

Масалітіна Н.Ю., к.техн.н, доцент, Близнюк О.М., д.техн.н, професор,
Белінська А.П., к.техн.н., доцент, Варанкіна О.О., к.техн.н., доцент,
Кричковська Л.В., д.біол.н., професор

ДОСЛІДЖЕННЯ АМІЛОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ В БІОТЕХНОЛОГІЇ СИМБІОТИЧНИХ КУЛЬТУР *MEDUSOMYCES GISEVII* ТА *ORYZAMYCES INDICI*

Національний технічний університет "Харківський політехнічний інститут", Харків

Ключові слова: симбіонт *Medusomyces Gisevii*, симбіонт *Oryzomyces Indici*, чайний гриб, культуральне середовище, культивування, метаболіти, амілолітична активність.

Вступ

Дисбіотичні порушення якісного і кількісного складу мікрофлори організму і її функцій, викликані різними причинами, як і раніше залишаються однією з провідних і найбільш важко вирішуваних проблем сучасної медицини. Порушення балансу мікробної екосистеми кишечника викликає зниження антагоністичної і метаболічної активності мікроорганізмів, що проявляється в порушенні травлення і всмоктування їжі, синтезу вітамінів, ферментів, амінокислот, зниження загальної резистентності та розвитку запальних процесів. В результаті цього виникають вторинні ускладнення, серед яких на перший план виступають порушення імунітету і метаболізму [1–3].

В останні роки серед різноманітних засобів боротьби з дисбактеріозом пріоритет віддається пробіотичним препаратам нового покоління. Саме тому для створення подібних препаратів принципове значення має підбір екологічно чистої, нешкідливої та недорогої сировини, яка містить речовини, що володіють як пробіотичною, так і широкою патогенетичною дією. В цьому відношенні особливу увагу привертає природний мікробний симбіонт *Medusomyces Gisevii* (чайний гриб) та *Oryzomyces Indici* (рисовий гриб), зокрема як їх зооглея, так і культуральна рідина *Medusomyces gisevii* та *Oryzomyces Indici*, чий багатий, полікомпонентний склад цілком може забезпечити вищевказані вигоди. Наявність в структурі зооглеї харчових волокон бактеріальної целюлози та висока концентрація біологічно активних речовин потенційно можуть забезпечити пробіотичний ефект [4–6]. Присутні в зооглеї у великій кількості оцтовокислі бактерії і дріжджі можуть бути активаторами неспецифічної і імунобіологічної реактивності організму. Клітинні стінки дріжджів є найсильнішим імуномодулятором, а оцтовокислі бактерії *Gluconacetobacter xylinus* виробляють гетерополісахарид ацетоксан, який посилює опірність організму до бактеріальних і вірусних інфекцій [7–10].

Крім того, в останні роки розширюються можливості використання мікроорганізмів як біотехнологічних джерел промислово важливих ферментів. Зокрема амілази привертають увагу дослідників завдяки їх технологічній важливості й економічній вигідності. Амілази становлять близько 30 % світової продукції ферментів. Вони характеризуються широким спектром застосування в різних галузях, в тому числі, таких як клінічна, медична і аналітична хімія, фармацевтична, промисловість. Разом із ліпазами і/або протеазами, амілази можуть бути використані для лікування травних розладів, при панкреатитах, циститних фіброзах, діабеті типу I і/або типу II [4, 11]. На сьогодні за ко-

рдоном описано близько 200 поліферментних лікарських засобів, що застосовують для поліпшення травлення, зокрема при диспепсії, гастриті, діареї. Наприклад, препарат сомілаза, який містить ліполітичний і амілолітичний ферменти і використовується для поліпшення травлення. Ефективну лікувальну й лікувально-профілактичну дію справляють засоби, до складу яких входить амілаза, і які використовують у стоматології. Культуральна рідина *Medusomyces Gisevii* в залежності від субстрату живильного середовища може використовуватися як функціональний напій для профілактики та лікування широкого спектра шлунково-кишкових та інших захворювань [4–6, 12].

Відомо, що продуцентами амілаз є мікроміцети (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*) і бактерії (*Bacillus*). В ході дослідження культуральної рідини *Medusomyces Gisevii* та *Oryzomyces Indici*, які представляють собою симбіотичні культури, що складаються з різних видів дріжджів, оцтовокислих та лактобактерій, виявлено високу амілолітичну активність, що дозволяє розглядати їх як перспективні джерела амілази [4, 13, 14].

Для першого етапу дослідження на основі теоретичних передумов до створення ефективних пробіотичних препаратів в якості сировини були обрані природні мікробні симбіонти *Medusomyces Gisevii* (чайний гриб) та *Oryzomyces Indici*, з яких готувалася експериментальна серія біологічно активної субстанції.

Medusomyces Gisevii є симбіотичне співтовариство мікроорганізмів, що складається переважно з різних видів бактерій і дріжджів. При цьому дріжджі і оцтовокислі бактерії вступають в симбіотичні відносини вже в першу добу спільного культивування, використовуючи в життєдіяльності свої метаболіти [1–3, 15]. Оцтово-кислотні бактерії (*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans*) та дріжджі (*Saccharomyces sp.*, *Zygosaccharomyces sp.*, *Torulopsis sp.*, *Pichia sp.*, *Bre anomyces sp.*) є основними мікроорганізмами, що представляють симбіотичне співтовариство чайного гриба. Варіація його складу може бути пов'язана з географічними, кліматичними та культурними умовами, а також залежить від типів диких дріжджів і бактерій, які існують локально [1–4].

Полікультура *Oryzomyces Indici* представляє собою асоціативний консорціум різних таксономічних груп мікроорганізмів *Zygosaccharomyces fermentati* Naganishi, *Pichia membranaefaciens* Hansen, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Acetobacter aceti*. Саме така комбінація мікроорганізмів дозволяє отримувати культуральну рідину шляхом зброджування вуглеводних субстратів, яка максимально збагачена біологічно цінними речовинами. Це досягається за рахунок того, що впродовж еволюції мікроорганізми консорціуму «навчилися» асимілювати продукти метаболізму одне одних. Крім того, продукти метаболізму *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Dextranicum* та *Acetobacter Aceti* відповідають за формування зооглеї в тому вигляді в якому вона є й виконують захисну функцію [3–5].

Мета та основні задачі дослідження

У даній роботі об'єктами дослідження була культуральна рідина *Medusomyces Gisevii* та *Oryzomyces Indici*. Предметом дослідження – амілолітична активність та фізико-хімічні показники культуральної рідини симбіонтів. Метою роботи є визначення оптимальних умов життєдіяльності симбіотичних культур для синтезу амілолітичних ферментів. Для досягнення мети були вирішені наступні задачі: визначити показники активної та титрованої кислотності; дослідити приріст біомаси в залежності від типу субстрату; вивчити вплив температури на життєдіяльність консорціуму мікроорганізмів *Oryzomyces Indici* та *Medusomyces Gisevii*; в лабораторних умовах дослідити амілолітичну активність *Oryzomyces Indici* та *Medusomyces Gisevii* у різних середовищах культи-

вування.

Матеріали та методи досліджень

Дослідження виконані в лабораторних умовах на відкаліброваному сертифікованому обладнанні з використанням стандартизованих реактивів і загальноприйнятих методик.

Видовий склад *Medusomyces Gisevii* дуже різноманітний і залежить від умов, місця і часу культивування. Складовими частинами симбіонту *Medusomyces Gisevii* є: культуральна рідина, зооглея (лат. *zoogloea* – біоценоз, колонії мікроорганізмів що мають загальну гелеподібну або слизову капсулу), мезоглея (наповнена водою сполучна тканина, основу якої складає білок колаген) та осад.

Культуральна рідина складається з поживних субстратів, продуктів життєдіяльності мікроорганізмів і окремих бактерій, які перемішуються в об'ємі за рахунок дифузії, тому в ній містяться органічні і неорганічні кислоти, білки, ліпіди, вуглеводи, вітаміни, ферменти, пігменти, нуклеїнові кислоти, азотисті основи, етанол та ін. Спектр органічних кислот дуже широкий, і в його складі можна виділити, перш за все, оцтову, глюконову, лимонну, щавлеву, молочну, та яблучну кислоти. Завдяки тому, що в процесі культивування симбіонту живильне середовище насичується етанолом і оцтовою кислотою, створюються умови для формування природного захисту симбіотичного спільноти від обсіменіння сторонньою мікрофлорою.

У культуральній рідині визначається активність амілаз, кислих і нейтральних протеаз, а також високий вміст вітамінів С і Р, які проявляють антиоксидантні властивості [5, 6].

Культивування симбіонту здійснювалося в лабораторних умовах на рідкому поживному середовищі, приготовленому наступним чином: в киплячу воду об'ємом 1 л додавали 100 г цукру до повного його розчинення, потім в цей розчин на 20 хвилин поміщали марлевий мішечок, що містить 10 г чорного чаю, після чого охолоджували його природним шляхом до кімнатної температури (24–26 °C). У скляну ємність з отриманим середовищем вносили культуру *Medusomyces Gisevii* в кількості 1% від загального об'єму живильного середовища (10 мл). Ємність накривали чотиришаровою марлевою серветкою, що забезпечує доступ кисню, необхідного для нормальної життєдіяльності бактерій симбіонту. Культивування проводили в стаціонарному стані за температури 24–26 °C.

Культуральну рідину полікультури *Oryzomyces Indici* отримували аналогічно. Як культуральне середовище для *Oryzomyces Indici* використовували 10 % цукровий розчин з додаванням сухого винограду, а також сироватку з додаванням сухого винограду та суміш води з молоком (10 % молока).

Оскільки основним продуктом ферментації при культивуванні *Medusomyces Gisevii* та *Oryzomyces Indici* являються органічні кислоти, то контроль розвитку культури здійснювався за величиною титруємої кислотності. Активна кислотність визначалася потенціометричним методом на стаціонарному рН-метрі. Вимірювання загальної кислотності проводили титруванням стандартним розчином NaOH (0,1 N) в присутності фенолфталеїну. Для визначення амілолітичної активності використовували метод, який заснований на гідролізі крохмалю ферментами амілолітичного комплексу до декстринів різної молекулярної маси в нашій модифікації [3–6].

Результати дослідження

В якості досліджуваного об'єкта виступала культуральна рідина *Medusomyces Gisevii* та *Oryzomyces Indici*. Були отримані зразки на різних етапах культивування, яке

здійснювали протягом чотирьох місяців при різній температурі за класичною методикою на живильному середовищі. Культуральна рідина складається з кип'яченої питної води, сахарози (5–15 %) та екстракту чорного чаю (0,1 %) для *Medusomyces Gisevii*. *Oryzomyces Indici* було досліджено у різних середовищах культивування. Для зразка № 1 було обрано середовище – вода «Роганська» без газу з додаванням 5 % сахарози та сухого винограду, для зразку № 2 – вода «Рай Оленівка» з додаванням 5 % сахарози та сухого винограду, для зразку № 3 – сироватка з додаванням сухого винограду, для зразку № 4 – вода з додаванням 5 % сахарози та 10 % молока.

Зважаючи на те, що кислотність є однією з найважливіших ознак, які характеризують стан життєдіяльності досліджуваної культури, та вирішальною з точки зору органолептичних якостей, за узагальнений критерій закінчення стадії бродіння вибрано показник кислотності при контрольованому зниженні вмісту сухих речовин.

В процесі бродіння відбуваються складні біохімічні перетворення, головними з яких є ферментативний каталіз. Встановлено, що початковою стадією зброджування суслу консорціумом *Medusomyces Gisevii* є інверсія сахарози до глюкози та фруктози під дією інвертази дріжджів з наступним спиртовим зброджуванням одержаного інвертного цукру в етанол, діоксид вуглецю та ін. продукти. В подальшому оцтовокислі бактерії споживають етанол з утворенням оцтової кислоти [1–4].

Загальну кислотність культуральної рідини *Medusomyces Gisevii* визначали для зразків № 1 (концентрація сахарози 10 %), № 2 (концентрація сахарози 5 %), № 3 (концентрація сахарози 5 %) та № 4 (концентрація сахарози 15 %) протягом сорока діб. Залежність рН від часу культивування зразків № 1, № 2, № 3 та № 4 представлено на рис. 1.

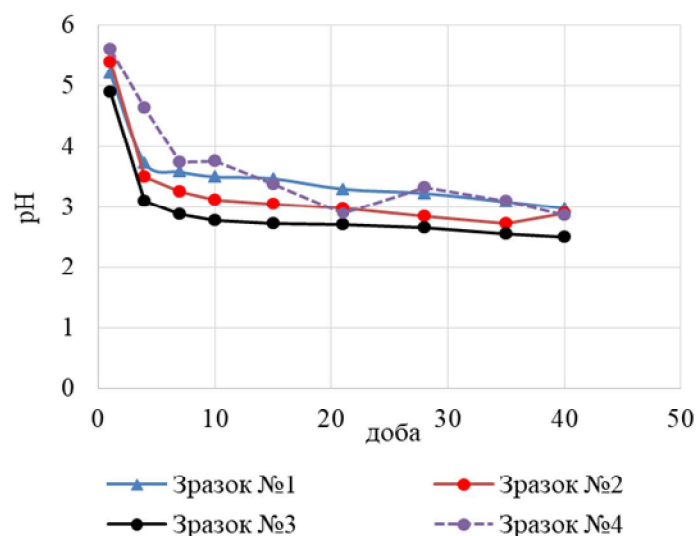


Рисунок 1 – Залежність рН від часу культивування *Medusomyces Gisevii*:

1 – середовище на основі води «Моршанська»; 2 – середовище на основі води «Рай-Оленівка»; 3 – середовище на основі сироватки; 4 – середовище на основі води (90 %) та молока (10 %)

На рис. 1 показані криві зміни рН від часу культивування *Medusomyces Gisevii*. Видно, що для всіх зразків протягом всього часу культивування *Medusomyces Gisevii* спостерігається зниження величин рН, що обумовлено накопиченням в культуральному середовищі органічних кислот, і перш за все, оцтової кислоти.

Загальна кислотність культуральної рідини *Medusomyces Gisevii* на протязі 40 діб плавно зменшувалась в результаті синтезу продуктів життєдіяльності *Medusomyces*

Gisevii для всіх досліджуваних зразків. Для зразків №2 та №3 виявлено більш різке зниження рН на четверту добу культивування, порівняно із для зразками №1 та №4. Це свідчить про те, що оптимальна концентрація сахарози для нарощування біомаси *Medusomyces Gisevii* становить 5 %, оскільки зростання концентрації кислот відбувається швидше із збільшенням маси симбіонту.

Визначення активної кислотності культурального середовища *Oryzomyces Indici* проводили протягом восьми діб культивування. Залежність рН від часу культивування зразків № 1, № 2, № 3 та № 4 представлено на рис. 2.

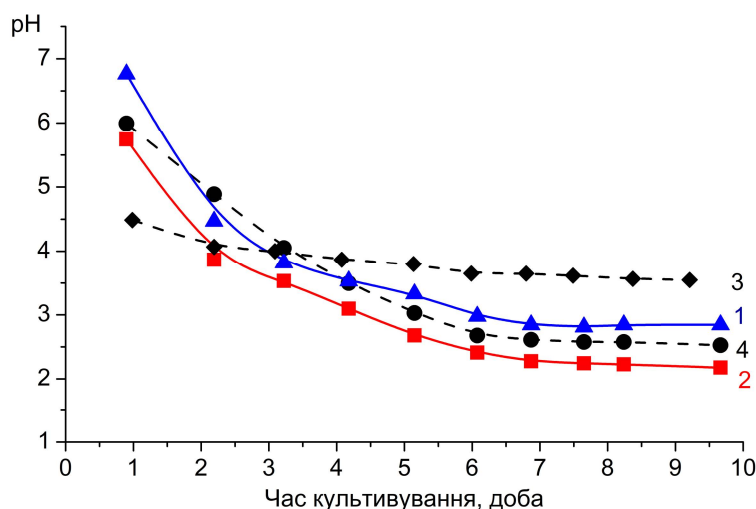


Рисунок 2 – Залежність рН від часу культивування *Oryzomyces indicі*:

- 1 – середовище на основі води «Моршанська»; 2 – середовище на основі води «Рай-Оленівка»;
3 – середовище на основі сироватки; 4 – середовище на основі води (90 %) та молока (10 %)

Активна кислотність рисового гриба на протязі семи діб плавно зменшувалась в результаті синтезу продуктів життєдіяльності *Oryzomyces Indici*. Таке активне накопичення кислот обумовлено розвитком ацидофільних мікроорганізмів (молочнокислих і оцтовокислих бактерій), що здатні ферментувати вуглеводи з утворенням органічних кислот.

Для нормального росту і розвитку полікультури потрібне живильне середовище, яке могло б задовольняти потреби симбіотичної спільноти.

Для вибору оптимальних термінів культивування для нарощування достатнього об'єму біомаси зооглеї дослідження проводились в десятикратних повторях. У 5 ємностях об'ємом 1 л зі стандартною живильним середовищем одночасно засівали культуру чайного гриба за стандартною методикою [3–5].

Основними критеріями при виборі оптимальних термінів культивування зооглеї були її фізичні і мікроскопічні характеристики: маса і товщина зооглеї, сформованість матриці, що оцінювалися візуально по щільності (частоті) целюлозних волокон в полі зору мікроскопа, а також загальна кількість життєздатних мікроорганізмів консорціуму, що знаходяться безпосередньо в тілі зооглеї. Облік результатів проводили на 2, 6, 15, 20 та 27 добу культивування. Зооглею використовували для всіх видів досліджень тільки з однієї ємності, щоб уникнути додаткової мікробної контамінації.

В дослідженні *Medusomyces Gisevii* використовувалась сахароза різної концентрації для виявлення залежності маси зооглеї від концентрації сахарози. Залежність приросту біомаси від концентрації сахарози представлена на рис. 3.

Результати дослідження, що приведені на рис. 3, свідчать, що концентрація са-

харози 5 % є найбільш доцільною, оскільки дає максимальний приріст маси зооглеї *Medusomyces Gisevii*. Подальше збільшення концентрації сахарози зменшує приріст маси. За концентрації 15 % спостерігався мінімальний приріст маси зооглеї.

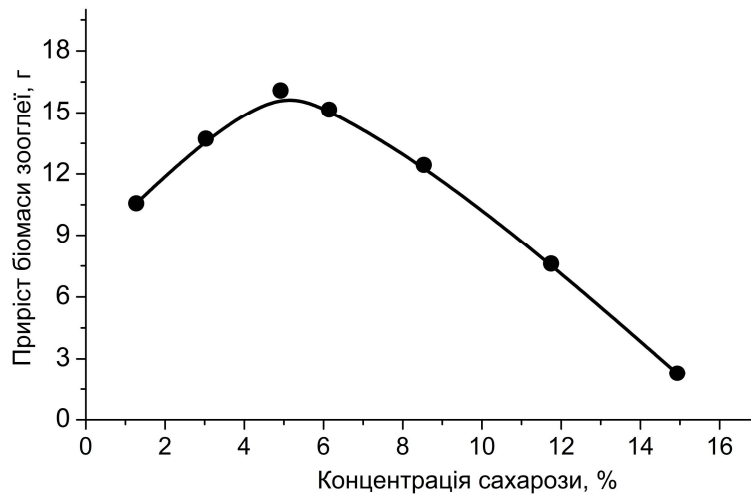


Рисунок 3 – Залежність приросту біомаси *Medusomyces Gisevii* від концентрації сахарози

В результаті дослідження було встановлено, що *Oryzomyces Indici* розвивається не тільки в середовищах, що містять водний розчин сахарози, але й в середовищах на молочній основі, тобто таких, що містять лактозу. Було встановлено, що внесення у поживне середовище лактози (концентрація молока 10 %) сприяє прискореному зростанню біомаси. Це можна використовувати на стадії отримання інокуляту.

Залежність приросту біомаси від концентрації сахарози представлено на рис. 4.

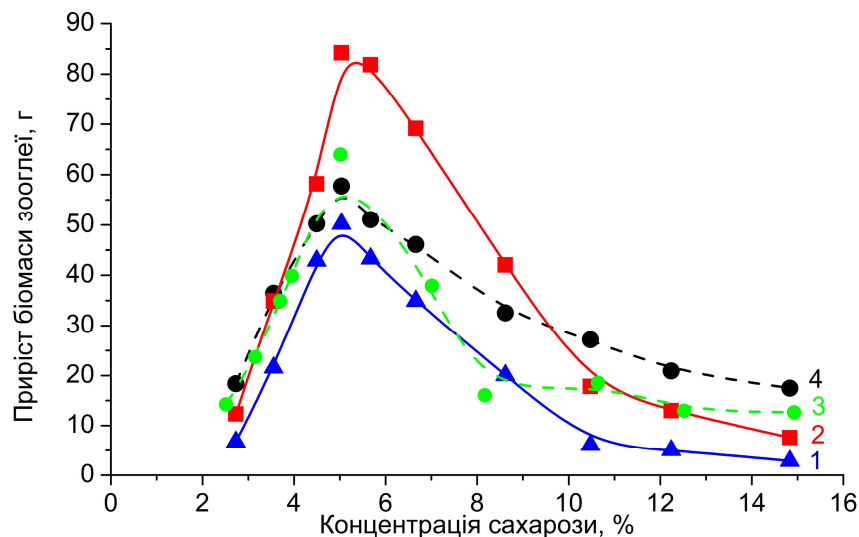


Рисунок 4 – Залежність приросту біомаси зооглеї *Oryzomyces Indici* від концентрації сахарози:
 1 – середовище на основі води «Роганська»; 2 – середовище на основі води «Рай-Оленівка»;
 3 – середовище на основі сироватки; 4 – середовище на основі води (90 %) та молока (10%)

На сироватці приріст біомаси становить в середньому з 22 г до 91 г. В молоці з 32 г – до 84 г. Це пов'язано з наявністю в зооглеї молочнокислих бактерій. Але сам гриб стає дрібним і пухким. На воді приріст біомаси становить з 34 г – до 36 г на воді «Ро-

ганська» та з 15 г – до 36 г на воді «Рай-Оленівка». На воді максимальна маса спостерігається на четверту добу культивування; у сироватці маса зростає на сьому добу; у молоці максимальна маса становить на третю добу культивування.

При дослідженні впливу води з різним хімічним складом, відібраної з різних джерел та обробленої різними способами, на процес зброджування суслу культурою *Medusomyces Gisevii* встановлено загальну тенденцію негативного впливу жорсткості на динаміку бродіння, що свідчить про необхідність підготовки води для культивування консорціуму.

Було порівняно два зразки води («Роганська» та «Рай-Оленівка»), на якій проводилось культивування досліджуваного консорціума та виявлено, що гриб має кращі фізико-хімічні та органолептичні показники на воді «Рай-Оленівка». Оскільки вода «Рай-Оленівка» – слабомінералізована, гідрокарбонатна, складного катіонного складу (в основному магнієво-кальцієво-натрієва), рН = 7,3, сухий залишок 0,025 %, твердість 6,2, містить кремнієву кислоту і органічні речовини, які сприятливо впливають на біосинтетичні та метаболічні процеси рисового гриба *Oryzomyces Indici*.

Оптимальна концентрація сахарози для нарощування біомаси *Oryzomyces Indici* становить 5 %. Однак зростання пригнічується за умови зростання концентрації вуглеводів в середовищі.

Проведені дослідження впливу температури на життєдіяльність *Medusomyces Gisevii* показали, що підвищення температури від 17 до 30°C при культивуванні призводить до зниження рівня активної кислотності в обернено пропорційній залежності. Зниження рівня активної кислотності свідчить про утворення таких метаболітів, як оцтова, янтарна, глюконова, молочна та яблучна кислоти. Концентрація кислот зростає прямо пропорційно підвищенню температури культивування в досліджуваному діапазоні.

Температурним оптимумом для симбіотичної культури *Oryzomyces Indici* є значення 25 ± 5 °C. Підвищення температури більше 25 °C призводить до часткового термічного лізису дріжджової мікрофлори полікультури. Наслідком чого стає мікробний дисбаланс полікультури, що призводить до змін в кінцевому елементному складі культуральної рідини. Крім того, при подальшому культивуванні полікультура *Oryzomyces Indici* «розпадається» на окремі мікроорганізми. В свою чергу зниження температури від 20 °C до 18 °C призводить до інгібування процесів, що проходять в клітинах мікроорганізмів, що в свою чергу подовжує час культивування. А зниження температури нижче 18 °C призводить до інактивації клітинних процесів окремих мікроорганізмів, що у подальшому веде до загибелі консорціуму мікроорганізмів *Oryzomyces Indici*.

Встановлено, що *Medusomyces Gisevii* та *Oryzomyces Indici* симбіотичні культури як аеробних, так і анаеробних мікроорганізмів, то для його нормальної життєдіяльності необхідний доступ до кисню. Це пов'язано з тим, що більшість процесів ферментації, що відбуваються при культивуванні чайного гриба, є аеробними.

На першій стадії розвитку (3–4 добу) *Medusomyces Gisevii* споживає кисень, розчинений у культуральній рідині, а після утворення на поверхні рідини суцільної плівки споживання кисню грибом починає відбуватися з повітря. Якщо не має доступу кисню, гриб не здатний повноцінно розвиватися, він починає газуватися, на ньому може утворюватися цвіль.

При недостатці кисню *Oryzomyces Indici* не здатний повноцінно розвиватися, на ньому може утворюватися цвіль, він стає слизьким та починає спливати.

Визначення амілолітичної активності культуральної рідини полікультур проводили методом, що заснований на гідролізі крохмалю ферментами амілолітичного ком-

плексу до декстринів різної молекулярної маси. Амілолітична активність характеризує здатність амілолітичних ферментів каталізувати гідроліз крохмалю до декстринів і виражається числом одиниць зазначених ферментів в 1 г препарату [6].

За одиницю амілолітичної активності прийнята здатність ферменту при певних значеннях температури, рН та часу гідролізу до декстринів різної молекулярної маси 1 г крохмалю, що становить 30 % крохмалю, введеного в реакцію [6].

Ступінь гідролізу крохмалю (С) визначають за різницею оптичної густини контрольного розчину і розчину, що аналізується. Ступінь гідролізу крохмалю (С) обчислюють за формулою (1):

$$C = 0,1 \cdot (D_1 - D_2) / D_1, \quad (1)$$

де D_1 – оптична густина контрольного розчину; D_2 – оптична густина аналізованого розчину; 0,1 – маса крохмалю, взятого на аналіз, г.

Розрахунок амілолітичної активності в пробі (АС) обчислювали за формулою (2):

$$AC = 1000 \cdot (5,885 \cdot C + 0,001671) / \Pi, \quad (2)$$

де 5,885; 0,001671 – коефіцієнти розрахункового рівняння, що отримані при математичній обробці експериментальних даних залежності маси гідролізованого крохмалю від маси ферменту, взятого для аналізу в перерахунку на 1 с дії ферменту; С – коефіцієнт, що характеризує ступінь гідролізу крохмалю; Π – маса ферментного препарату з урахуванням розведення, яка взята для випробування, мг; 1000 – коефіцієнт перерахунку мг в г.

Результати визначення амілолітичної активності культуральної рідини *Medusomyces Gisevii*, представлені в табл. 1. Порівняння амілолітичної активності досліджуваних зразків культуральної рідини *Medusomyces Gisevii* представлено на рис. 5.

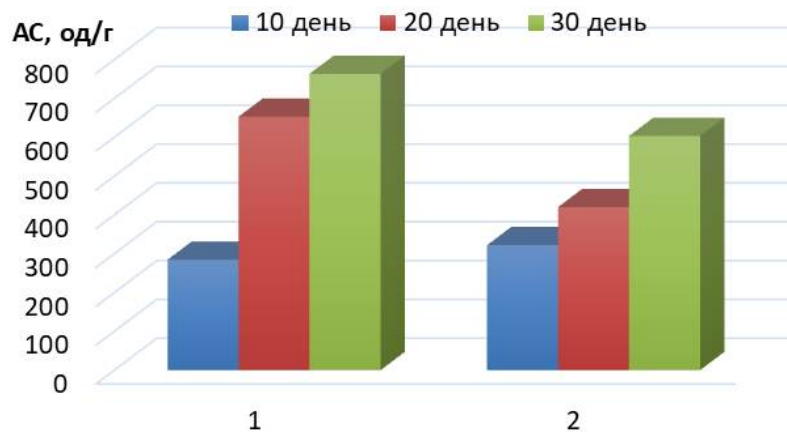


Рисунок 5 – Порівняння амілолітичної активності досліджуваних зразків культуральної рідини *Medusomyces Gisevii*: 1 – зразок № 1, 2 – зразок № 2

Дослідження динаміки зміни амілолітичної активності культуральної рідини чайного гриба свідчить, що амілолітична активність закономірно зростає з десятої по тридцяту добу культивування до 763,5 од/г (зразок № 1) та 603,6 од/г (зразок № 2).

Таблиця 1 – Результати дослідження амілолітичної активності культуральної рідини *Medusomyces Gisevii*

| Термін культивування | Зразок № 1 | | | Зразок № 2 | | | Контрольна проба |
|---------------------------|----------------|--------|----------|----------------|--------|----------|------------------|
| | D ₂ | C | АС, од/г | D ₂ | C | АС, од/г | D ₁ |
| 10 | 0,25 | 0,0218 | 259,9 | 0,23 | 0,0281 | 334,4 | 0,32 |
| | 0,23 | 0,0281 | 334,4 | 0,23 | 0,0281 | 334,4 | |
| | 0,25 | 0,0218 | 259,9 | 0,24 | 0,025 | 297,6 | |
| Сумарне значення Σ | 0,243 | 0,0239 | 284,7 | 0,23 | 0,0271 | 322,13 | |
| 20 | 0,16 | 0,05 | 591,8 | 0,2 | 0,0375 | 444,7 | |
| | 0,13 | 0,0594 | 702,2 | 0,19 | 0,0406 | 481,5 | |
| | 0,14 | 0,0563 | 665,4 | 0,23 | 0,0281 | 334,4 | |
| Сумарне значення | 0,143 | 0,0552 | 653,1 | 0,206 | 0,0354 | 420,2 | |
| 30 | 0,11 | 0,0656 | 775,7 | 0,13 | 0,059 | 697,8 | |
| | 0,12 | 0,0625 | 738,9 | 0,18 | 0,044 | 521,2 | |
| | 0,11 | 0,0656 | 775,7 | 0,16 | 0,05 | 591,8 | |
| Сумарне значення Σ | 0,11 | 0,0646 | 763,5 | 0,156 | 0,051 | 603,6 | |

Амілолітична активність культуральної рідини *Oryzomyces Indici* представлена на рис. 6 для різних середовищ культивування.

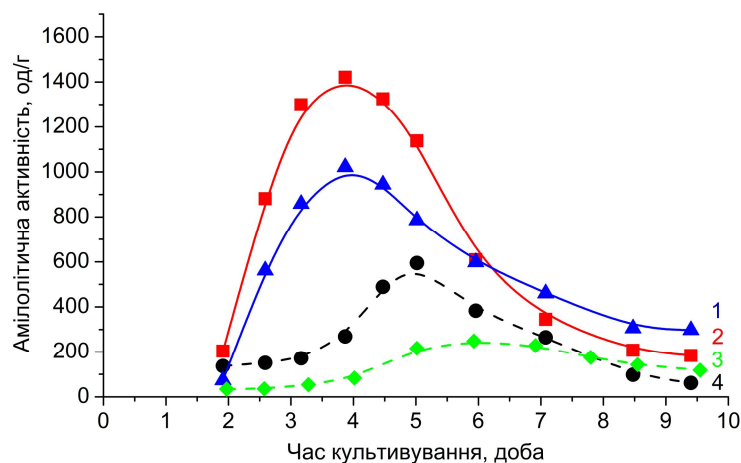


Рисунок 6 – Порівняння амілолітичної активності досліджуваних зразків культуральної рідини *Oryzomyces Indici*: 1 – середовище на основі води «Моршанська», негазована; 2 – середовище на основі води «Рай-Оленівка»; 3 – середовище на основі сироватки; 4 – середовище на основі води (90 %) та молока (10 %)

Результати дослідження, свідчать, що культуральна рідина *Oryzomyces Indici* 1-го і 2-го зразка, де основа культурального середовища складає вода, амілолітична активність зростає з 2-х по 4-ту добу культивування до 941,2 од/г (зразок №1) та 1386,1 од/г (зразок №2), з 5-х по 7 добу культивування АС зменшується до 250,2 од/г (зразок №1)

та 171,47 од/г (зразок №2). Для 3-го зразка, де основа культурального середовища складає сироватка, амілолітична активність починає зростати з 4–5-ї доби культивування до 249,2 од/г, а на 7–8-му добу культивування амілолітична активність зменшується до 171,5 од/г. Для четвертого зразку (культуральне середовище на основі суміші, що містить 90 % води та 10% молока) амілолітична активність зростає з третьої по п'яту добу культивування до 573,9 од/г, а на восьму добу культивування амілолітична активність зменшується до 87,6 од/г.

Висновки

За результатами аналітичного огляду наукової літератури та проведених досліджень фізико-хімічних показників культуральної рідини *Medusomyces Gisevii* та *Oryzomyces Indici* встановлена оптимальна температура для життєдіяльності симбіонтів яка становить 25–30 °С. Проведені дослідження впливу аеробних умов свідчать, що дефіцит кисню в живильному середовищі може сприяти зниженню дихальної та метаболічної активності симбіонту, що супроводжується пригніченням спільної діяльності мікроорганізмів. Встановлена оптимальна концентрація сахарози для нарощування біомаси *Medusomyces Gisevii* та *Oryzomyces Indici*, яка становить 5 %, оскільки зростання біомаси пригнічується із зростанням концентрації вуглеводів в середовищі, концентрація сахарози 15 % та вище не рекомендується для застосування. Дослідження загальної кислотності середовища культивування *Oryzomyces Indici* протягом 7 днів та кислотності середовища культивування *Medusomyces Gisevii* протягом 40 днів показали, що кислотність плавно зменшується в результаті синтезу продуктів життєдіяльності консорціуму. Визначено, що сироватка та середовище культивування вода «Рай-Оленівка» є найбільш доцільним за складом середовищем для нарощування біомаси *Oryzomyces Indici*. Досліджена динаміка зміни амілолітичної активності культуральної рідини *Medusomyces Gisevii* та *Oryzomyces Indici*. Результати дослідження свідчать про те, що культуральна рідина полікультур проявляє високу амілолітичну активність, що дозволяє вважати інокулят перспективною біотехнологічною сировиною як джерела амілази.

Таким чином, запропонований режим культивування та склад поживних середовищ дозволяє отримати культури *Medusomyces Gisevii* та *Oryzomyces Indici* з високими ростовими показниками та одержати продукт високої якості.

Література

1. Goh W.N., Rosma A., Kaur B., Fazilah A., Karim A.A., Rajeev B. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose // International Food Research Journal. 2012. Vol. 19 (1). P. 109–117.
2. Lee K.Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites // Macromol. Biosci. 2014. Vol. 14 (1). P. 10–32.
3. Рогожин Ю.В., Рогожин В.В. Использование кондуктометрического метода для контроля за продуктивностью *Medusomyces gisevii* // Стратегические направления развития АПК стран СНГ: тр. XVI Междунар. науч.-практ. конф. Барнаул, 2017. С. 518–520.

4. F. De Filippis, A. D. Troise, P. Vitaglione, and D. Ercolini, Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation // Food Microbiology. 2018. Vol. 73. P. 11–16.
5. S. Chakravorty, S. Bhattacharya, A. Chatzinotas, W. Chakraborty, D. Bhattacharya, and R. Gachhui. Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics // International Journal of Food Microbiology. 2016. Vol. 220. P. 63–72.
6. E. Ivanisova, K. Menhartova, M. Terentjeva, and L. Godocikova. Kombucha tea beverage: microbiological characteristic, antioxidant activity, and phytochemical composition // Acta Alimentaria. 2019. Vol. 48. no. 3. P. 324–331.
7. Жумабекова К.А., Жумабекова Б.К. Получение высокоактивной ассоциации «чайного гриба» из природных штаммов микроорганизмов // Фундаментальные исследования. 2015. № 2-11. С. 2374–2376.
8. Chu S., Chen C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha // Food Chemistry. 2006. № 98. P. 502–507.
9. Гладышева Е.К. Изучение биосинтеза бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces Gisevii* J. Lindau на средах с различной начальной концентрацией глюкозы // Фундаментальные исследования. 2015. № 2-1. С. 13–17.
10. Добрыня Ю. М., Аванесян С.С., Бондарева Н.И. Динамика амилолитической активности культуральной жидкости *Medusomyces Gisevii* (чайного гриба) в процессе культивирования // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – Режим доступа: <https://scienceeducation.ru/ru/article/view?id=18777>.
11. Battikh H., Bakhrouf A., Ammar E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues LWT // Food Sci. Technol. – 2012. – Vol. 47, № 1. – P. 71–77.
12. Jayabalan R., Marimuthu S., Swaminathan K.. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation // Food Chemistry. 2007. Vol. 102, №1. P. 392–398.
13. Загребельний Д.Є., Масалітіна Н.Ю., Близнюк О.М. Дослідження біотехнології накопичення метаболітів *Oryzomyces Indici* та впливу їх на організм людини // В кн.: XIV Міжнародна науково-практична конференція магістрантів та аспірантів «Теоретичні та практичні дослідження молодих науковців», 01–04 грудня 2020 року / за ред. проф. Є.І. Сокола. Харків : НТУ «ХПІ», 2020. С. 359.
14. Гугніна Ю.О., Масалітіна Н.Ю., Близнюк О.М. Дослідження біотехнологічних властивостей тибетського гриба // В кн.: XIV Міжнародна науково-практична конференція магістрантів та аспірантів «Теоретичні та практичні дослідження молодих науковців», 01–04 грудня 2020 року / за ред. проф. Є.І. Сокола. – Харків : НТУ «ХПІ», 2020. – С. 365.
15. Андрощук Д.Р., Масалітіна Н.Ю. Дослідження біотехнології життєдіяльності природного симбіонту *Oryzomyces Indici* в різних середовищах культивування для її застосування у молочній промисловості // В кн.: Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я: тези доповідей XXIX міжнародної науково-практичної конференції MicroCAD-2020, 28–30 жовтня 2020 р.: Ч. II. / за ред. проф. Сокола Є.І. Харків: НТУ «ХПІ». С. 113.

Bibliography (transliterated)

1. Goh W.N., Rosma A., Kaur B., Fazilah A., Karim A.A., Rajeev B. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose // *International Food Research Journal*. 2012. Vol. 19 (1). P. 109–117.
2. Lee K.Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites // *Macromol. Biosci.* 2014. Vol. 14 (1). P. 10–32.
3. Rogozhin Yu.V., Rogozhin V.V. Ispolzovanie konduktometricheskogo metoda dlya kontrolya za produktivnostyu *Medusomyces gisevii* // Tr. XVI Mezhdunar. nauchno-praktich. konf. «Strategicheskie napravleniya razvitiya APK stran SNG». Barnaul, 2017. P. 518–520 (in Russian).
4. F. De Filippis, A. D. Troise, P. Vitaglione, and D. Ercolini, Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation // *Food Microbiology*. 2018. Vol. 73. P. 11–16.
5. Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinotas A., Chakraborty W., Bhattacharya D., Gachhui R. Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics // *International Journal of Food Microbiology*. 2016. Vol. 220. P. 63–72.
6. E. Ivanisova, K. Menhartova, M. Terentjeva, and L. Godocikova. Kombucha tea beverage: microbiological characteristic, antioxidant activity, and phytochemical composition // *Acta Alimentaria*. 2019. Vol. 48. no. 3. P. 324–331.
7. Zhumabekova K.A., Zhumabekova B.K. Poluchenie vysokoaktivnoj asociacii «chajnogo griba» iz prirodnyh shtammov mikroorganizmov // *Fundamental'nye issledovaniya*. 2015. № 2-11. P. 2374–2376 (in Russian).
8. Chu S., Chen C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha // *Food Chemistry*. (2006). № 98. P. 502–507.
9. Gladysheva Ye.K. Izucheniye biosinteza bakterial'noy tsellyulozy kul'turoy *Medusomyces Gisevii* J. Lindau na sredakh s standartnoy kontsentratsiyey glyukozy // *Fundamental'nyye issledovaniya*. 2015. № 2-1. P. 13–17 (in Russian).
10. Dobrynja J.M., Avanesjan S.S., Bondareva N.I., Timchenko L.D., Rzhepakovskij I.V., Simechjova E.I. Dinamika amiloliticheskoy aktivnosti kul'tural'noy zhidkosti *Medusomyces Gisevii* (chajnogo griba) v protsesse kul'tivirovaniya // *Modern problems of science and education*. 2015. №3 (in Russian).
11. Battikh H., Bakhrouf A., Ammar E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues LWT // *Food Sci. Technol.* – 2012. – Vol. 47, № 1. – P. 71–77.
12. Jayabalan R., Marimuthu S., Swaminathan K.. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation // *Food Chemistry*. 2007. Vol. 102, №1. P. 392–398.
13. Zagrebel'niy D.Ê., Masalítina N.Yu., Bliznjuk O.M. Rassmotreniye biotekhnologiy nakopleniya metabolitov *Oryzomyces Indici* i ikh ispol'zovaniya na organizm lyudey // V kn.: KHIV Mezhdunarodnaya nauka-praktika konferents-magnív i aspirantív «Teoreticheskiye i nauchnyye issledovaniya / issledovaniya 2020 goda». prof. Ê.Í. Sokola. Kharkív: NTU «KHPÍ», 2020. P. 359 (in Ukrainian).

14. Gugnina Yu.O., Masalitina N.Yu., Bliznjuk O.M. Rassmotreniye biotekhnologicheskikh vlastnykh svoystv tibetskogo griba // V kn .: KHIV Mezhdunarodnaya nauka-praktichna kon-ferentsiya magistrantiv i aspirantiv «Teoreticheskiye i praktichnyye issledovaniya molodozhi na-ukovtsivnya», 01–04 / dekabr' 2020 goda. prof. É.Í. Sokola. - Kharkiv: NTU «KHPI», 2020. P. 365. (in Ukrainian).

15. Androshchuk D.R., Masalitina N.Yu. Doslidzhennya biotekhnolohiyi zhyttyediyal'nosti pryrodnoho simbiontu *Oryzomyces Indici* v riznikh seredovyscha kul'tivuvannya dlya ee za-Stosuvannya u molochniy promislivosti // V kn .: Informatsiyni tekhnolohiyi: nauka, tekhnika, tekhnolohiya, osvita, zdorov'ya: tezy dopovidey KHXIKH mizhnarodnoyi naukovo-praktychnoyi konferentsyy MicroCAD-2020, zhovtnya 2020. ch. II. / Za red. prof. Sokola YE.I. Kharkiv: NTU «KHPI». P. 113. (in Ukrainian).

УДК 541.127: 542.943

УДК 579.852.11.222

Масалітіна Н.Ю., к.техн.н, доцент, Близнюк О.М., д.техн.н, професор,
Белінська А.П., к.техн.н., доцент, Варанкіна О.О., к.техн.н., доцент,
Крічковська Л.В., д.техн.н, професор

ДОСЛІДЖЕННЯ АМІЛОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ В БІОТЕХНОЛОГІЇ СИМБІОТИЧНИХ КУЛЬТУР *MEDUSOMYCES GISEVII* ТА *ORYZAMYCES INDICI*

На підставі аналізу літературних джерел встановлено, що природні симбіонти *Medusomyces Gisevii* та *Oryzomyces Indici* є цінним біотехнологічними об'єктами. Актуальним є пошук способів впливу на нього з метою отримання тих чи інших продуктів його життєдіяльності. На даний час є актуальним пошук мікроорганізмів продуцентів ферментів, в тому числі амілази. Одним з перспективних в цьому плані біооб'єктів є природні мікробні симбіонти *Medusomyces Gisevii* (чайний гриб) і *Oryzomyces Indici*, які завдяки неідентичності мікробіологічного складу та різних умов вирощування можуть мати різний компонентний склад метаболітів. Проведено дослідження амілолітичної активності культуральної рідини *Medusomyces Gisevii* і *Oryzomyces Indici* з різними термінами культивування. Вирощування гриба здійснювалося в лабораторних умовах за класичною методикою. Встановлена оптимальна концентрація сахарози для нарощування біомаси *Medusomyces Gisevii* та *Oryzomyces Indici*, яка становить 5 %. Концентрація сахарози 15 % та вище не рекомендується для застосування через пригнічення зростання біомаси із зростанням концентрації вуглеводів в культуральному середовищі. Встановлено, що дані симбіонти починають проявляти амілолітичну активність вже на 7-8-му добу культивування в стандартному живильному середовищі, середовищі з додаванням 10% молока і середовищі на основі сироватки. З плином часу амілолітична активність підвищується. Однак інтенсивність метаболізму мікроорганізмів, критерієм якої є співвідношення загальної і екзогенної амілази, найбільш виражена на ранніх термінах культивування. Встановлено, що культуральна рідина полікультур проявляє високу амілолітичну активність. Даний факт дозволяє вважати інокулят *Medusomyces Gisevii* і

Oryzomyces Indici перспективною біотехнологічною сировиною як джерела фермента амілази.

Ключові слова: симбіонт *Medusomyces Gisevii*, симбіонт *Oryzomyces Indici*, чайний гриб, культуральне середовище, культивування, метаболіти, амілолітична активність.

Масалитина Н.Ю., к.техн.н., доцент, Близнюк О.Н., д.техн.н., професор,
Белинская А.П., к.техн.н., доцент, Варанкина А.А., к.техн.н., доцент,
Кричковская Л.В., д.техн.н., професор

ИССЛЕДОВАНИЯ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В БИОТЕХНОЛОГИИ СИМБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР *MEDUSOMYCES GISEVII* ТА *ORYZAMYCES INDICI*

На основании анализа литературных источников установлено, что природные симбионты *Medusomyces Gisevii* и *Oryzomyces Indici* являются ценными биотехнологическими объектами. Актуальным является поиск способов воздействия на него с целью получения тех или иных продуктов его жизнедеятельности. В настоящее время представляется актуальным поиск микроорганизмов продуцентов ферментов, в том числе амилазы. Одним из перспективных в этом плане биообъектов является природный микробный симбионт *Medusomyces Gisevii* (чайный гриб) и *Oryzomyces Indici*, которые благодаря неидентичности микробиологического состава и различным условиям выращивания могут иметь различный компонентный состав метаболитов. Проведены исследования амилаолитической активности культуральной жидкости *Medusomyces Gisevii* и *Oryzomyces Indici* с различными сроками культивирования. Выращивание гриба осуществлялось в лабораторных условиях по классической методике. Установлена оптимальная концентрация сахарозы для наращивания биомассы *Medusomyces Gisevii* и *Oryzomyces Indici*, которая составляет 5%. Концентрация сахарозы 15% и выше не рекомендуется для применения из-за подавления роста биомассы с ростом концентрации углеводов в культуральной среде. Установлено, что данные симбионты начинают проявлять амилаолитическую активность уже на 7–8-е сутки культивирования в стандартной питательной среде, среде с добавлением 10% молока и среды на основе сыворотки. С течением времени амилаолитическая активность повышается. Однако интенсивность метаболизма микроорганизмов, критерием которой является соотношение общей и экзогенной амилазы, наиболее выражена на ранних сроках культивации. Установлено, что культуральная жидкость поликультур проявляет высокую амилаолитическую активность. Данный факт позволяет считать инокулят *Medusomyces Gisevii* и *Oryzomyces Indici* перспективным биотехнологическим сырьем как источник фермента амилазы.

Ключевые слова: симбионт *Medusomyces Gisevii*, симбионт *Oryzomyces Indici*, чайный гриб, культуральная среда, культивирование, метаболиты, амилаолитическая активность.

Masalitina N.Yu., Bliznjuk O.M., Belinska A.P., Varankina O.O., Krichkovska L.V.

**RESEARCH OF AMYLOLYTIC ACTIVITY OF CULTURAL
LIQUIDS IN BIOTECHNOLOGY OF SYMBIOTIC CROPS
*MEDUSOMYCES GISEVII AND ORYZAMYCES INDICI***

Based on the literature review found that the natural symbionts *Medusomyces gisevii* and *Oryzomyces indic*i biotechnology are a valuable objects. It is urgent to find ways to impact on it in order to obtain these or other products of its life activity.

At present, it is urgent to search for microorganisms producing enzymes, including amylase. One of the most promising in terms of biological objects is a natural microbial symbiont *Medusomyces Gisevii* (tea fungus) and *Oryzomyces Indici*, which, thanks to the not identical, microbiological composition and different growing conditions may have a different composition of metabolites. Studies of the amylolytic activity of the culture liquid *Medusomyces Gisevii* and *Oryzomyces indic*i with different cultivation periods have been carried out. Cultivation of the fungus was carried out in the laboratory according to the classic method. The optimal concentration of sucrose for *Medusomyces Gisevii* and *Oryzomyces Indici* biomass growth was set at 5%. Sucrose concentration of 15% and above is not recommended for use due to inhibition of biomass growth with increasing concentration of carbohydrates in the culture medium. It is established that these symbionts start to show the amylolytic activity already on the 10th day of cultivation cultivation in standard nutrient medium, medium supplemented with 10 % milk and serum-based medium and stores it in the course of the experiment (30 days). Over time the amylolytic activity increases. However, the intensity of metabolism of the microorganisms, the criterion of which is the ratio of the total and exogenous amylase is most pronounced in the early stages of cultivation. It was found that the culture medium of polycultures shows high amylolytic activity. This fact allows us to consider the *Medusomyces Gisevii* and *Oryzomyces Indici* inoculum as a promising biotechnological raw material source of amylase enzyme.

Keywords: symbiont *Medusomyces Gisevii*, symbiont *Oryzomyces Indici*, tea fungus, the culture fluid, cultivation, metabolites, the amylolytic activity.