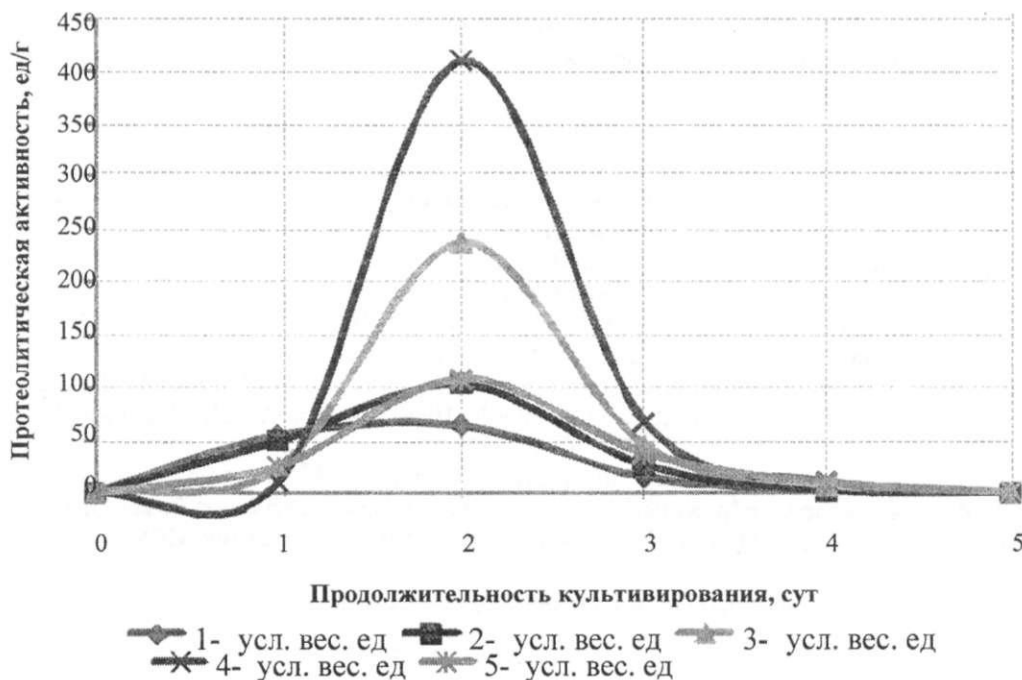


Рисунок 10 – Влияние концентрации рисового гриба на протеолитическую активность получаемого метаболита

Сравнительный анализ ферментативной способности метаболита рисового гриба и солодового молока, традиционно используемого в спиртовом производстве в качестве осаживающего

вающего средства, представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Ферментативная способность метаболита рисового гриба

Наименование исследуемых показателей	Метаболит рисового гриба	Контроль (ячменное солодовое молоко)
Осахаривающая активность, ед/г	17,66±0,35	0,84±0,02
Амилолитическая активность, ед/г	11,99±0,24	0,67±0,02
Декстринолитическая активность, ед/г	0,374±0,01	0,57±0,01
Протеолитическая активность, ед/г	410,66±8,21	0,032±0,001

Как видно из таблицы 1, метаболит рисового гриба по всем видам ферментативных активностей, имеющих принципиальное значение для получения спиртового суслу, значительно превосходит ячменное солодовое молоко: по амилолитической активности – в 17 раз, по осаживающей – в 21 раз, по активности протеолитической – более чем в 12800 раз и лишь по декстринолитической активности уступал ячменному солодовому молоку.

Таким образом, метаболит рисового гриба можно рассматривать как ценный компонент для спиртового производства не только за счет наличия в нем биологических активных веществ необходимых для жизнедеятельности дрожжей, но и как источник целого комплекса гидролитических ферментов, участвующих в подготовке спиртового суслу к сбраживанию дрожжевыми клетками.

Заключение

Представлены новые экспериментальные данные об оптимальных технологических параметрах получения метаболита рисового гриба, характеризующегося ферментативной активностью – амилолитической, осаживающей, декстринолитической, протеолитической, значительно превосходящей активность ячменного солодового молока. Установлено, что наиболее ценные применительно к спиртовому производству биохимические и физико-химические показатели метаболита рисового гриба, формируются при следующих оптимальных параметрах культивирования: концентрация сахарозы – 2 %, концентрация рисового гриба – 72–96 г/дм³, виноград сушеный – 3 г/дм³, продолжительность культивирования – один-два суток.

Литература

- 1 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.
- 2 Королева, Л. М. Рисовый гриб как продуцент биологически ценных веществ при получении натуральных безалкогольных напитков брожения / Л.М. Королева, З.В. Василенко, Е.А. Цед, С.В. Волкова, А.А. Миронцева, Т.М. Тананайко // Пиво и напитки. – 2010. – №4. – С.12–13.
- 3 Elena Tsed, Zoya Basilenko, Lidia Koroleva, Elena Lebedok, Irina Ivanova NEW FERMENTATION SOURCE IN THE TECHNOLOGY OF FERMENTED NON-ALCOHOLIC BEVERAGES /Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW. Agriculture №52. – 2008. – 52. – С. 103–106.
- 4 Королева, Л.М. Оптимизация состава питательной среды для культивирования рисового гриба *Oryzomyces indicī* как нового сбраживающего компонента для получения безалкогольных напитков брожения / Л.М.Королева, Е.А. Цед, З.В. Василенко, С.В. Волкова // Вестник МГУП. – 2010. – № 2 (9). – С.43-49.
- 5 Варфоломеев, С.Д. Современные проблемы биокинетики / С.Д. Варфоломеев. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987. – 256 с.

Поступила в редакцию 28.06.2011