

## ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗВИТИЯ КУЛЬТУРЫ РИСОВОГО ГРИБА В РАСТВОРАХ САХАРОЗЫ

*Т.И. Шингарева, А.А. Куприец*

Изучено развитие культуры рисового гриба в растворах сахарозы (2,0-8,5%). Определена динамика сбраживания сахарозы и метаболические процессы культуры рисового гриба. Найден состав культуральной среды и динамика развития микроорганизмов в культуральной среде при ферментации растворов сахарозы культурой рисового гриба.

### **Введение**

Природные зооглеи, включая кефирные грибки, являются одной из морфологически оформленных стабильно функционирующих ассоциативных культур микроорганизмов [1,2].

В настоящее время накоплено достаточно результатов, свидетельствующих о том, что микроорганизмы в природных и техногенных системах развиваются не как независимые друг от друга клетки, способные к автономному росту, а находятся в постоянном взаимодействии, напоминая при этом многоклеточный организм, и характеризуются сложными процессами, протекающими внутри сообщества [3].

Однако в народной практике помимо кисломолочной продукции на основе кефирных грибков с точки зрения лечебно-профилактических свойств хорошо себя зарекомендовали напитки на основе культуры «Тибетский рис» или «Рисовый гриб». Так, согласно разрозненным информационным источникам лица, употреблявшие «Тибетский рис», отмечают благотворное его действие на организм человека [4,5,6].

Ряд ученых, исследовавших микрофлору естественного симбиоза грибков без учета условий, в которых они до этого культивировались, приходят к выводу о различном составе микрофлоры у разных образцов грибков. Между тем если все эти образцы поместить в одинаковые условия культивирования, микрофлора их становится довольно однородной. Это свидетельствует об исключительной способности грибка к саморегулированию микрофлоры и делает его уникальным объектом для использования в производственных условиях.

Таким образом, среда культивирования поликультуры рисового гриба является одним из существенных факторов, влияющих на метаболизм культуры рисового гриба.

Цель работы – изучить влияние среды культивирования на развитие микрофлоры рисового гриба.

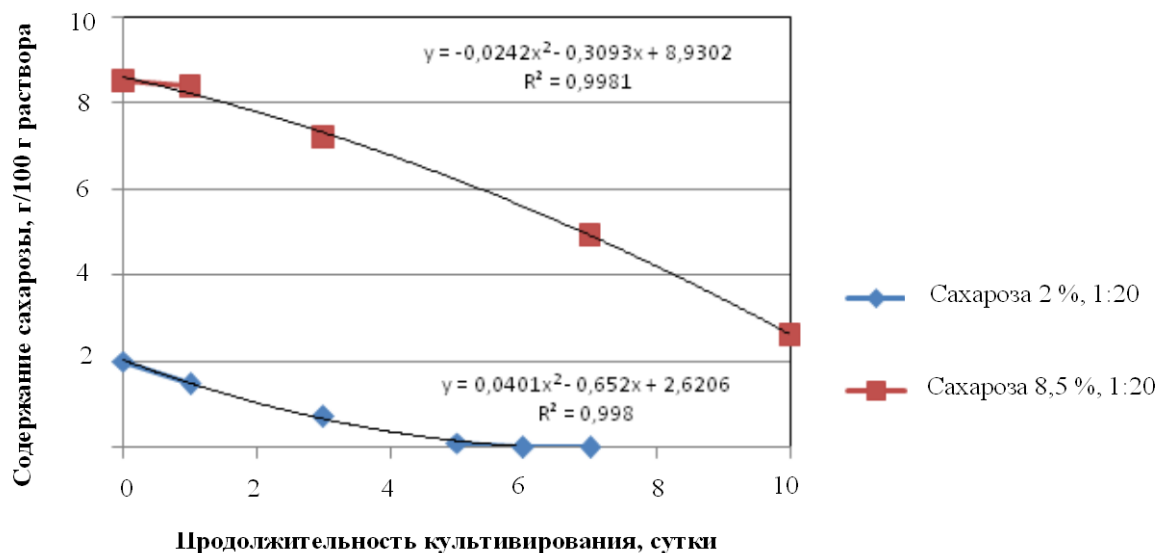
### **Результаты исследований и их обсуждение**

В связи с недостаточной обоснованностью информации по степени влияния концентраций сахарозы на жизнедеятельность рисового гриба, при его культивировании в водных растворах сахарозы, было необходимо выявить данную зависимость.

Объектами исследования явились водные растворы сахарозы (вода питьевая по ГОСТ 2874-82, сахар-песок по ГОСТ 21-94 [7,8]; поликультура естественного симбиоза рисовый гриб «*Oryzomyces indicis* РГЦ» (далее в тексте – РГ).

Используемая в работе методология базируется на стандартных методиках физико-химического и микробиологического анализа. При этом активная кислотность определялась потенциометрическим методом [9], органолептические показатели – сенсорным методом [10], наличие сахарозы по МВИ.МН 4475-2012 [11], микробиологические посеы для определения количества дрожжей по ГОСТ 10444.12-88 [12]; микробиологические посеы для определения количества молочнокислых микроорганизмов [13]; микроскопические препараты по ГОСТ 9225-84 [14], микробиологические посеы на наличие уксуснокислых микроорганизмов [14]; массовая доля спирта по ГОСТ 6687.7-88 [15].

Изучали влияние исходной концентрации сахарозы (2,0–8,5 %) в водных растворах на ее степень сбраживания культурой РГ, при соотношении РГ к среде ферментации 1:20, что по массовой концентрации РГ составляло 5 % (5 г/100г). При ферментации водных растворов сахарозы культурой РГ в исходную среду ферментации добавляли изюм в количестве 3 г/дм<sup>3</sup>.



**Рисунок 1 – Изменение содержания сахарозы при культивировании рисового гриба в 2 % водном растворе сахарозы**

Как видно из рисунка 1, при сбраживании 2,0 % водного раствора сахарозы уже после 5-ти суток культивирования РГ в среде сахароза сбраживается полностью. В то же время в растворе сахарозы 8,5 % в течение 10 суток полного сбраживания сахарозы не произошло.

Установлены зависимости интенсивности сбраживания водных растворов сахарозы с массовой концентрацией 2,0 % и 8,5 % культурой рисового гриба (РГ) при условии внесения инокулята в количестве 5 % от массы раствора.

Получены следующие уравнения зависимостей:

а) водный раствор сахарозы 2,0 %

$$y = -0,0242x^2 - 0,3093x + 8,93$$

б) водный раствор сахарозы 8,5 %

$$y = -0,0242x^2 - 0,3093x + 8,9302$$

где  $x$  – продолжительность культивирования рисового гриба в водном растворе сахарозы, сут  
 $y$  – содержание сахарозы в водном растворе, г/100г

Далее изучали развитие культуры РГ в водных растворах сахарозы с варьируемыми факторами: концентрацией сахарозы и количеством РГ.

Ниже в таблице 1 и на рисунке 2 приведены данные по изменению массы РГ и скорости роста рисового гриба в водных растворах сахарозы.

При этом скорость роста РГ определяли как отношение массы (г) РГ в исследуемый интервал времени (сутки) к массе исходного инокулята (РГ).

Таблица 1 – Изменение массы и скорости роста рисового гриба в водных растворах сахарозы

Продолжительность культивирования РГ, сут	Масса РГ, г	Скорость роста РГ	Масса РГ, г	Скорость роста РГ	Масса РГ, г	Скорость роста РГ	Масса РГ, г	Скорость роста РГ
	Образец 1 (2 %, РГ 10 г)		Образец 2 (2 %, РГ 2 г)		Образец 3 (8,5 %, РГ 10 г)		Образец 4 (8,5 %, РГ 2 г)	
0	100,0		100,0		100,0		100,0	
1	102,8	1,03	102,5	1,03	105,1	1,05	104,5	1,05
3	114,0	1,14	115,0	1,15	115,8	1,16	121,2	1,21
5	121,6	1,22	125,5	1,26	119,7	1,20	140,0	1,40
7	119,9	1,20	136,0	1,36	123,7	1,24	155,0	1,55
10	118,4	1,18	143,5	1,44	128,1	1,28	171,5	1,72
12	117,6	1,18	143,0	1,43	126,7	1,27	173,5	1,74
14	109,2	1,09	135,0	1,35	122,3	1,22	172,5	1,73

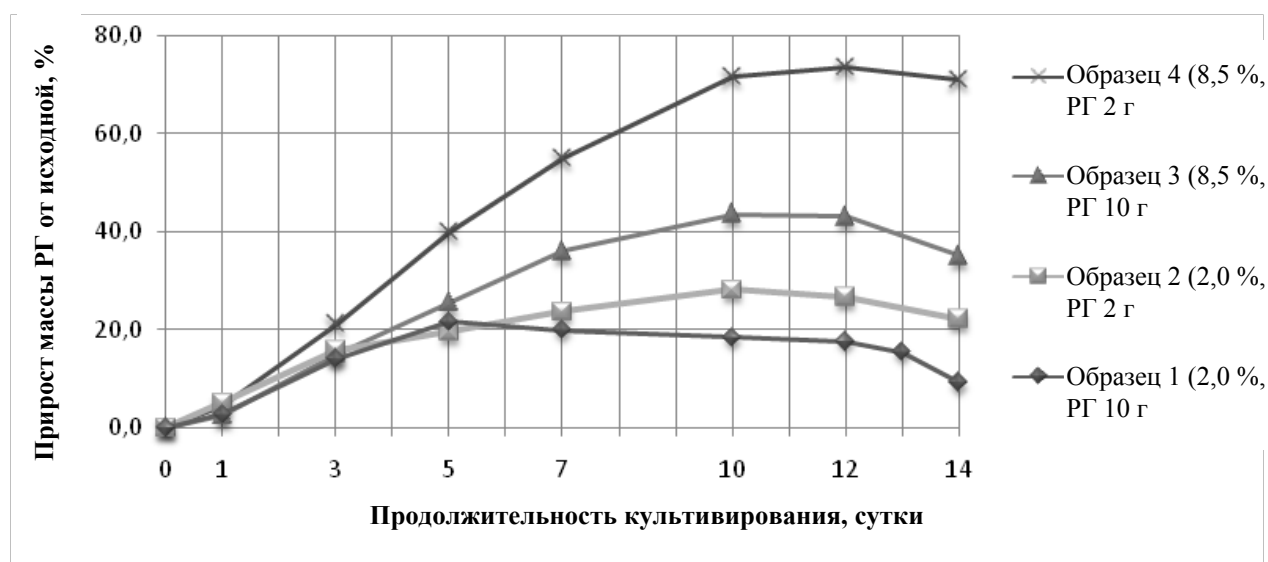


Рисунок 2 – Прирост массы рисового гриба при ферментации растворов сахарозы

В исследуемых образцах максимальная скорость роста РГ (таблица 1) и прирост массы РГ (рисунок 2) отмечается в разные сутки и напрямую зависит от совокупности двух факторов: концентрации сахарозы и количества вносимого инокулята РГ. Так, в образцах 4 и 2, где количество РГ в исходных растворах сахарозы составляло 2 г, прирост массы рисового гриба протекает более интенсивно, в сравнении с образцами 1 и 3 (РГ 10 г).

Прирост массы РГ при его ферментации в растворе сахарозы зависит в первую очередь от активности развития дрожжей в данной ассоциации. Последние, как известно, обладают способностью сбраживать высокие концентрации сахарозы [16]. При одинаковой исходной концентрации сахарозы в растворе скорость роста дрожжей в поликультуре РГ зависит от величины вносимого в среду ферментации инокулята: с его увеличением скорость роста дрожжей понижается. Это согласуется с полученными данными изменения сахарозы в среде ферментации (рисунок 1), то есть при внесении поликультуры РГ в большем количестве (10 г) его потребность в сахарозе значительно возрастает и последняя сбраживается быстрее.

В водных растворах сахароза может инвертироваться в среде еще в начале брожения под действием фермента дрожжей  $\beta$ -фруктофуранозидазы, с образованием глюкозы и фруктозы, которые легко используются дрожжевой клеткой, при этом дрожжи больше предпочитают

глюкозу. При этом в среде протекает спиртовое брожение с накоплением основных продуктов брожения – этанола и диоксид углерода, а также промежуточных вторичных продуктов (глицерин, янтарная, уксусная, пировиноградная кислоты, ацетальдегид, 2,3-бутиленгликоль, ацетоин, сивушные масла и др.). Полученные результаты согласуются с имеющимися данными, касательно развития дрожжей. Так, согласно литературным источникам, скорость роста дрожжей зависит от величины засеваемого в дрожжерастильный аппарат материала: с его увеличением скорость роста дрожжей понижается, но период лаг-фазы сокращается [17].

Однако сбраживать сахарозу способны и лактобациллы, входящие в поликультуры РГ, при этом конечным продуктом расщепления сахарозы является молочная кислота [18].

Динамика развития микроорганизмов в растворе сахарозы при ее ферментации культурой РГ отражена в таблице 2.

Таблица 2 – Микробиологический состав культуральной жидкости

Продолжительность культивирования РГ, сутки	Содержание микроорганизмов в культуральной среде (раствор сахарозы 2 %, РГ 5 %)		
	КМАФАнМ, $10^8$ КОЕ/см <sup>3</sup>	Уксуснокислые бактерии	Дрожжи, $10^4$ КОЕ/ см <sup>3</sup>
1	8,78	$10^4$	1,35
3	5,94	$10^5$	3,63
7	0,37	$10^5$	3,80
10	0,12	$10^6$	2,48

Как видно, при ферментации 2 %-ного водного раствора сахарозы, инокулируемого 5 % РГ, в первые 3-е суток отмечается максимум развития молочнокислых бактерий, у дрожжей максимум приходится на 3–7 сутки, уксуснокислых бактерий – после 7 суток ферментации.

Влияние количества вносимой культуры РГ (2÷10 г/100 г) на изменение активной кислотности среды в процессе ферментации 2 %-ного раствора сахарозы отражено на рисунке 3.

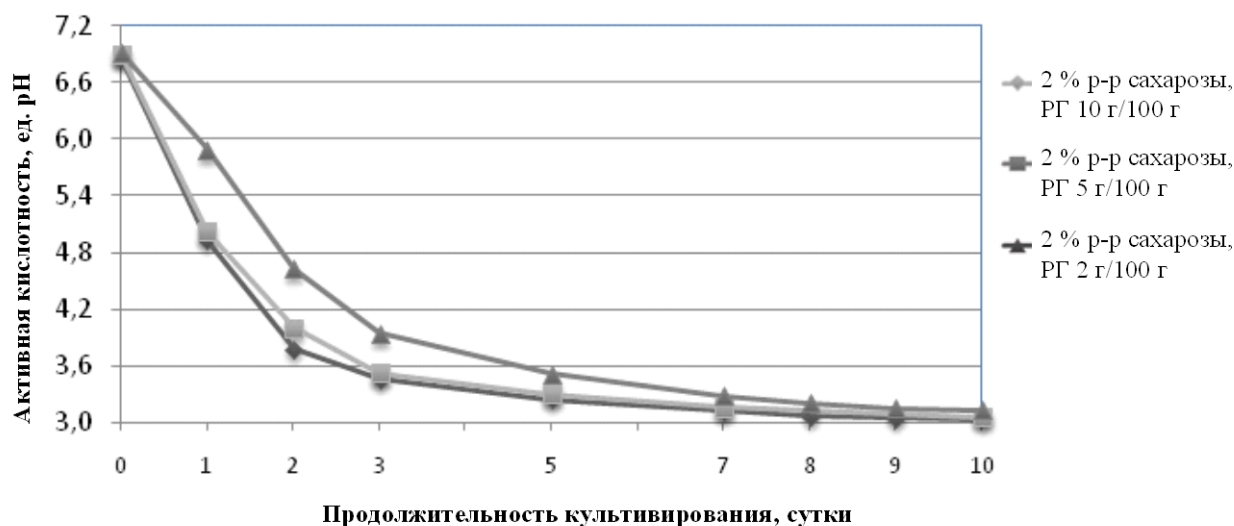


Рисунок 3 – Изменение активной кислотности среды при культивировании рисового гриба в 2% растворе сахарозы

Как видно из рисунка 3, при сбраживании раствора сахарозы (2 %) в течение 10 суток, независимо от исходного по массе количества инокулята РГ, в первые 3-е суток имеет место интенсивное снижение величины рН. Это напрямую связано с интенсивным развитием молочнокислой микрофлоры, входящей в поликультуру РГ, которая сбраживает сахарозу с накоплением молочной кислоты (таблицы 3). Далее в исследуемых средах прирост молочной

кислоты заметно снижается, а после 7 суток практически прекращается. Это, возможно, связано с полным сбраживанием не только сахарозы, но и продуктов ее расщепления (фруктозы, глюкозы), входящих в культуру РГ дрожжами и уксуснокислыми бактериями. В последующем продуцируемый дрожжами спирт интенсивно сбраживают уксуснокислые бактерии, что стимулирует их развитие, результатом чего является активизация накопления уксусной кислоты.

Таблица 3 – Содержание органических кислот и этилового спирта в культуральной среде при ферментации раствора сахарозы рисовым грибом

Продолжительность культивирования РГ, сутки	Содержание органических кислот и этилового спирта в культуральной среде (раствор сахарозы 2 %, РГ 5 %)		
	молочная кислота, г/дм <sup>3</sup>	массовая доля спирта, %	уксусная кислота, г/дм <sup>3</sup>
1	1,362	0,2	0,964
3	1,314	0,3	0,966
7	1,621	0,2	1,456
10	1,685	0,1	2,225

Внешний вид культуральной среды в процессе ферментации 2 % водного раствора сахарозы рисовым грибом при его исходном соотношении к раствору 1:10 (10 г/100 г) и 1:50 (2 г/100 г) отражены на рисунке 4.

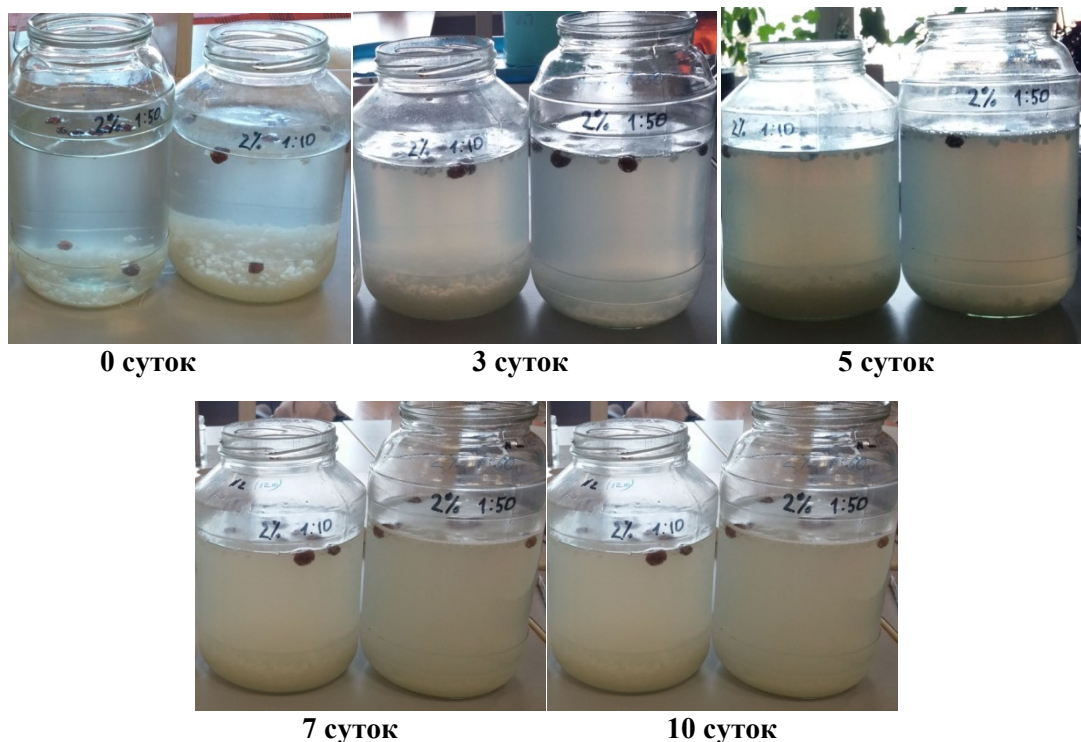


Рисунок 4 – Внешний вид культуральной среды в процессе ферментации 2 % водного раствора сахарозы рисовым грибом при его исходном соотношении к раствору 1:10 (10 г/100 г) и 1:50 (2 г/100 г)

При развитии РГ (рисунок 4) в растворе сахарозы культуральная жидкость до трех суток имеет прозрачный вид, на пятые сутки становится мутноватой, а с семи суток – совсем мутная. Развитие дрожжей, фиксируемое по явному газообразованию, прослеживается начиная с 3 до 7 суток, а далее уступает уксуснокислым бактериям, что и обеспечивает выраженную мутность культуральной жидкости. При этом количество вносимого рисового

гриба в среду ферментации особой разницы не оказывает.

Внешний вид культуры РГ, культивируемого в 2 % водном растворе сахарозы, показан на рисунке 5.



1 сутки



3 сутки



7 сутки



10 сутки

**Рисунок 5 – Внешний вид рисового гриба, культивируемого в 2 % водном растворе сахарозы**

Таким образом, на начальной стадии ферментации водных растворов сахарозы культурой РГ одновременно протекают молочнокислое, спиртовое и уксуснокислое брожение. При этом в первые 3 суток ферментации 2 % водного раствора сахарозы, инокулируемого 5 % РГ, отмечается максимум развития молочнокислых бактерий (доминирует молочнокислое брожение), дрожжей на 3–7 сутки, уксуснокислых бактерий после 7 суток.

При культивировании РГ в водных растворах сахарозы, для поддержания в активной форме, перевивки РГ в свежеприготовленную среду ферментации следует проводить в период активного развития в РГ молочнокислой микрофлоры и дрожжей, при этом для водных растворов сахарозы 2,0–8,5 % – это на третьи сутки.

### **Заключение**

Изучена динамика изменения исходного содержания сахарозы (2,0–8,5 %) при культивировании поликомпонентной культуры рисового гриба в водных растворах сахарозы. Установлена зависимость степени сбраживания сахарозы культурой РГ (5 г/100 г) от исходной массовой концентрации сахарозы в среде ферментации. При ферментации водных растворов сахарозы культурой рисового гриба в исследуемых образцах максимальная скорость роста РГ и прирост массы напрямую зависят в совокупности от концентрации сахарозы и количе-

ства вносимого инокулята. Определена динамика развития микроорганизмов в культуральной среде при ферментации растворов сахарозы культурой РГ. Показано, что на начальной стадии ферментации водных растворов сахарозы культурой РГ протекает молочнокислое, спиртовое и уксуснокислое брожение, при этом в первые трое суток доминирует молочнокислое брожение. Приведено содержание органических кислот и этилового спирта в культуральной среде.

### Литература

- 1 Градова, Н.Б. Исследование микробного профиля структурированной ассоциативной культуры микроорганизмов — кефирных грибков /Н.Б. Градова, А.А. Саранцева (А.А. Хохлачева) //Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14. – № 5 (3). – С. 704–710.
- 2 Градова, Н.Б. Исследование микробного профиля структурированной ассоциативной культуры микроорганизмов - кефирных грибков. Автореф. дис. на соиск. уч. степ. к.б.н.: Москва – 2015. – 25 с.
- 3 Артюхова, С.И. Научно-экспериментальное обоснование новых биотехнологий синбиотических молочных продуктов. Автореф. дис. на соиск. уч. ст. д.т.н.: Улан-Удэ – 2006. – 44 с.
- 4 Рисовый гриб, свойства, состав, польза – Режим доступа: <http://rus-list.ru/6384-risovyj-grib-svoystva-sostav-polza-i-vred> – Дата доступа 06.12.2016.
- 5 Рисовый гриб, полезные свойства – Режим доступа: <http://monamo.ru/zdorov-eda/risovy-j-grib> – Дата доступа 01.12.2016.
- 6 Про тибетский гриб и индийский рис – Режим доступа: <http://natural-medicine.ru/prislannoe/4164-pro-tibetskij-grib-i-indijskij-ris.html> – Дата доступа 01.12.2016.
- 7 Вода питьевая. Общие технические условия: СТБ 1188-99. Общие требования к организации и методам контроля качества. – Минск: Госкомитет по стандартизации РБ. – 1999. – 20 с.
- 8 Сахар-песок. Технические условия: ГОСТ 21-94. – Москва: Стандартинформ. – 2012. – 28 с.
- 9 Молоко. Метод измерения рН. Межгосударственный стандарт: ГОСТ 26781-85. – Москва: Стандартинформ. – 2009. – 12 с.
- 10 Инихов Г.С. Методы анализа молока и молочных продуктов / Г.С.Инихов, Н.П. Брио. – М.: Пищепромиздат, 1971. – 281 с.
- 11 Определение содержания сахаров (глюкоза, фруктоза, сахароза, лактоза, мальтоза и мальтодекстрин) в специализированных продуктах питания: МВИ. МН 4475-2012. – Минск. – 2012. – 14 с.
- 12 Продукты пищевые. Методы определения дрожжей и плесеней. Межгосударственный стандарт: ГОСТ 10444.12-88, 1990. – 6 с.
- 13 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. Межгосударственный стандарт: ГОСТ 10444.11-89. – Москва: Стандартинформ. – 2010. – 21 с.
- 14 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа. Межгосударственный стандарт: ГОСТ 9225-84. – Москва: Стандартинформ. – 2009. – 8 с.
- 15 Напитки безалкогольные и квасы. Метод определения спирта: ГОСТ 6687.7-88 – Москва: Изд-во стандартов. – 1998. – 24 с.
- 16 Ковалевский, К.А. Технология бродильных производств: учебное пособие. – Киев: Фирма "ИНКОС", 2004. – 340 с.
- 17 Клещев, Н.Ф. Общая промышленная биотехнология: технология бродильных производств /Н.Ф. Клещев, М.П Бенько // Харьков: НТУ "ХПИ", 2007. – 200 с.
- 18 Банникова, Л.А. Микробиология молока и молочных продуктов /Л.А.Банникова, Н.С. Королева., В.Ф. Семенихина // Справочник – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.

*Поступила в редакцию 06.12.2016*