

УДК 573.4+612.014.464

ВЛИЯНИЕ ОЗОНИРОВАНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ЭТИЛОВОГО СПИРТА В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *MEDUSOMYCES GISEVII* (ЧАЙНЫЙ ГРИБ) ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

**Добрыня Ю.М., Бондарева Н.И., Аванесян С.С., Тимченко Л.Д.,
Симечёва Е.И., Ржепаковский И.В.**

*ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет»,
Ставрополь, e-mail: dobruniajulia@rambler.ru*

На основании анализа литературных источников установлено, что природный симбионт *Medusomyces gisevii* является ценным биотехнологическим объектом. Актуальным является поиск способов воздействия на него с целью получения тех или иных продуктов его жизнедеятельности, в частности большой объем его зооглеи. Однако возникает вопрос о воздействии различных стимулирующих факторов на метаболизм симбионта, одним из важнейших показателей которого является содержание этилового спирта в его культуральной жидкости. Проведены исследования концентрации этанола в культуральной жидкости чайного гриба под влиянием озонирования и двух температурных режимов. Установлено, что спирт обнаруживается во всех пробах культуральной жидкости чайного гриба в течение всего периода культивирования независимо от концентрации озона в питательной среде и температуры. Однако культивирование как в озонированных средах, так и без озона в условиях повышенного температурного режима приводит к значительному снижению, почти на порядок, концентраций этилового спирта в культуральных жидкостях по сравнению с режимом 20°C, что может свидетельствовать о нарушении симбиоза при данных условиях.

Ключевые слова: симбионт *Medusomyces gisevii*, чайный гриб, озон, этиловый спирт

THE INFLUENCE OF OZONIZATION ON ETHYL ALCOHOL CONTENT IN THE CULTURE BROTH *MEDUSOMYCES GISEVII* (TEA FUNGUS) AT DIFFERENT TEMPERATURE CONDITIONS OF CULTIVATION

**Dobrynya Y.M., Bondareva N.I., Avanesyan S.S., Timchenko L.D.,
Simecheva E.I., Rzhepakovskiy I.V.**

North-Caucasian Federal University, Stavropol, e-mail: dobruniajulia@rambler.ru

Based on the literature review found that the natural symbiont *Medusomyces gisevii* biotechnology is a valuable object. It is urgent to find ways to impact on it in order to obtain these or other products of its life activity, in particular a large amount of its zoogloea. However, there is a question about the impact of various factors stimulating the metabolism of the symbiont, one of the most important indicators of which is the ethanol content in its culture medium. Investigations of the ethanol concentration in the liquid medium under the influence of Kombucha ozonation and two temperature regimes. It is found that the alcohol is found in all samples of tea fungus culture liquid throughout the culture period, regardless of the concentration of ozone in the medium and temperature. However, cultivation in ozonized media and without using a high ozone temperature leads to a significant reduction, by nearly an order, the concentration of ethyl alcohol in liquid culture as compared to the regime 20°C, which may indicate violation symbiosis under these conditions.

Keywords: symbiont *Medusomyces gisevii*, tea fungus, Kombucha, the culture fluid, ethanol

Medusomyces gisevii или чайный гриб – это биологический объект, который представляет собой сложную микробную ассоциацию, находящуюся в естественном симбиозе в виде толстой желтовато-коричневой слоистой пленки (зооглеи), плавающей на поверхности культуральной жидкости, и пылевидного осадка на дне сосуда [3, 8]. Известно, что симбиоз чайного гриба образован дрожжами (*Zygosaccharomyces sp.*, *Saccharomyces sp.*) и бактериями, среди которых присутствуют виды рода *Acetobacter*, *Gluconobacter oxydans*, *Bacterium gluconicum*, *Torula*, *Dekkera*, *Pichia sp.* [4]. Однако отмечается, что видовой микроб-

ный состав симбионта может значительно варьироваться в зависимости от региона культивирования. Этот факт в совокупности с неидентичностью воспроизведения условий выращивания может приводить к различному компонентному составу метаболитов чайного гриба.

Имеются сообщения о достаточно широком применении чайного гриба в пищевых и лечебно-профилактических целях, что позволяет рассматривать данный биологический объект как потенциальный биообъект для биотехнологии. Чаще всего используется культуральная жидкость чайного гриба. Ее применяют в пищевой промыш-

ленности как самостоятельный напиток [7] и закваску для кисломолочных продуктов, в микробиологии как стимулятор роста микроорганизмов, в медицине как один из компонентов антителостимулирующего препарата. Есть исследователи, которые рекомендуют использовать зооглею чайного гриба в качестве экологически чистого биологически активного материала для изделий медицинского назначения [2, 7]. Однако сообщения о ее применении единичны, поэтому мы считаем, что биотехнологический потенциал зооглеи медузомицета еще не исчерпан.

Использование чайного гриба в пищевой промышленности, фармацевтике и микробиологии связано с богатым химическим составом его культуральной среды. В ней содержатся белки, липиды, сахара, витамины, ферменты, органические кислоты, этанол и т.д. [2, 8]. Имеются также сообщения о структуре зооглеи *Medusomyces gisevii*, которая состоит из культуральной жидкости, составляющей до 90% от ее общего объема, и пленки из микробиальной целлюлозы, являющейся продуктом сложных химических превращений углеводов [5], а в толще ее матрикса сосредоточены как живые, так и погибшие микроорганизмы, образующие данный симбионт [8, 9].

Метаболическая активность чайного гриба в целом определяет и биотехнологический потенциал всех составных компонентов симбионта. Учитывая вышеописанный интерес не только к жидкости, но и к зооглее симбионта, на повестку дня выступает задача повышения ее массовой доли в процессе культивирования, так как на ранних сроках выращивания, когда жидкость наиболее пригодна для использования, объем зооглеи еще не значителен. Это диктует необходимость изыскания путей стимуляции интенсивности прироста биомассы зооглеи, без ущерба для тех показателей метаболизма, которые определяют биотехнологические качества субстанции. К числу таких, по нашему мнению, можно отнести этиловый спирт, неминуемо образующийся в процессе жизнедеятельности симбионта и играющий определенную роль на каждом этапе культивирования.

Анализ кинетики накопления и утилизации метаболитов на ранних стадиях культивирования чайного гриба свидетельствует, что дрожжи и уксуснокислые бактерии за счет своих метаболитов вступают в симбиотические отношения в первые сутки совместного выращивания. Один из партнеров симбиоза – дрожжи, сбраживает субстрат до этилового спирта, который является источником питания для друго-

го – уксуснокислых бактерий [8]. Этиловый спирт накапливается с самого начала культивирования вместе с падением концентрации сахара в культуральной среде. Этанол превращается в уксусную кислоту, максимум концентрации которой приходится на минимум концентрации этанола. После достижения максимума концентрация ацетата медленно падает, по мере того как он превращается в воду и углекислый газ [8]. Благодаря этому наличие этилового спирта и уксусной кислоты в культуральной жидкости создает дополнительный барьер защиты медузомицета от обсеменения его посторонней микрофлорой. Таким образом, для *Medusomyces gisevii* содержание в культуральной жидкости этилового спирта в определенной концентрации на определенные сутки культивирования является одним из важнейших критериев нормальной жизнедеятельности данного микробного симбионта, который необходимо учитывать при подборе стимуляторов прироста зооглеи.

В качестве такого стимулирующего фактора большой интерес представляет озон, влияние которого на рост и размножение различных микроорганизмов в определенных дозах является спорным. Так, например, для *Escherichia coli* доза озона в питательной среде, равная 0,057 мг/л, является ингибирующей, а дозы 0,012 и 0,035 мг/л стимулируют рост и размножение этих бактерий [1]. А у дрожжевых клеток низкие дозы озона стимулировали Н-АТФазу, дыхание и репродуктивную способность [6].

Не менее важным условием для роста и жизнедеятельности всех микроорганизмов является температура, поэтому учет стимулирующего действия любого фактора без обеспечения оптимального температурного режима культивирования является нецелесообразным. *Medusomyces gisevii* способен развиваться в широких температурных диапазонах, поэтому для наших исследований были выбраны наименьшая и наибольшая из оптимальных температур (20 и 35°C), рекомендуемых для данного симбионта [2, 4].

Цель работы – проведение количественной оценки содержания этилового спирта в культуральной жидкости чайного гриба как показателя кинетики его метаболизма на разные сутки культивирования, под влиянием различных доз озона с учетом температурного режима.

Материалы и методы исследования

В качестве исследуемого объекта выступала культуральная жидкость *Medusomyces gisevii* (чайного гриба). Культивирование симбионта проводили на 3-х вариантах питательной среды. Первый вариант – классическая питательная среда с использованием

воды, сахарозы (10%) и экстракта чайного листа (0,1%) (*Camellia sinensis*) без озонирования, которая являлась контрольной. Два других варианта основывались на классической питательной среде, но подвергались озонированию с помощью озонатора ОВиВ (Украина) в дозах 0,025 мг в 1000 мл и 0,063 мг в 1000 мл соответственно. Готовые среды разливались по 40 мл в стерильные стеклянные колбы общей численностью 126 штук и засеивались инокулятом – культуральной жидкостью, полученной от предыдущего культивирования [2] в количестве 10% от объема среды.

Культивирование чайного гриба на каждом варианте питательной среды проводилось при двух температурных режимах (при комнатной температуре 20°C и в термостате при 35°C) и осуществлялось в течение месяца.

Определение этилового спирта в пробах культуральной жидкости чайного гриба осуществлялось газохроматографическим методом на хроматографе «Цвет-500» с пламенно-ионизационным детектором. Расчеты проводили методом абсолютной калибровки по стандартным растворам. Замеры проводились в трехкратном повторении непосредственно после засева, на 5-е, 10-е, 15-е, 20-е, 25-е, 30-е сутки культивирования.

Результаты исследований и их обсуждение

Установлено, что спирт обнаруживается во всех пробах культуральной жидкости чайного гриба в течение всего периода куль-

тивирования независимо от варианта питательной среды.

На рис. 1 и 2 представлены кривые зависимости концентрации этанола в культуральной жидкости чайного гриба от суток культивирования. Исходное количество спирта на начальном этапе эксперимента во всех пробах составило 0,023 объемных процента.

Изучение кинетических кривых при режиме культивирования 20°C показало, что во всех пробах – озонированных и неозонированных, динамика этилового спирта одинакова при отсутствии существенных отличий количественных показателей этого параметра. Количество спирта, начиная с первых суток, нарастает пропорционально времени культивирования вплоть до 10 суток.

Первый пик наибольшей концентрации приходится на 10-е сутки. С 10-х по 15-е сутки количество спирта снижается во всех пробах. После 15-х суток начинается повторное повышение количества этанола вплоть до 30-х суток, когда количественные значения спирта максимальны. Таким образом, при культивировании чайного гриба при температуре 20°C не отмечено выраженного влияния озона, независимо от его дозировки, на количественные показатели уровня этанола и его динамику.

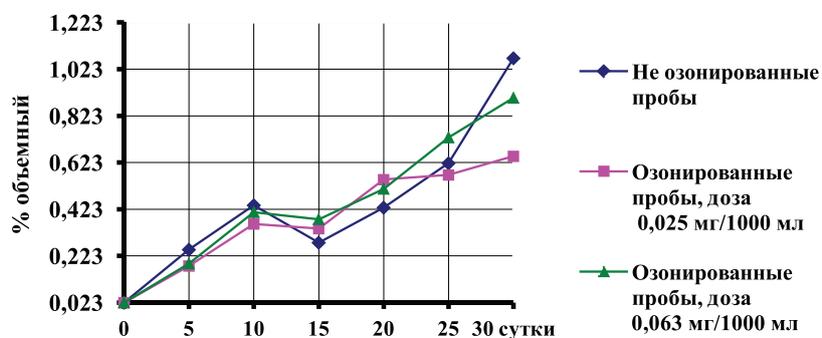


Рис. 1. Динамика этанола в культуральной жидкости чайного гриба (культивирование при 20°C)

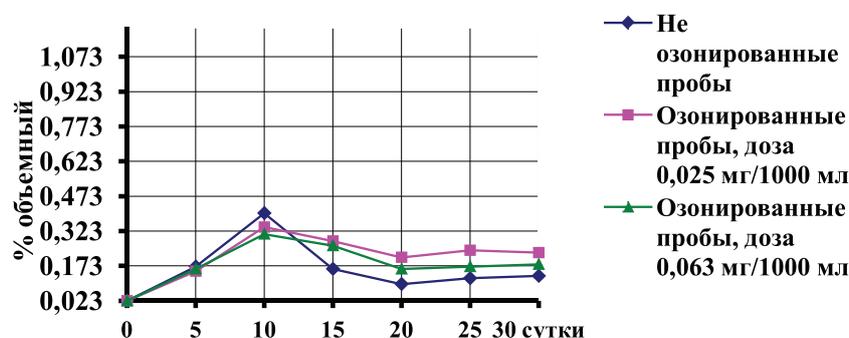


Рис. 2. Динамика этанола в культуральной жидкости чайного гриба (культивирование при 35°C)

При выращивании чайного гриба при 35 °С, как и при 20 °С, динамика уровня этилового спирта в пробах, культивируемых на всех трех вариантах сред, аналогична. Однако пики спадов и подъемов отдельных кривых кинетики не всегда совпадают с таковыми, культивируемыми при температуре 20 °С. Достижение максимальных значений концентрации этилового спирта во всех пробах происходит на 10-е сутки культивирования, что в количественном выражении совпадает с данными, полученными на эти же сутки при культивировании при 20 °С, а с 10 по 15 сутки выращивания при примененных температурных режимах наблюдается падение концентрации спирта. Однако, в отличие от культивирования при 20 °С, после 15 суток культивирования при режиме 35 °С падение концентрации этилового спирта во всех культуральных жидкостях продолжается. После 20-х суток наблюдается лишь небольшая тенденция к увеличению концентрации этанола в пробах, но в целом его количество практически не изменяется вплоть до 30-х суток, тогда как при режиме культивирования 20 °С на 30-е сутки достигаются максимальные значения концентраций этанола во всех исследуемых культуральных жидкостях.

Заключение

Таким образом, при сравнении кривых кинетики, отдельно по каждому из взятых температурных режимов, не выявлено существенного влияния озона на количественные показатели уровня этилового спирта в озонированных и неозонированных пробах. По нашему мнению это связано с устойчивостью симбионта к химическим факторам. Однако, культивирование, как в озонированных средах, так и без озона с использованием повышенного температурного режима приводит к значительному снижению, почти на порядок, концентраций этилового спирта в культуральных жидкостях по сравнению с режимом 20 °С. Это может свидетельствовать о нарушениях симбиоза после 15 суток культивирования *Medusomyces gisevii* (чайного гриба) при температуре 35 °С и как следствие снижения интенсивности метаболизма микроорганизмов симбионта.

Исследование проведено при финансовой поддержке Минобрнауки России, в рамках выполнения базовой части государственного задания (2014/2016).

Список литературы

1. Белых И.А. Токсическое действие озона на бактерии *Escherichia coli* / И.А. Белых, И.П. Высеканцев, А.М. Грек,

А.В. Скакун, В.В. Марушенко // Современные проблемы токсикологии. – 2009. – № 1. – С. 48–53.

2. Веревкина В.Н. Технология приготовления, характеристика и применение стимулятора роста микроорганизмов ТС-1 в биологической промышленности: дис. ... канд.биол. наук – Ставрополь. 2000 – 197 с.

3. Даниелян Л.Т. Чайный гриб (*Kombucha*) и его биологические особенности. – М.: ОАО Изд-во «Медицина», 2005. – 176 с.

4. Зайнуллин Р.А. Влияние условий культивирования чайного гриба (*Combucha*) на его функциональные свойства в пищевых профилактических напитках / Р.А. Зайнуллин, Р.В. Кунакова, Х.К. Гаделева, О.А. Данилова, А.А. Никитина // Известия вузов, пищевая биотехнология – 2010 – № 4 – С. 29–31.

5. Кашевник Л.Д. О некоторых биохимических особенностях т. н. «чайного гриба»/ Сборник трудов АГМИ. – Вып. 5. – Архангельск, 1939. – С. 116–121.

6. Максимов В.А. Озонотерапия. Современное состояние вопроса / В.А. Максимов, А.А. Чернышев, С.П. Каратаев // Ветеринарная медицина. – 2006. – № 4. – С. 14–26.

7. Хачатрян В.Х. Способ получения биологически активного материала и биоматериал, полученный данным способом // Патент РФ № 2500198/10.12.2013.

8. Юркевич Д.И. Метод 1 N ЯМР спектроскопии в исследовании экзометаболитов развивающихся микроорганизмов: дис. ... канд.биол. наук. – Пушкино, 2002 – 201 с.

9. Kozyrovska N.O. *Kombucha* microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology / N.O. Kozyrovska, O.M. Reva, V.B. Goginyan, J.-P. de Vera // *Biopolymers and Cell*. – 2012. – Vol. 28. – № 2. – P. 103–113.

References

1. Belyh I.A, Vysekancev I.P., Grek A.M., Skakun A.V., Marushhenk V.V. *Sovremennye problemy toksikologii*. 2009, no. 1, pp. 48–53.

2. Verevkin, V.N. *Tehnologija prigotovlenija, karakteristika i primenenie stimulyatora rosta mikroorganizmov TS-1 v biologicheskoj promyshlennosti*: dis. ... kand.biол. nauk. Stavropol, 2000, 197 p.

3. Danieljan, L.T. *Kombucha and its biological features*. Izd-vo «Medicina», 2005, 176 p.

4. Zainullin, R.A., Kunakova R.V., Gadeleva H.K., Danilova O.A., Nikitina A.A. *Izvestija vuzov, pishhevaja biotehnologija*. 2010, no. 4, pp. 29–31.

5. Kashevnik, L. D. *Sbornik trudov AGMI*. 1939, no. 5, pp. 116–121.

6. Maksimov, V.A., Chernyshev A.A. Karataev., S.P. *Veterinarnaja medicina*. 2006. no. 4, pp. 14–26.

7. Hachatryan V.H. *Patent RF* no. 2500198/10.12.2013.

8. Jurkevich, D.I. *Metod 1 N ЯМР спектроскопии в исследовании jezkometabolitov razvivajushhhsja mikroorganizmov*: dis.... kand.biол. nauk. Pushhino. 2002, 201 p.

9. Kozyrovska N.O. *Kombucha* microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology / N.O. Kozyrovska, O.M. Reva, V.B. Goginyan, J.-P. de Vera // *Biopolymers and Cell*. 2012. Vol. 28. no. 2. pp. 103–113.

Рецензенты:

Тинькова Е.Л., д.б.н., доцент, заведующая кафедрой биологии и экологии, ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный педагогический институт», г. Ставрополь;

Джандарова Т.И., д.б.н., доцент, профессор кафедры анатомии и физиологии, ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь.