

ВЛИЯНИЕ КИСЛОРОДА НА КИНЕТИКУ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
ЧАЙНОГО ГРИБА *MEDUSOMUCES GISEVI*

Yu.N. Ismailova

THE INFLUENCE OF OXYGEN ON THE KINETICS OF TEA FUNGUS  
*MEDUSOMUCES GISEVI* CULTIVATION

**Исмаилова Ю.Н.** – асп. каф. пищевой биотехнологии продуктов из растительного сырья Санкт-Петербургского национального исследовательского университета информационных технологий, механики и оптики, г. Санкт-Петербург. E-mail: ismailova.92.i@gmail.com

**Ismailova Yu.N.** – Post-Graduate Student, Chair of Food Biotechnology of Products from Vegetable Raw Materials, St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg. E-mail: ismailova .92.i@gmail.com

Для промышленного культивирования чайного гриба необходима специальная технология культивирования в оптимальных условиях. Чтобы найти такие условия, необходимо изучить кинетику протекания метаболических процессов в культуральной жидкости, химический состав которой постоянно меняется во времени. Следовательно, будут меняться и её физические свойства. Всё это не может не сказаться на скорости протекания биологических процессов. Как показывают опыты, развитие гриба можно разделить на две стадии. Первая стадия характеризуется тем, что внесённая в питательную среду засеваемая мицелия гриба тонет, и развитие гриба происходит под слоем жидкости. Но так как для протекания биологических процессов необходим кислород, то в первоначальный период гриб потребляет кислород, находящийся в культуральной жидкости в растворённом состоянии. По кинетике изменения концентрации кислорода в жидкости и кислотности можно судить о продолжительности первой стадии и скорости развития гриба в этот период. Вторая стадия начинается с момента всплытия засеваемой культуры и образования на поверхности жидкости сплошной плёнки нового гриба, после чего диффузия кислорода из воздуха в жидкую среду становится затруднительной (возможно, прекращается совсем), и потребление кислорода грибом происходит через его поверхность, соприкасающуюся с воздухом. На основе экспериментальных исследований показано, что формирование кислотно-состав культуры чайного гриба происходит в две стадии. Пере-

ход от одной стадии к другой можно определить по кинетике изменения концентрации кислорода, растворённого в жидкости, и её pH. Выбрано уравнение математической модели, адекватно отражающей течение биологических процессов и позволяющей прогнозировать его за пределами условий эксперимента.

**Ключевые слова:** гриб, культивирование, кислотность, математическая модель.

Special technology of cultivation in optimal conditions is necessary for industrial cultivation of a tea mushroom. To find such conditions it is necessary to study kinetics of metabolic processes course in cultural liquid which chemical composition constantly changes with time. Hence, its physical properties will also change. All this cannot but affect the speed of course of biological processes. As experiments show, the development of a mushroom can be divided into two stages. The first stage is characterized by the sinking of seeding hinge plate of a mycelium brought in a nutrient medium and the development of a mushroom under a liquid layer. But as oxygen is necessary for the course of biological processes, during the initial period the mushroom consumes oxygen which is in cultural liquid in the dissolved state. Kinetics of oxygen concentration change in liquid and acidity gives the possibility to estimate the duration of the first stage and the speed of development of a mushroom during this period. The second stage begins with the moment of emersion of seeding culture and the formation of a continuous film on the surface of liquid of a new mushroom then the diffusion of oxygen from air on liquid environment becomes difficult (perhaps, stops absolutely), and oxygen consump-

tion by a mushroom occurs through its surface adjoining to air. On the basis of pilot studies it is shown that the formation of acid composition of cultural liquid of a tea mushroom has two stages. Transition from one stage to another can be determined by kinetics of concentration change of the oxygen dissolved in liquid and its pH. The equation of the mathematical model which is adequately reflecting the course of biological processes and allowing predicting it outside experimental conditions is chosen.

**Keywords:** mushroom, cultivation, acidity, mathematical model.

**Введение.** Давно известно, что настои чайного гриба (*Medusomyces gisevi*) отличаются высокой биологической активностью, высокими целебными и вкусовыми свойствами благодаря наличию в них различных биологически активных веществ, органических кислот, алкалоидов, антибиотиков, витаминов и т.п. [1, 2].

Причиной такого разнообразия состава настоя является то обстоятельство, что грибок представляет собой сложную поликультуру микроорганизмов, которая содержит дрожжи, уксуснокислые и молочнокислые бактерии и другие микроорганизмы, продуктами метаболизма которых и являются перечисленные выше вещества [3, 4].

Однако, как это может показаться ни странно, несмотря на тысячелетние опыты культивирования чайного гриба, научным исследованиям в области кинетики биологических процессов, протекающих при его развитии, учёными-микологами уделялось мало внимания. Видимо, это связано с отсутствием потребностей на такие исследования, так как до сих пор приготовление напитков из настоя чайного гриба было распространено на бытовом уровне.

В настоящее время имеются сведения об использовании продуктов метаболизма чайного гриба в фармакологии [3], производстве напитков общего и функционального назначения, животноводстве, производстве кисломолочных продуктов и хлебобулочных изделий [5, 6].

Для удовлетворения возросших потребностей в продуктах метаболизма гриба возникла необходимость в налаживании выпуска настоя в промышленных масштабах в больших количествах. Например, при использовании гриба *Medusomyces gisevi* в технологии приготовления пшеничного хлеба потребуется примерно 40 литров культуральной жидкости на 1 т хлеба [5].

Решение указанной проблемы требует раз-

работки специальной технологии культивирования в оптимальных условиях. На бытовом уровне все эти требования не имеют какого-либо значения. Но для предприятий, которые собираются производить продукцию и продавать её на рынке, знание оптимальных технологических параметров, времени окончания процесса культивирования и контроль параметров, определяющих его течение, имеют первостепенное значение, так как от этого зависят в конечном итоге его производительность и прибыль. Кроме того, все эти знания необходимы при проектировании промышленных производств и для расчётов аппаратов и технологических параметров.

В данной статье основное внимание уделено исследованиям кинетики протекания биологических процессов на первой стадии, так как в это время начинает формироваться кислотный состав культуральной жидкости.

В связи с указанными обстоятельствами была поставлены две цели:

- во-первых, провести экспериментальные исследования по изучению кинетики потребления кислорода и изменения кислотности культуральной жидкости в процессе культивирования гриба и на основе полученных данных установить границу между стадиями;

- во-вторых, на основе опытных данных выбрать уравнение математической модели, которая позволяла бы адекватно отражать и прогнозировать течение и скорость протекания биологических процессов и проводить, при необходимости, вычислительные эксперименты за пределами условий эксперимента.

Питательная среда, в которой начинается развитие чайного гриба, представляет собой водный экстракт чайного листа с растворённым в нём определённым количеством сахарозы. Изначально в чайном настое уже содержится около 1% различных кислот (щавелевая, лимонная, яблочная, янтарная, пировиноградная, фумаровая и др.) [7].

В составе культуральной жидкости гриба *Medusomyces Gisevi*, согласно литературным данным [1–3], обнаружены уксусная, глюконовая, щавелевая, лимонная, яблочная, молочная, пировиноградная и другие органические кислоты.

Из сравнительного анализа настоя чая и культуральной жидкости гриба следует вывод, что их кислотный состав довольно близок. Единственное существенное различие заключа-

ется в наличии в культуральной жидкости гриба уксусной кислоты, которая образуется в результате переработки уксуснокислыми бактериями этилового спирта, являющегося продуцентом дрожжевых клеток. Таким образом, можно предположить, что некоторые кислоты частично попадают из настоя чая в настой чайного гриба в готовом виде и не являются результатом его жизнедеятельности.

**Методы исследований.** В питательную среду, содержащую различные начальные значения сахарозы  $S_n = 0,13; 0,167; 0,23$ , выраженные в массовых долях, и 2 % настоя чёрного чая, вносили мицелий гриба. Культивирование проводили в стеклянном культиваторе ёмкостью 2 литра при температуре 20–23°C.

В процессе культивирования, через определённые промежутки времени, измерялись рН и титруемая кислотность культуральной жидкости, концентрация в ней растворённого кислорода, сухих веществ и её плотность.

Перед началом культивирования те же измерения, кроме титруемой кислотности, проводились в исходном чайном настое.

Концентрация кислорода, растворённого в культуральной жидкости, измерялась непосредственно в культиваторе прибором МАРК-4. Датчик кислорода мембранного типа помещался в культуральную жидкость в самом начале опытов с таким расчётом, чтобы примерно половина его длины постоянно находилась в жидкости. Другая половина через тело гриба выходила

наружу. Перед каждым измерением датчиком вручную, осторожно, не нарушая целостности тела гриба, совершали колебательные движения с целью смыва с поверхности мембраны каких-либо загрязнений, искажающих показания прибора. Показания прибора снимались, как правило, трижды. Первый раз – перед колебанием датчика, второй – сразу же после, третий через 30–40 секунд. Если отклонения последних двух измерений не превышало 2 % от их среднеарифметического значения, то оно принималось в качестве окончательного экспериментального результата.

Титруемая кислотность, рН, концентрации сухих веществ в культуральной жидкости и её плотность определялись стандартными методами.

### Результаты исследований и их обсуждение

**Кинетика изменения рН и титруемой кислотности культуральной жидкости.** На основании опытных данных было установлено, что кислотность исходного настоя чая не зависит от начального содержания в нём сахара и близка к нейтральной среде (рН=6,3–6,8).

Результаты экспериментальных исследований кинетики изменения кислотности и концентрации кислорода в культуральной жидкости представлены на рисунке 1. На рисунке 1, а представлено изменение во времени рН культуральной жидкости, на рисунке 1, б – её титруемой кислотности К.

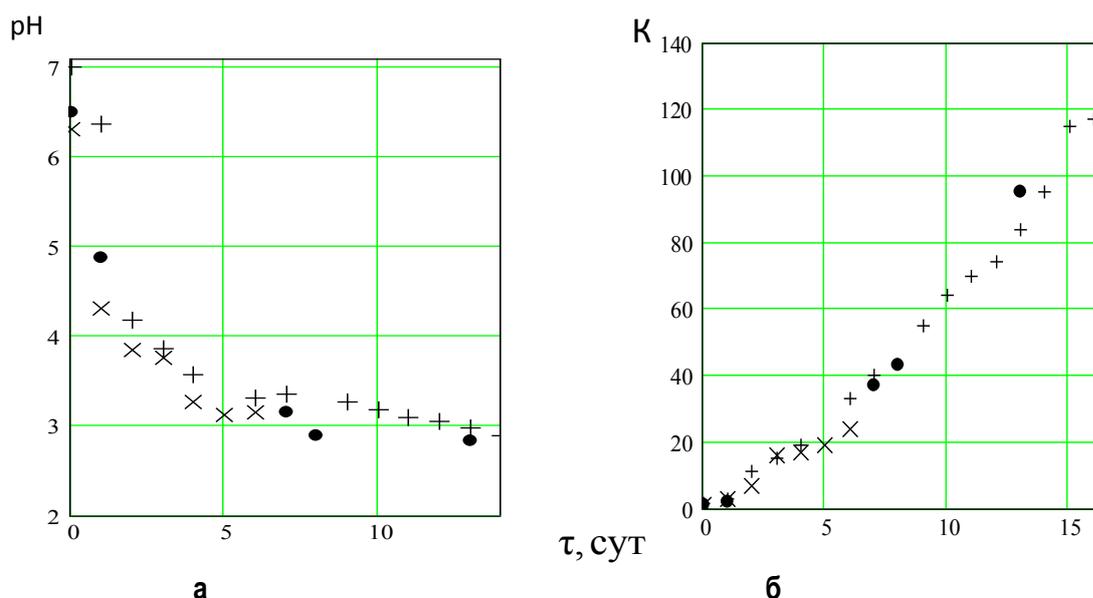


Рис.1. Изменение кислотности культуральной жидкости в процессе культивирования гриба:

а – рН; б – титруемая кислотность К;

$S_n$ : ● – 0,13; + – 0,167; x – 0,23

Данные по измерению плотности жидкости и содержания в ней сухих веществ в графическом виде не приведены, так как в процессе опытов эти параметры, при определённой начальной концентрации сахара в жидкости, оставались постоянными.

По рисунку 1 следует сделать несколько комментариев. Во-первых, изменение кислотности в процессе культивирования слабо зависит от начального содержания сахара. Во-вторых, хорошо видно, что характер изменения рН среды и титруемой кислотности  $K$  различен. Если титруемая кислотность плавно повышается от начального значения, соответствующего кислотности исходного чайного настоя, и после 15–17 суток культивирования начинает стремиться к постоянной величине, то рН культуральной жидкости за первые 3–4 суток резко снижается от величины, близкой к нейтральной, до  $pH=3-2,8$ , после чего остаётся постоянной.

Различие в характере изменения титруемой кислотности и рН можно объяснить тем, что на первой стадии развития гриба в культуральной жидкости продуцируются (или переходят из чайного раствора) прежде всего кислоты с высокой степенью диссоциации. Такие как пировиноградная кислота с константой диссоциации –  $K_d=5,6 \cdot 10^{-1}$ ; щавелевая –  $K_{d1}=5,65 \cdot 10^{-2}$ ; фумаровая –  $K_d=9,3 \cdot 10^{-2}$  [10]. Уксусная кислота с константой диссоциации  $K_d=10^{-5}$  и другие кислоты с меньшими значениями  $K_d$ , постоянно продуцируемые грибом в первые 4 суток культивирования, не сказываются на величине рН, но влияют на общую кислотность культуральной жидкости.

Так как начальные значения рН, титрованной кислотности и концентрации кислорода в культуральной жидкости были различными, то с целью приведения экспериментальных результатов к какому-то единообразию дальнейшая обработка опытных данных и подбор эмпирических уравнений математических моделей производились в безразмерных координатах:  $pH_b=pH/pH_n$ ,  $O_b=O/O_n$ . Индексы означают:  $b$  – безразмерное значение параметра,  $n$  – начальное, без индекса – текущие. Такой метод обработки опытных данных удобен ещё и тем, что позволяет быть независимыми от размерностей величин.

**Кинетика изменения концентрации кислорода в культуральной жидкости.** Начальная концентрация кислорода в чайном настое несколько отличалась (в сторону снижения) от его концентрации в чистой воде, рассчитанной из условия равновесия, при тех же условиях. В принципе, так и должно быть, так как на растворимость кислорода влияет наличие в жидкостях кислот, солей, углеводов и т. п. [8; с. 61–62; 9, с. 266–268].

Опытами установлено: во-первых, на первой стадии развития гриба потребление кислорода в значительно большей степени зависит от  $S_n$ , чем изменение рН; во-вторых, характер изменения концентрации кислорода аналогичен изменению рН. Последнее демонстрируется совместным изображением функций  $O_b(t)$  и  $pH_b(t)$  на рисунке 2.

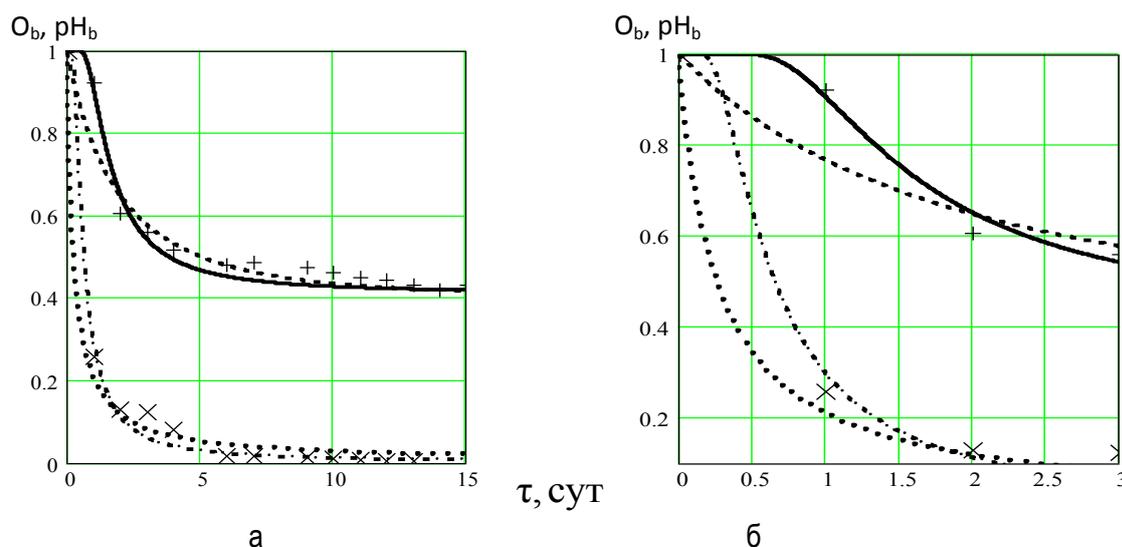


Рис. 2. Изменения  $O_b$  и  $pH_b$  при  $S_n=0,167$ . Обозначения соответствуют: + –  $pH_b$ ; × –  $O_b$ ; Линии уравнениям: — (1), — — (2); •••(2), —•—(1)

На рисунке 2, б для наглядности изменение функций на начальной стадии культивирования изображено в увеличенном масштабе.

Полученные данные позволяют предположить, что период от внесения засевной культуры до 3–4 суток можно считать первой стадией развития гриба, в течение которой продуцируются кислоты с высокой степенью диссоциации. Далее следует вторая стадия, в период которой продуцируются в основном кислоты с низкой степенью диссоциации.

**Выбор уравнений математической модели.** Аналогичность кинетических зависимостей предопределяет и аналогичность уравнений, которыми они описываются. Математическая обработка опытных данных, выполненная в системе MathCad, показала, что можно получить несколько видов уравнений, которые с примерно одинаковой точностью отражают изменение функций  $O_b(t)$  и  $pH_b(t)$ . Из них необходимо выбрать то, которое в наибольшей степени соответствует реальному ходу биологического процесса. При выборе уравнений математических моделей можно воспользоваться рекомендациями работы [11, с. 38].

Из нескольких видов уравнений для анализа были взяты два, которые в наибольшей степени отражают результаты экспериментов:

$$Y(\tau) = 1 - ae^{-\left(\frac{c}{\tau}\right)^d} \quad (1)$$

$$Y(\tau) = \frac{a_2}{1 - a_1 e^{-c_1 \tau}} \quad (2)$$

Обратим внимание на следующее обстоятельство. Поскольку аргумент функций (1) и (2) входит в показатель степени при экспоненте, а в целом степень должна быть безразмерной, то коэффициент  $c$  будет иметь размерность времени, в нашем конкретном случае – сут, а коэффициент  $c_1$  – 1/сут.

В уравнениях (1) и (2)  $Y(\tau)$  означает и функ-

цию  $O_b(t)$ , и  $pH_b(t)$ . Общим для них является то, что при  $\tau \rightarrow 0$  их значения стремятся к единице, а при  $\tau \rightarrow \infty$  – к некой минимальной величине  $a_2=(1-a)$ . Численные значения коэффициентов для них будут, естественно, различны.

Для примера рассмотрим вариант с  $S_n=0,167$  (рис. 2):

1. Функция  $O_b(t)$ .  $a_2=(1-a)=0,002$ ,  $a=a_1=0,998$ ;  $c=0,52$  сут;  $d=1,6$ ;  $c_1=0,0076$  сут<sup>-1</sup>. Обратим внимание: согласно уравнениям (1) и (2), концентрация кислорода в культуральной жидкости не может упасть до нуля.

2. Функция  $pH_b(t)$ .  $a_2=0,41$  и  $a=a_1=0,59$ ;  $c=1,4$  сут;  $d=1,8$ ;  $c_1=0,24$  сут<sup>-1</sup>.

Графики, представленные на рисунке 2, б, наглядно демонстрируют различие в описании уравнениями (1) и (2) кинетики развития гриба в начале первой стадии. Согласно уравнению (2), после внесения засевной культуры сразу же наблюдается снижение в культуральной жидкости и концентрации кислорода, и её pH (см. рис 2, б). Уравнение же (1) предполагает на начальной стадии наличие времени адаптации засевной культуры к новым условиям, или, другими словами, наличие лаг-фазы в развитии гриба. Логика рассуждений и данные литературы по культивированию других микроорганизмов [8, 9] склоняют нас отдать предпочтение уравнению (1) как более точно отражающему течение биологических процессов.

Для более глубокого понимания причин, влияющих на их ход, кроме уравнения кинетики приведём уравнение, описывающее скорость их протекания. Для этого возьмём производную функции (1) по времени

$$Y'(\tau) = \frac{a(c \cdot \tau)^d de^{-(c \cdot \tau)^d}}{(1 - a)\tau} \quad (3)$$

Графическое изображение производной (3) дано на рисунке 3 для вариантов, представленных на рисунке 2.

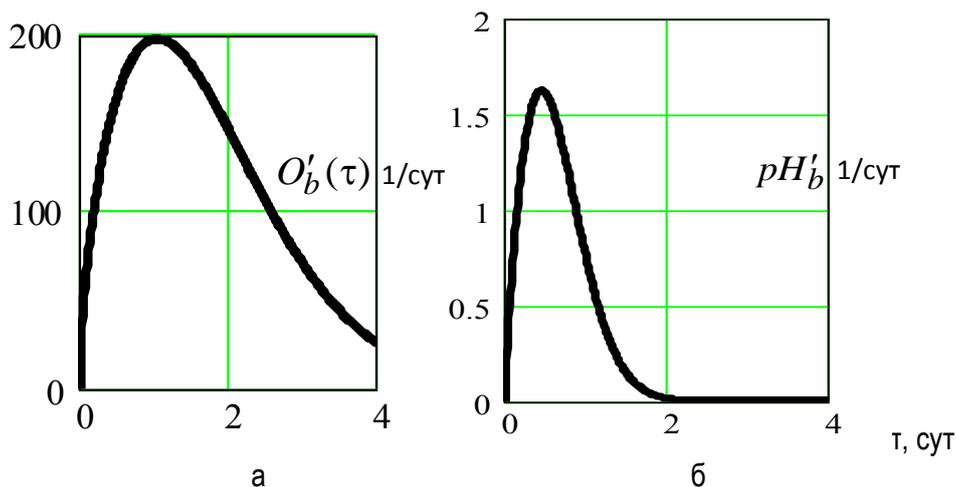


Рис. 3. Изменение скорости протекания биологических процессов во времени

Из графиков видно, что скорость потребления кислорода резко возрастает до максимума в течение 1,1 суток, снижаясь далее до нуля к 6–7-м суткам. Величина рН возрастает до максимума за 0,4 суток и далее также резко падает и к двум суткам достигает нуля.

Более пологое снижение скорости потребления кислорода по сравнению со скоростью снижения рН объясняется тем, что расход кислорода на первой стадии связан с образованием не только органических кислот, но и других веществ: диоксида углерода, этилового спирта, полисахаридов, ферментов и пр.

**Выводы.** Полученные данные позволяют:

– установить, что период от внесения в культуральную жидкость засевной культуры до 3–4 суток является первой стадией развития гриба, в течение которой гриб потребляет кислород, растворённый в культуральной жидкости, и после образования на поверхности жидкости сплошной плёнки потребление кислорода грибом начинает происходить из воздуха;

– сформулировать гипотезу о том, что на первой стадии развития гриба в культуральной жидкости продуцируются (или частично переходят из чайного раствора) прежде всего кислоты с высокой степенью диссоциации.

Гипотеза требует тщательной экспериментальной проверки. Для этого необходимо исследовать на первой стадии кинетики изменения концентраций кислот, имеющих высокую степень диссоциации, посуточно (в первые сутки, скорее всего через часы).

С целью расширения области применения

уравнений (1) и (3) необходимо установить функциональную зависимость входящих в них эмпирических коэффициентов от параметров, которые могут влиять на скорость протекания биологических процессов. К таким параметрам можно отнести температуру в культиваторе, концентрацию углеводов в культуральной жидкости, начальное содержание в ней кислорода и др.

### Литература

1. Даниелян Л.Т. Чайный гриб и его биологические особенности. – М.: Медицина, 2005. – 176 с.
2. Алиев Р.К., Аллахвердибеков Г.Б., Тагдиев Д.Г. К характеристике химического состава и некоторых фармакологических свойств настоя чайного гриба // Изв. АН Азербайджанской ССР. – 1955. – № 7. – С. 285–287.
3. Жумабекова К.А., Жумабекова Б.К. Получение высокоактивной ассоциации «чайного гриба» из природных штаммов микроорганизмов // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-11. – С. 2374–2376.
4. Головинская О.В., Федорова Р.А. Хлеб функционального назначения с добавкой настоя чайного гриба // Хлебопечение России – 2011. – № 6. – С. 22–23.
5. Арсеньева Т.П., Забодалова Л.А., Кудрявцева Т.А. Использование микрофлоры чайного гриба при производстве молочных продуктов лечебно-профилактического назначения: обзор. инф. – М.: Изд-во АгроНИИТЭИПП, 1997. – 16 с.

6. Приходько В.И. Химический состав чая // Copyright – 2013–2015. – URL: eda-edishka@rambler.ru.
7. Тишин В.Б. Культивирование микроорганизмов. Кинетика, гидродинамика, тепло-массообмен. – СПб., 2012. – 180 с.
8. Васильев Н.Н., Амбросов В.А., Складнев А.А. Моделирование процессов микробиологического синтеза. – М.: Лесн. пром-сть, 1975. – 341 с
9. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – 4-е изд. – М.: Химия, 1971. – 456 с.
10. Тишин В.Б., Головинская О.В. Эксперимент и поиск математических моделей кинетики биологических процессов: учеб. пособие. – СПб., 2015. – 108 с.
4. Golovinskaja O.V., Fedorova R.A. Hleb funkcional'nogo naznachenija s dobavkoj nastoja čajnogo griba // Hlebopechenie Rossii – 2011. – № 6. – S. 22–23.
5. Arsen'eva T.P., Zabodalova L.A., Kudrjavceva T.A. Ispol'zovanie mikroflory čajnogo griba pri proizvodstve molochnyh produktov lechebno-profilaktičeskogo naznachenija: obzor. inf. – M.: Izd-vo AgroNIITJelIPP, 1997. – 16 s.
6. Prihod'ko V.I. Himičeskij sostav čaja // Copyright – 2013–2015. – URL: eda-edishka@rambler.ru.
7. Tishin V.B. Kul'tivirovanie mikroorganizmov. Kinetika, gidrodinamika, teplomassoobmen. – SPb., 2012. – 180 s.
8. Vasil'ev N.N., Ambrosov V.A., Skladnev A.A. Modelirovanie processov mikrobiologičeskogo sinteza. – M.: Lesn. prom-st', 1975. – 341 s
9. Lur'e Ju.Ju. Spravochnik po analitičeskoj himii. – 4-e izd. – M.: Himija, 1971. – 456 s.
10. Tishin V.B., Golovinskaja O.V. Jeksperiment i poisk matematičeskijh modelej kinetiki biologičeskijh processov: učeб. posobie. – SPb., 2015. – 108 s.

### Literatura

1. Danieljan L.T. Čajnyj grib i ego biologičeskie osobennosti. – M.: Medicina, 2005. – 176 s.
2. Aliev R.K., Allahverdibekov G.B., Tagdiev D.G. K harakteristike himičeskogo sostava i nekotoryh farmakologičeskijh svojstv nastoja čajnogo griba // Izv. AN Azerbajdžanskoj SSR. – 1955. – № 7. – S. 285–287.
3. Žhumabekova K.A., Žhumabekova B.K. Polučenie vysokoaktivnoj asociacii «čajnogo griba» iz prirodnyh shtammov mikroorganizmov // Fundamental'nye issledovanija. – 2015. – № 2-11. – S. 2374–2376.

