

## Использование микробных культур в технологии функциональных напитков

**Рындин Александр Алексеевич**

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»  
Адрес: 125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом 11  
E-mail: [aleksandr-ryndin@rambler.ru](mailto:aleksandr-ryndin@rambler.ru)

**Шаненко Елена Феликсовна**

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»  
Адрес: 125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом 11  
E-mail: [eshanenko@yandex.ru](mailto:eshanenko@yandex.ru)

**Мухамеджанова Татьяна Георгиевна**

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»  
Адрес: 125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом 11  
E-mail: [tatyana.muhamedjanova@yandex.ru](mailto:tatyana.muhamedjanova@yandex.ru)

**Гришин Артём Геннадиевич**

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»  
Адрес: 125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом 11  
E-mail: [grishin3@gmail.com](mailto:grishin3@gmail.com)

**Веселков Кирилл Александрович**

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»  
Адрес: 125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом 11  
E-mail: [kirich996@gmail.com](mailto:kirich996@gmail.com)

**Константинова Анастасия Сергеевна**

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»  
Адрес: 125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом 11  
E-mail: [alko41596@gmail.com](mailto:alko41596@gmail.com)

Чай является традиционным напитком для многих народов мира. В странах Востока помимо традиционных видов чая использовали напитки, полученные микробной ферментацией листьев чайного растения. Примером является китайский чай Хэй Ча и напиток, полученный ферментацией чайного экстракта – Комбуча. Микробные культуры, используемые для ферментации, придавали напиткам дополнительные функциональные свойства. Целью данного исследования было изучение микроскопических грибов, используемых в технологии чая Хэй Ча, и ассоциации бактерий и дрожжей напитка Комбуча с последующим изучением возможности их использования для получения ферментированных напитков. Из образцов чая Хэй Ча были выделены микроскопические грибы, идентифицированные как *E. cristatum*, из напитка Комбуча – бактерии рода *Acetobacter* и дрожжи рода *Saccharomyces*. Изучено влияние состава ферментированного сырья и режимов культивирования на рост и развитие выделенных микроорганизмов. Определены оптимальные параметры ферментации и разработана технологическая схема получения готового ферментированного продукта на основе *Chamaenerion angustifolium* (кипрей узколистный). Показано, что используемые микроорганизмы не синтезируют микотоксины, обладают способностью к синтезу антиоксидантов и витаминов группы В и др. В напитках, полученных ферментацией экстрактов листьев *Camellia sinensis* (камелий китайская), *Chamaenerion angustifolium* (кипрей узколистный)

### Как цитировать

Рындин, А. А., Шаненко, Е. Ф., Мухамеджанова, Т. Г., Гришин, А. Г., Веселков, К. А., & Константинова, А. С. (2019). Использование микробных культур в технологии функциональных напитков. *Health, Food & Biotechnology*, 1(3). <https://doi.org/10.36107/hfb.2019.i3.s268>

было определено содержание и состав биогенных аминов, аминокислот, фенольных соединений и антиоксидантов. Разработана рецептура напитков с использованием выделенных микробных культур, в состав которых в качестве дополнительных ингредиентов входят мёд, солодовое сусло, сок виноградный, мате, кофе. Безопасность продукта была подтверждена результатами микробиологического анализа. Полученные напитки имеют насыщенный цвет, приятный аромат, кисло-сладкий с фруктовыми оттенками вкус.

**Ключевые слова:** микроскопические грибы, ассоциации бактерий и дрожжей, Хэй Ча, Комбуча, функциональные напитки, безопасность.

## Введение

Чай – это растение с уникальными биохимическими свойствами. Экстракты чая (*Camellia sinensis*) в Древнем Китае использовались не только как напиток, но и как лекарственное средство (Шендеров & Доронин, 2004; Афонина, Лебедева, & Сетко, 2017). Молодые листья чая содержат эфирное масло, большое количество фенольных соединений, микро- и макроэлементы, витамины и другие ингредиенты с выраженной биологической активностью (Шендеров & Доронин, 2004; Афонина и соавт., 2017). В настоящее время в чае идентифицировано около 300 соединений, половина которых является водорастворимыми. По своим органолептическим характеристикам экстракт чайных листьев представляет собой горькую жидкость с травянистым вкусом и запахом и в таком виде практически не используется в качестве напитка.

Для получения напитка, который называют «чёрный чай», молодые чайные листья подвяливают и скручивают, в результате чего клетки чайных листьев разрушаются и начинается активные процессы окисления лабильных компонентов, таких как терпенов эфирного масла, фенолов, и др. (Покорн, 1998; Барабой, 2008) активную роль играют пероксидаза и полифенолоксидаза, которые окисляют фенольные соединения, превращая их в продукты, придающие чаю цвет и аромат (Афонина и соавт., 2017; Мелкадзе, 2008) Чем глубже идут окислительные процессы, тем ярче вкус и насыщеннее цвет чая (Cheynier & Veronique, 2005).

Биохимическая активность такого ферментированного чая определяется составом и количеством образовавшихся в ходе ферментации соединений. В неферментированном чае присутствуют (-)-эпикатехин (ЭК) и соединения в состав которых входит (-)-катехин и галловая кислота – (-)-эпикатехин-3-галлат (ЭКГ), (-)-эпигаллокатехин (ЭГК), (-)-эпигаллокатехин-3-галлат (ЭГКГ), (+)-катехин, (+)-галлокатехин. До 65% от общей массы катехинов приходится на ЭГКГ (Афонина и соавт., 2017; Мак, 2012).

При ферментации на первом этапе катехины окисляются до тиофлавинов, а затем, в результате окислительной конденсации с аминокислотами, образуются теарубигины. Более глубокая ферментация чайных листьев приводит к образованию теаброунинов, представляющих собой комплексы продуктов окисления катехинов с белками. Теафлавины придают чаю золотистую окраску, теарубигины – красноватую, а теаброунины – тёмно-коричневую (Kusano, Matsuo, Saito, & Tanaka, 2015).

Биологическая активность чая определяется в основном двумя группами соединений алкалоидами – кофеином, теобромином и теофиллином, и фенольными соединениями – катехинами, эпигаллокатехинами, катехингаллатами и другими (Шендеров & Доронин, 2004).

В последнее время интерес к чаю возрос из-за высокой биологической его компонентов, что позволяет использовать его для профилактики ряда заболеваний (Raquin, 2009; Ahmad et al., 2015).

Флавоноиды чая снижают хрупкость и проницаемость капилляров, нормализуя тканевое дыхание, предотвращают развитие атеросклероза (Маслов, 2007). Катехины являются активными антиоксидантами, освобождающими организм от свободных радикалов. Продукты окислительной конденсации катехинов, образующихся при ферментации, обладают способностью связывать и выводить из организма токсины, оказывают вяжущее и бактериостатическое действие (Кравченко, 2011). Установлено, что катехины активно участвуют в метаболизме белков. Регулируют активность ферментов, в частности теломеразы – фермента, который регулирует процесс клеточного деления.

Эпигаллокатехингаллат повышает активность ферментов, участвующих в остеосинтезе и увеличивает минерализацию костной ткани, что делает его эффективным при ревматоидном артрите (Мак, 2012). Установлено, что катехины чая защищают генетический аппарат клетки от ионизирующего излучения и подавляют рост опухолей и замедля-

ют развитие болезней Альцгеймера и Паркинсона (Афонина и соавт., 2017; Рогожин, 2012). Флавоноиды чая снижают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза, и уменьшают уровень атерогенной фракции липопротеинов.

Уникальный состав чая, характеризующийся высоким содержанием фенолов, сделал его «хозяином» для ряда микроорганизмов, которые живут на чайных листьях, метаболизируя различные соединения и в том числе фенолы. Эти микроорганизмы активно работают в листовом опаде, участвуя в образовании гумуса.

В Древнем Китае эти микроорганизмы были выделены из чая и использованы для получения чайных напитков. Наиболее известными продуктами, полученными путём микробной ферментации чая, является постферментированный чай Пуэр и Хэй Ча и напиток, полученный ферментацией чайного экстракта – Комбуча (Jarrell, Cal & Bennett, 2000). В процессе ферментации микроорганизмы метаболизируют компоненты чая и обогащают его своими метаболитами, обладающими высокой биологической активностью. В результате такой микробной ферментации функциональные свойства напитков значительно повышаются (Zhang, L., Zhang, Zh.-zh., Zhou, Ling, & Wan, 2013).

Физиологическая активность и профилактическое действие чая увеличивается при постферментации микробными культурами. Изучение постферментированного чая Хэй Ча показало, что в нём присутствуют соединения, в том числе индольные алкалоиды кристатулина, продуцируемые грибом *E. cristatum*, который обладает антибактериальной и противовирусной активностью (Du, Li, X., Li, Ch.-Sh., Shang, & Wang, 2012). Установлено, что экстракты чая, ферментированного грибом *E. cristatum* обладают антиканцерогенной и антидиабетической активностью, а также влияют на липидный обмен, снижая липогенез и усиливая на процесс липолиза и окисления жиров, что позволяет его использовать для профилактики ожирения (Peng et al., 2014).

Второй вариант получения из чая напитков с функциональными свойствами – это ферментация чайного экстракта симбиотической культурой микроорганизмов, представляющей собой сообщество уксуснокислых бактерий и дрожжей (Вережкина, Светлакова, Поветкин, Пруцаков, 2010; Добрыня и соавт., 2015; Jayabalan, Malbaša & Sathishkumar, 2016). Это сообщество в литературе называют «чайный гриб» или *medusomyces gisevii*, а напиток, полученный ферментацией чайного

экстракта с добавлением сахара – Комбуча (Сотников & Марченко, 2014; Даниэлян, 2005; Jayabalan, Malbaša, Loncar, & Vitas, 2014). Родиной этой симбиотической культуры и напитка является Китай, где ему присваивают целебные свойства.

Современные исследования показали, что этот напиток содержит фенольные соединения (в том числе флавоноиды) органические кислоты, витамины группы В, аскорбиновую кислоту, аминокислоты, биогенные амины, липиды, белки, макро- и микроэлементы и вещества, обладающие антибактериальной активностью (Сотников & Марченко, 2014, Алиева, Болтачева, Тимченко, Бондарева, & Добрыня, 2018; Villarreal-Soto, Beaufort, Bouajila, Souchard & Taillandier, 2018). Исследование профилактических и лечебных свойств напитка показало, что он действительно оказывает на организм антибактериальное и противовоспалительное действие, выводит токсины, стимулирует активность эндокринной и иммунокомпетентной системы, препятствует развитию атеросклероза, нормализует состав микробиоты кишечника, регулирует аппетит и массу тела, уменьшает артериальное давление и повышает эффективность терапии при артритах, ревматизме, бронхитах и бронхиальной астме, а также оказывает седативное действие при психоэмоциональном напряжении и оптимизирует обмен веществ в целом (Каххорова, 2018; Алиева и соавт., 2018; Кароматов, 2014; Malbaša, Loncar, Vitas, & Čanadanović-Brunet, 2011).

Многочисленные литературные данные позволяют сделать вывод, что микробная ферментация как в случае чай Хэй Ча, так и в случае Комбучи значительно повышает функциональные свойства чая, однако широкое распространение этих продуктов, с одной стороны, ограничивает высокая стоимость чая Хэй Ча, так как он входит в группу «драгоценных чаёв Китая», с другой стороны – ограниченный промышленный выпуск напитка Комбуча, связанный, видимо, с отсутствием промышленной культуры *Medusomyces gisevii* и отработанной простой технологии получения напитка.

## Теоретическое обоснование

На территории России до появления чая, завезенного из Китая, для утоления жажды использовали напиток из Кипрея узколистного или Иван-чая. Листья Кипрея использовали непосредственно после сушки или после окислительной ферментации, улучшающей органолептические свойства напитка. Современные исследования показали, что экстракт кипрея обладает противовоспалительным,

успокаивающим и противосудорожным действием, является источником витаминов и антиоксидантов (Валов, 2012). В состав листьев кипрея входят флавоноиды, в том числе антоцианы, дубильные вещества, пектин, органические кислоты, аскорбиновая кислота, микро- и макроэлементы. По содержанию аскорбиновой кислоты кипрей находится на одном уровне с лимоном и черной смородиной (Царёв, Базарнова, & Дубенский, 2016).

Это позволяет предположить, что листья Кипрея содержат все питательные вещества, необходимые для развития *E. cristatum*, а экстракты Кипрея содержат в достаточном количестве элементы питания для развития симбиотической культуры *Medusomyces gisevii*.

Задачей нашего исследования являлось выделение гриба *E. cristatum* из товарных образцов чая Хэй Ча и скрининг по органолептическим показателям культуры *Medusomyces gisevii* из товарных образцов напитка Комбуча, а также определение параметров ферментации листьев и экстрактов Кипрея, позволяющих получить напиток с высокими потребительскими свойствами. Ферментирование Кипрея исследуемыми микробными культурами позволит обогатить традиционный русский напиток биологически активными веществами и придать ему новые функциональные свойства.

## Исследование

### Материалы и методы

Выделение чистой культуры гриба *E. cristatum* из брикетированного чая Хэй Ча осуществляли посевом смыва с чая на плотную питательную среду – солодовый сусло-агар (8%). Изолированную колонию гриба пересеивали на свежую питательную среду в чашке Петри для выделения колонии в чистую культуру. Выделение чистых культур *Medusomyces gisevii* проводилось из образца товарной продукции Комбуча. Для выделения чистых культур из *Medusomyces gisevii* был использован метод основанный на высеве определённого количества продукта или его разведений на поверхности мясо-пептонного агара для бактерий и солодового сусло-агара для дрожжей, распределении тонким

слоем суспензии микроорганизмов с помощью шпателя Дригальского по поверхности плотной среды, культивировании посевов в аэробных условиях при 30°C в течении 72 часов для бактерий и при 25°C в течении 5 суток для дрожжей и пересеве колоний на скошенную агаризованную среду для изучения морфологических свойств (ГОСТ 10444.12-2013, ГОСТ 10444.15-94).<sup>1,2</sup> Изучение микроморфологических свойств полученных чистых культур микроорганизмов проводили с использованием метода микроскопирования (Жарикова & Козьмина, 2001).

Способность гриба синтезировать микотоксины определяли методом ВЭЖХ. Микотоксины определяли в биомассе. Использовали хроматограф TermoFinnigan с диодоматричным детектором, колонка хроматографическая Hypersil™ BDS C18 200x4,6 мм 5 мкм (Thermo Fisher Scientific, США) (Blackburn, 2006).<sup>3,4,5</sup>

Способность гриба синтезировать биогенные амины определяли в экстрактах листьев Кипрея, ферментированных грибом *E. cristatum*, методом ВЭЖХ. Биогенные амины определяли на изократическом хроматографе с использованием насоса PM-80, электрохимический детектор LC-4B (Bioanalytical sys., США), колонка хроматографическая YMC-Triart C18 150x3,0 мм 5 мкм (YMC со., Япония) (Олескин & Роговский, 2017).

Листья Кипрея засеивали суспензией спор, полученных смывом со скошенного сусло-агара, содержащего чистую культуру *E. cristatum*. Культивирование велось при температуре 28°C в течение 14 суток.

Водные экстракты из листьев Кипрея получали при гидромодуле 1:20, температуре экстрагирования 80°C, продолжительности экстракции 15 минут, при постоянном перемешивании.

Содержание сухих веществ определяли пикнометрическим методом (Мальцев, 1976).

Окислительно-восстановительный потенциал определяли методом Грея и Стоуна путем замера времени обесцвечивания реактива 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (Мальцев, 1976).

<sup>1</sup> ГОСТ 10444.12-2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов (с Поправкой)

<sup>2</sup> ГОСТ 10444.15-94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

<sup>3</sup> ГОСТ 28038-2013 Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения микотоксина патулина (с Поправкой).

<sup>4</sup> ГОСТ 30711-2001 Продукты пищевые. Методы выявления и определения содержания афлатоксинов В(1) и М(1).

<sup>5</sup> МУ по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах.

Фенольные соединения определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA) с диодноматричным детектором (DAD), колонка хроматографическая Hypersil ODS C18 250×4,6 мм 5 мкм (Thermo Fisher Scientific, USA).

Титруемую кислотность определяли в водных экстрактах листа Кипрея до и после ферментирования культурой *Medusomyces gisevii*.<sup>6</sup>

Органолептическая оценка полученных экстрактов осуществлялась согласно методике, описанной в ГОСТ.<sup>7</sup>

Для определения органолептических показателей продукции, ферментированной культурой *Medusomyces gisevii*, использовали балльный метод (скоринг).<sup>8</sup>

## Результаты

Для изучения возможности использования микробных культур *E. cristatum* и *Medusomyces gisevii* для получения ферментированных продуктов на основе листьев Кипрея нами было проведено выделение чистой культуры гриба из образца чая Хэй Ча и микроорганизмов симбиотической культуры *Medusomyces gisevii*.

Для выделения микроорганизмов из чая Хэй Ча использовали товарный образец компании Мойчай.ру, для выделения симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* – образцы продукции напитка Комбуча из торговой сети. Использовали пять об-

разцов напитка Комбуча разных производителей. Был проведён скрининг и отобран образец с наилучшими органолептическими показателями.

Выделение гриба из чая Хэй Ча проводилось посевом на сусло-агар, а из образца напитка Комбуча – посевом на мясопептонный агар и сусло-агар.

Выделенная семидневная чистая культура гриба на сусло-агаре имела желтые колонии, рост медленный, в диаметре 3-4 см. По мере старения культуры цвет меняется до оливково-коричневого или коричневого.

В питательную среду выделяется пигмент коричневого цвета. Поверхностный мицелий невысокий около 2 мм над питательной средой. При микрокопировании видны многочисленные клейстотеции, шаровидной формы, конидии отсутствуют. Полученные данные позволяют предварительно отнести гриб к *Eurotium cristatum*.

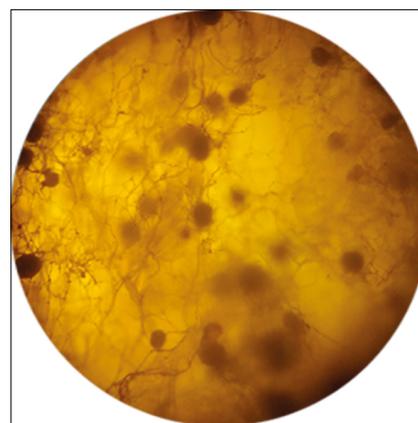
Из напитка Комбуча были выделены отдельные изолированные колонии бактерий и дрожжей. Изученные морфологические свойства колоний бактерий показали, что они в основном однотипные. При изучении морфологических признаков, характеризующих отдельные клетки и их популяции, было выявлено, что преобладающими микроорганизмами в ферментирующей культуре являются бактерии рода *Acetobacter*. На солодовом сусло-агаре преобладали дрожжи, предположительно относящиеся к роду *Saccharomyces*, что подтверждается литературными данными.



(1)



(2)



(3)

Рисунок 1. *E. cristatum*. 1,2 – колонии гриба на сусло-агаре; 3 – микрофотография клейстотеций x100

<sup>6</sup> ГОСТ 6687.4-86 Напитки безалкогольные, квасы и сиропы. Метод определения кислотности (с Поправкой)

<sup>7</sup> ГОСТ 32572-2013 Чай. Органолептический анализ.

<sup>8</sup> ГОСТ ISO 6658-2016 Органолептический анализ. Методология. Общее руководство.

Для оценки возможности использования выделенных культур для ферментации листьев и экстрактов Кипрея был проведён ряд экспериментов, в которых выделенную культуру гриба *E. cristatum* выращивали на биомассе листьев Кипрея, а симбиотическую культуру, выделенную из напитка «Комбуча», использовали в качестве инокулята для засева экстрактов листьев Кипрея с добавлением сахарозы.

Для микробной ферментации *E. cristatum* использовали листья Кипрея, уже прошедшего ферментацию собственными окислительными ферментами. Засев биомассы ферментированных листьев Кипрея проводили суспензией спор *E. cristatum*. Поскольку гриб *E. cristatum* считается ксерофитом, то во время проведения ферментации влажность была 20%, длительность ферментации составляла 14 суток, температура 28°C. Рост культуры контролировался визуально, подсчетом типичных золотистых колоний на листьях.

Для изучения возможности культивирования *Medusomyces gisevii* проводили экстракцию измельчённых ферментированных листьев Кипрея водой температурой 90°C при гидромодуле 1:250 в течение 10 минут. Полученный экстракт отделяли от листьев фильтрованием, вносили сахарозу и использовали в качестве питательной среды для выращивания культуры *Medusomyces gisevii*. Ферментацию проводили 14 суток. Для изучения влияния состава питательной среды и параметров ферментации был проведён ряд экспериментов, в которых содержание экстрактивных веществ листьев Кипрея в питательной среде варьировалось от 1 до 5% и концентрация сахарозы – от 2 до 18%. Для определения влияния на рост культуры температуры проводили ряд экспериментов с диапазоном температур ферментации

от 7 до 35°C.

Поскольку основным продуктом ферментации при культивировании *Medusomyces gisevii* являются органические кислоты, то контроль развития культуры осуществлялся по величине титруемой кислотности. Данные, полученные в этой серии экспериментов представлены на рисунках 2,3,4.

Динамику кислотообразования определяли при параметрах культивирования, выбранных в предыдущих экспериментах – концентрация сахара – 6%, концентрация экстрагируемых веществ листьев Кипрея 2%, температура культивирования 20°C.

Полученные продукты – листья Кипрея, ферментированные *E. cristatum* выращенные при температуре 28°C и ферментированные культурой *Medusomyces gisevii* экстракты листьев Кипрея были использованы для получения напитков, в которых были определены физико-химические и органолептические показатели.

В напитках были определены содержание сухих веществ, титруемая кислотность, окислительно-восстановительный потенциал, содержание фенольных соединений методом ВЭЖХ.

Учитывая, что многие микроорганизмы, как показывают последние исследования, синтезируют биогенные амины, была изучена способность гриба *E. cristatum* к ассимиляции и продуцированию этих соединений. Для этого гриб культивировали на листьях Кипрея, получали экстракт и определяли образовавшиеся биогенные амины методом ВЭЖХ.

Поскольку при использовании мицелиальных

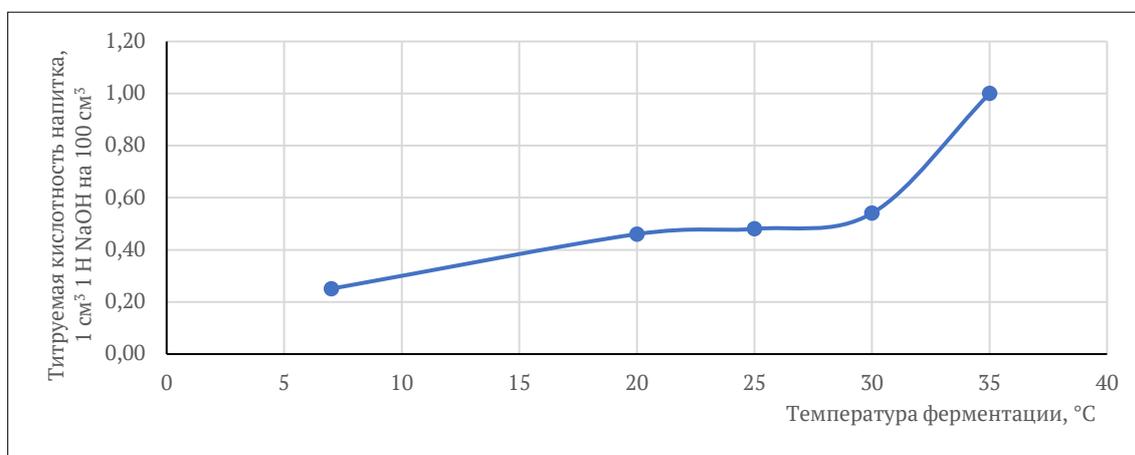


Рисунок 2. Влияние температуры ферментации на титруемую кислотность напитка

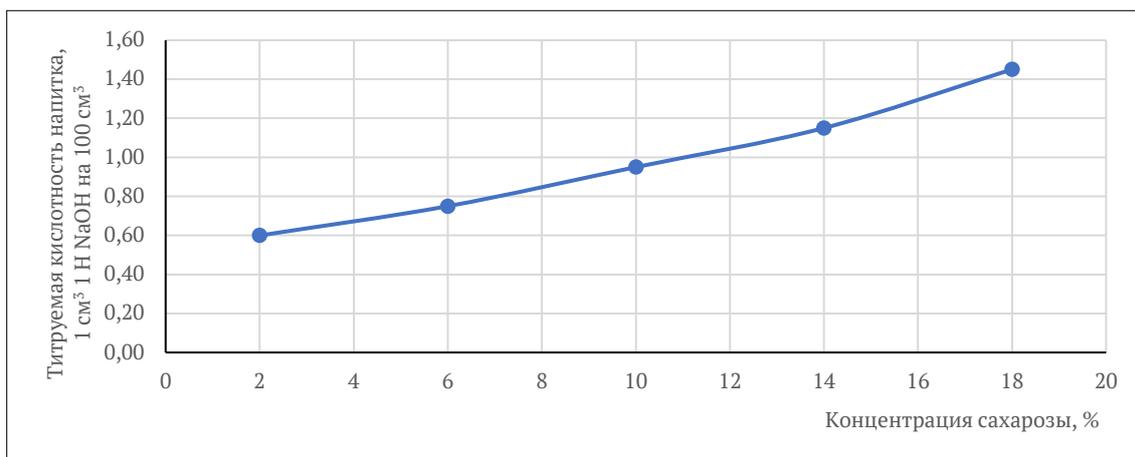


Рисунок 3. Влияние концентрации сахарозы в питательной среде на титруемую кислотность напитка

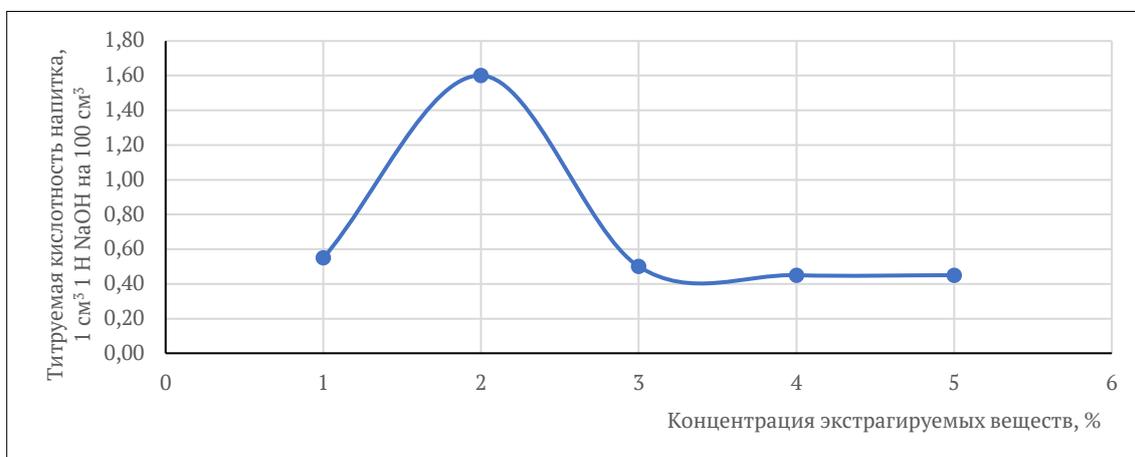


Рисунок 4. Влияние концентрации экстрагируемых веществ листьев Кипрея на титруемую кислотность напитка

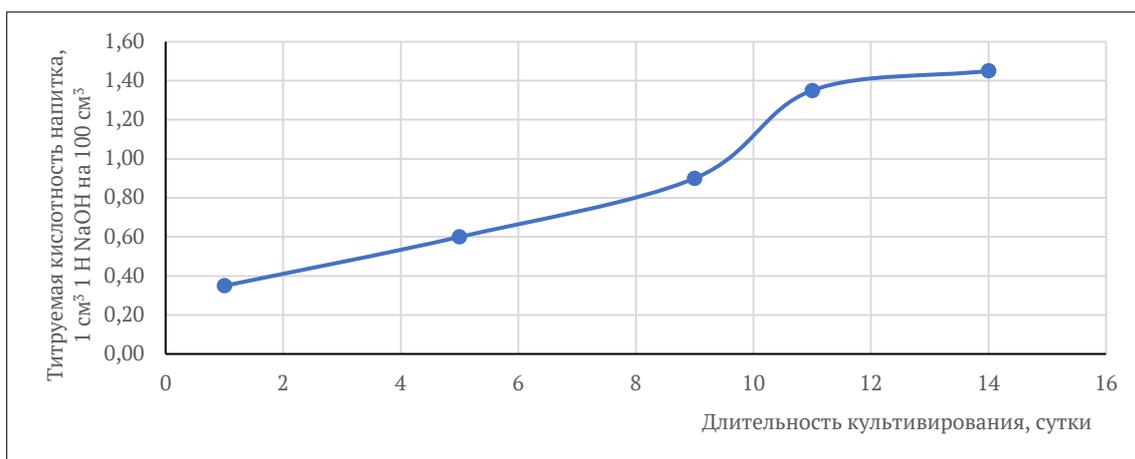


Рисунок 5. Влияние длительности ферментации на титруемую кислотность напитка

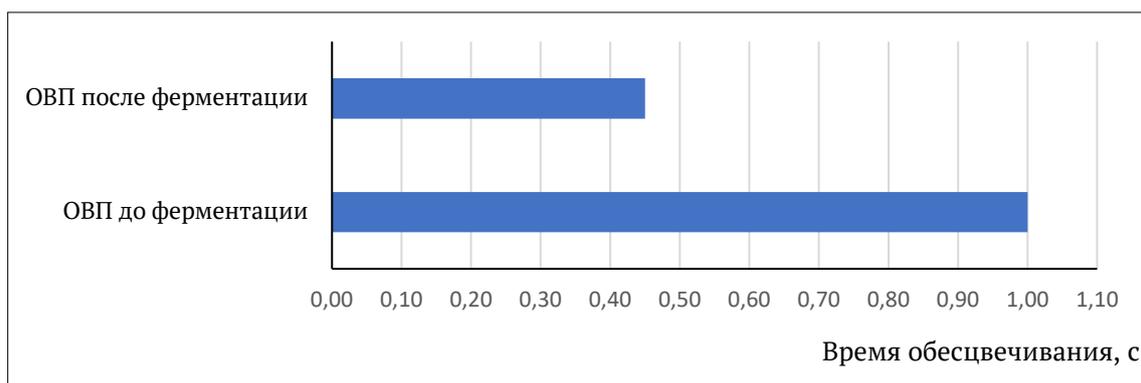


Рисунок 6. Влияние ферментации *E. cristatum* на окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) листьев Кипрея

Таблица 1

Влияние ферментирования листьев Кипрея на состав фенольных соединений

Фенольное соединение (мкг/мл)	Листья Кипрея	
	До ферментации	После ферментации
Галловая кислота	258,0	261,8
Сиреневая кислота	3,77	2,51
Ванилиновая кислота	3,076	2,02
Ванилин	3,7	3,71
Сиреневый альдегид	1,77	3,13
Синаповая кислота	4,17	8,81
Конифероловый альдегид	1,91	0,00
Синаповый альдегид	2,65	0,00
Итого:	279,05	281,98

Таблица 2

Содержание биогенных аминов в среде культивирования *E. cristatum*

Биогенные амины, пикомоль/мл	Образцы	
	Кипрей	Кипрей, ферментированный <i>E. cristatum</i>
Дегидроксифенилаланин (предшественник дофамина) (DOPA)	1251.45	0.00
Дофамин (DA)	9567.56	8.25
Норадреналин (NA)	0.00	11.54
Адреналин (A)	0.00	0.00
Дигидроксифенилуксусная кислота (DOPAC)	962.02	103.34
3-метокси-тирамин (3MT)	0.00	108.42
Гомованилиновая кислота (HVA)	857.01	70.25
Серотонин (5HT)	523.13	1458.94
Дигидроксииндолил-уксусная кислота (5HIAA)	2781.04	36.56

грибов необходимо подтвердить безопасность продукта, то была изучена способность *E. cristatum* продуцировать микотоксины. Для этого гриб культивировали на плотной питательной среде и в биомассе гриба определяли содержание микотоксинов методом ВЭЖХ. Данные по содержанию микоток-

синов представлены в таблице 3.

Органолептическая оценка напитков, полученных из листьев Кипрея, ферментированных *E. cristatum* и напитка Комбуча на основе листьев Кипрея приведены в таблице 4.

## Обсуждение

Полученные экспериментальные данные подтвердили возможность использования микробных культур, выделенных из китайского чая Хэй Ча и напитка Комбуча для получения функциональных ферментированных напитков из Кипрея узколистного.

Проведённые исследования позволили выделить из чая Хэй Ча в виде чистой культуры гриб, который был идентифицирован как *Eurotium cristatum*, и из напитка Комбуча консорциум микроорганизмов, в котором доминирующими оказались дрожжи рода *Saccharomyces* и бактерии рода *Acetobacter*, что согласуется с литературными данными (Даниэлян, 2005).

Изучение свойств выделенного гриба показало его нетоксигенность, что подтверждено отсутствием микотоксинов в анализируемых образцах биомассы.

Интересной также представляется впервые обнаруженная способность гриба *E. cristatum* поглощать из среды нейротрансмиттер дофамин и обогащать её серотонином. Это позволяет рекомендовать напитки, полученные с использованием *E. cristatum* как успокаивающие и гармонизирующие, снимающие нервное напряжение.

Изучение влияния параметров ферментации на

динамику роста исследуемых культур позволило выбрать режимы, обеспечивающие получение готовых продуктов – постферментированного Кипрея и ферментированного экстракта Кипрея с хорошими органолептическими свойствами.

При ферментации листьев Кипрея грибом *E. cristatum* наилучший результат был получен при температуре 28 °С, влажности среды 20% и длительности 14 суток. При ферментации экстракта листьев Кипрея смешанной культурой *Medusomyces gisevii* – при температуре 20 °С, концентрации сахарозы 6%, концентрации сухих веществ в экстракте листьев Кипрея 2% и длительности 14 суток.

При выборе параметров ферментации *Medusomyces gisevii* в качестве основного критерия использовали органолептические показатели, что позволило получить напиток с хорошими потребительскими свойствами.

Изучение состава полученного ферментированного Кипрея показало, что при ферментации *E. cristatum* в нем протекают окислительно-восстановительные процессы, приводящие к изменению состава фенольных соединений и повышению антиоксидантной активности. Аналогичные процессы, протекающие при ферментации листьев *S. Sinensis* грибом *E. cristatum* описаны в литературных источниках (Zhang et al., 2013).

Таблица 3

Способность гриба *Eurotium cristatum* продуцировать микотоксины

Микотоксины	Содержание в исследуемом образце, мкг/г
Афлатоксин В <sub>1</sub>	Не обнаружено
Патулин	Не обнаружено
Дезоксиниваленол	Не обнаружено
Зеараленон	Не обнаружено

Таблица 4

Органолептическая оценка напитков

Вид ферментации	Внешний вид	Запах	Вкус
Окислительная ферментация (исходное сырьё)	Прозрачный раствор, Светло-янтарного цвета	Интенсивный травяной аромат, с цветочными нотками	Слабовыраженный водянистый, терпкий с кислинкой
Микробная ферментация <i>E. cristatum</i>	Светло-янтарного цвета	Гармоничный цветочный с травяными нотками	Слабовыраженный гармоничный, сладковатый с небольшой терпкостью
Микробная ферментация <i>Medusomyces gisevii</i> (концентрация сахарозы 6%; концентрация растворённых веществ Кипрея 2%)	Слабо опалесцирующий светло-жёлтый	слабый кислый аромат с травяным оттенком	слабый сладкий вкус с приятным кислым привкусом и слабым травяным оттенком, слабо газированный

Полученные результаты позволяют предположить, что выделенные микроорганизмы могут быть использованы для обогащения функциональными микробными метаболитами не только Кипрея, но и листьев других растений. Это позволит расширить сырьевую базу и спектр функциональной направленности напитков лечебно-профилактического и специального назначения.

### Выводы

Полученные результаты позволяют выдвинуть предположение, что выделенные микробные культуры могут использовать в качестве субстрата не только листья Чайного куста (*Camellia sinensis*) и Кипрея узколистного (*Chamaenerion angustifolium*), но и другие растения, в том числе растения средней полосы России. Расширение сырьевой базы позволит создать линейку напитков с новыми функциональными свойствами.

### Литература

- Алиева, Е. В., Болтачева, К. М., Тимченко, Л. Д., Бондарева, Н. И., & Добрыня, Ю. М. (2018). Антибактериальный потенциал и перспективы использования чайного гриба. *Ульяновский микробиологический журнал*, 4, 166-171.
- Афоница, С. Н., Лебедева, Е. Н., & Сетко, Н. П. (2017). Биохимия компонентов чая и особенности его биологического действия на организм. *Оренбургский медицинский вестник*, 4(20), 17-32.
- Барабой, В. А. (2008). Катехины чайного растения: структура, активность, применение. *Биотехнология*, 3, 25-36.
- Веревкина, М. Н., Светлакова, Е. В., Поветкин, С. Н., & Пруцаков, С. В. (2010). Природные микробные ассоциации. *Ветеринария Кубани*, 4, 10.
- Валов, Р. И. (2012). *Фармакогностическое исследование надземной части Chamaenerion angustifolium (L.) Scop.* [Кандидатская диссертация]. Улан-Удэ. Россия.
- Даниэлян, Л.Т. (2005). *Чайный гриб и его биологические особенности*. Медицина.
- Добрыня, Ю. М., Аванесян, С. С., Бондарева, Н. И., Тимченко, Л. Д., Ржепаковский, И. В., & Симечёва, Е. И. (2015). Динамика амилолитической активности культуральной жидкости *Medusomyces gisevii* (чайного гриба) в процессе культивирования. *Современные проблемы науки и образования*, 3, 568.
- Жарикова, Г. Г., & Козьмина, А. О. (2001). *Микробиология, санитария и гигиена пищевых продуктов*. Гелан.
- Кароматов, И. Д. (2014). Чайный гриб и его использование в лечебной практике. *European science review*, 3, 47-49.
- Каххорова, С. И. (2018). Лечебные свойства чайного гриба. *Биология и интегративная медицина*, 1, 381-394.
- Кравченко, Л. В. (2011). Влияние экстракта зеленого чая и его компонентов на антиоксидантный статус и активность ферментов метаболизма ксенобиотиков у крыс. *Вопросы питания*, 2, 9-15.
- Мальцев, П. М. (1976). *Химико-технологический контроль производства солода и пива*. Пищевая промышленность.
- Маслов, Л. Н. (2007). О перспективах применения флавоноидов для профилактики атеросклероза и атеротромбоза. *Клиническая фармакология и терапия*, 3, 60-67.
- Мелкадзе, Р. Г. (2008). Взаимосвязь биохимических показателей ферментации с качеством чая. *Пиво и напитки*, 4, 56-57.
- Олескин, А. В., & Роговский, В. С. (2017). Роль биогенных аминов во взаимодействии микробиоты, нервной и иммунной систем организма-хозяина. *Вестник восстановительной медицины*, 1(77), 41-51.
- Покорн, Д. (1998). *Полная энциклопедия лечебного питания*. Олма-пресс.
- Племенков, В. В. (2007). *Химия изопреноидов*. Издательство алтайского университета.
- Рогожин, В. В. (2012). *Биохимия растений*. Гиорд.
- Сотников, В. А., & Марченко, В. В. (2014). Напиток «Чайный гриб» и его технологические особенности. *Пищевая промышленность*, 12, 49-52.
- Царёв, В. Н., Базарнова, Н. Г., & Дубенский, М. М. (2016). Кипрей узколистный (*Chamaenerion angustifolium* L.) химический состав, биологическая активность. *Химия растительного сырья*, 4, 15-26.
- Шендеров, Б. А., & Доронин, А. Ф. (2004). Чай и кофе- основа для создания функциональных напитков и продуктов питания. *Пиво и напитки*, 2, 94-97.
- Ahmad, R., Butt, M., Sultan, M., Mushtaq, Z., Ahmad, S., Dewanjee, S., De Feo, V., & Zia-Ul-Haq, M. (2015). Preventive role of green tea catechins from obesity and related disorders especially hypercholesterolemia and hyperglycemia. *Journal of Translational Medicine*, 13, 79. <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-015-0436-x>
- Blackburn, C.D.W. (2006). *Food spoilage microorganisms*. CRC Press.
- Cheynier, V. (2005). Polyphenols in food are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223S-229S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223S>
- Du, F.-Y., Li, X.-M., Li, Ch.-Sh., Shang, Zh., & Wang, B.-

- G. (2012). ChemInform Abstract: Cristatumins A-D, New Indole Alkaloids from the Marine-Derived Endophytic Fungus *Eurotium cristatum* EN-220. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 4650-4653. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.088>
- Jarrell, J., Cal, T., & Bennett, J. W. (2000). The Kombucha consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist*, 14, 166-170. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(00\)80034-8](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(00)80034-8)
- Jayabalan, R., Malbasa, R.V., Loncar, E. S., & Vitas, J. S. (2014). A review on kombucha tea – microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 538–550.
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., & Sathishkumar, M. (2016). Kombucha. *Reference Module in Food Science*, 11, 422. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03032-8>
- Kusano, R., Matsuo, Y., Saito, Y., & Tanaka, T. (2015). Oxidation mechanism of black tea pigment theaflavin by peroxidase. *Tetrahedron Letters*, 56, 5057-5144. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.07.037>
- Mak, J. C. (2012). Potential role of green tea catechins in various disease therapies: Progress and promise. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39, 265–273.
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127, 1727-1731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>
- Paquin, P. (2009). *Functional and speciality beverage technology*. Woodhead Publishing.
- Peng, Y., Xiong, Z., Li, J., Huang, J.-A., Teng, C., Yushun, G., & Liu, Zh. (2014). Water extract of the fungi from Fuzhuan brick tea improves the beneficial function on inhibiting fat deposition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65, 610 – 614. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.898253>
- Villarreal-Soto, S.A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.-P., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Zhang, L., Zhang, Zh.-zh., Zhou, Y., Ling, T., & Wan, X.-Ch. (2013). Chinese dark teas: Postfermentation, chemistry and biological activities. *Food Research International*, 53, 600-607. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.016>

## Use of Microbial Cultures in Functional Beverages Technology

**Aleksandr A. Ryndin**

*Moscow State University of Food Production  
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation  
E-mail: aleksandr-ryndin@rambler.ru*

**Elena F. Shanenko**

*Moscow State University of Food Production  
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation  
E-mail: eshanenko@yandex.ru*

**Tatyana G. Muhamedjanova**

*Moscow State University of Food Production  
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation  
E-mail: tatyana.muhamedjanova@yandex.ru*

**Artem G. Grishin**

*Moscow State University of Food Production  
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation  
E-mail: grishin3@gmail.com*

**Kirill A. Veselkov**

*Moscow State University of Food Production  
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation  
E-mail: kirich996@gmail.com*

**Anastasiya S. Konstantinova**

*Moscow State University of Food Production  
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation  
E-mail: alko41596@gmail.com*

Tea is a traditional drink for many nations of the world. In countries of the East, in addition to traditional types of tea, drinks obtained by microbial fermentation of the leaves of a tea plant were used. An example is Chinese tea Hei Cha and a drink obtained by fermenting tea extract - Kombucha. Microbial cultures used for fermentation gave drinks additional functional properties. The purpose of this study was to study the microscopic fungi used in the Hei Cha tea technology and the association of bacteria and yeast from the Kombucha drink, followed by a study of the possibility of their use for producing fermented drinks. Microscopic fungi identified as *E. cristatum* were isolated from Hei Cha tea samples; *Acetobacter* bacteria and *Saccharomyces* yeast were extracted from Kombucha. The effect of the composition of fermented raw materials and cultivation modes on the growth and development of isolated microorganisms was studied. The optimal fermentation parameters were determined and a technological scheme was developed for producing a finished fermented product based on *Chamaenerion angustifolium* (narrow-leaved fireweed). It was shown that the microorganisms used do not synthesize mycotoxins, are capable of synthesizing antioxidants and B vitamins and others. In drinks obtained by fermentation of leaf extracts of *Camellia sinensis* (Chinese camellia), *Chamaenerion angustifolium* (narrow-leaved fireweed), the content and composition of biogenic amines, amino acids phenolic compounds and antioxidants. A beverage formulation was developed using isolated microbial cultures, which include honey, malt wort, grape juice, mate, and coffee as additional ingredients. Product safety has been confirmed by microbiological analysis. The resulting drinks have a rich color, a pleasant aroma, a sweet and sour taste with fruit tones.

**Key words:** fungus, associations of bacteria and yeast, Hei Cha, Kombucha, functional beverages, safety

### How to Cite

Ryndin, A. A., Shanenko, E. F., Muhamedjanova, T. G., Grishin, A. G., Veselkov, K. A., & Konstantinova, A. S. (2019). Use of Microbial Cultures in Functional Beverages Technology. *Health, Food & Biotechnology*, 1(3). <https://doi.org/10.36107/hfb.2019.i5.s268>

## References

- Aliev, E. V., Boltacheva, K. M., Timchenko, L. D., Bondareva, N. I., Dobrynya, Yu. M. (2018). Antibacterial potential and prospects for the use of Kombucha. *Ul'yanovskij mediko-biologicheskij zhurnal* [Ulyanovsk Medical Biological Journal], 4, 166-171.
- Afonina, S. N., Lebedeva, E. N., & Setko, N. P. (2017). Biochemistry of tea components and the features of its biological effect on the body. *Orenburgskij medicinskij vestnik* [Orenburg Medical Journal], 4(20), 17-32.
- Baraboy, V. A. (2008). Tea plant catechins: structure, activity, application. *Biotekhnologiya* [Biotechnology], 3, 25-36.
- Verevkina, M. N., Svetlakova, E. V., Povetkin, S. N., & Prutsakov, S. V. (2010). Natural microbial associations. *Veterinariya Kubani* [Veterinarian Kuban], 4, 10.
- Valov, R.I. (2012). Farmakognosticheskoe issledovanie. Nadzemnoj chasti *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop [Pharmacognostic study. The aerial part of *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop] [Candidate dissertation]. Ulan-Ude. Russia.
- Danielyan, L. T. (2005). *Chajnyj grib i ego biologicheskie osobennosti* [Kombucha and its biological features]. Medicina.
- Dobrynya, Yu. M., Avanesyan, S. S., Bondarev, N. I., Timchenko, L. D., Rzhepakovsky, I. V., & Simecheva, E. I. (2015). Dynamics of the amyolytic activity of the culture fluid of *Medusomyces gisevii* (Kombucha) during cultivation. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education], 3, 568.
- Zharikova, G. G., & Kozmina, A. O. (2001). *Mikrobiologiya, sanitariya i gigiena pishchevyh produktov* [Microbiology, sanitation and food hygiene]. Gelan.
- Karomatov, I. D. (2014). Kombucha and its use in medical practice. *European science review*, 3, 47-49.
- Kakhkhorova, S. I. (2018). The healing properties of Kombucha. *Biologiya i integrativnaya medicina* [Biology and Integrative Medicine], 1, 381-394.
- Kravchenko, L. V. (2011). The effect of green tea extract and its components on the antioxidant status and activity of xenobiotic metabolism enzymes in rats. *Voprosy pitaniya* [Nutrition Issues], 2, 9-15.
- Maltsev, P.M. (1976). *Himiko-tekhnologicheskij kontrol' proizvodstva soloda i piva* [Chemical and technological control of malt and beer production]. Pishchevaya promyshlennost'.
- Maslov, L. N. (2007). On the prospects for the use of flavonoids for the prevention of atherosclerosis and atherothrombosis. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya* [Clinical Pharmacology and Therapy], 3, 60-67.
- Melkadze, R. G. (2008). The relationship of biochemical parameters of fermentation with the quality of tea. *Pivo i napitki* [Beer and drinks], 4, 56-57.
- Oleskin, A. V., & Rogovsky, V. S. (2017). The role of biogenic amines in the interaction of microbiota, nervous and immune systems of the host body. *Vestnik vosstanovitel'noj mediciny* [Bulletin of Restorative Medicine], 1(77), 41-51.
- Pokorn, D. (1998). *Polnaya enciklopediya lechebnogo pitaniya* [The complete encyclopedia of clinical nutrition]. OLMA PRESS.
- Plemenkov, V. V. (2007). *Himiya izoprenoidov* [Chemistry of isoprenoids]. Altai University Press.
- Rogozhin, V. V. (2012). *Biohimiya rastenij* [Biochemistry of plants]. Giord.
- Sotnikov, V. A., & Marchenko, V. V. (2014). Kombucha drink and its technological features. *Pishchevaya promyshlennost'* [Food Industry], 12, 49-52.
- Tsarev, V. N., Bazarnova, N. G., & Dubensky, M. M. (2016). Narrow leaf fireweed (*Chamerion angustifolium* L.) chemical composition, biological activity. *Himiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of Plant Raw Materials], 4, 15-26.
- Shenderov, B. A., & Doronin, A. F. (2004). Tea and coffee are the basis for creating functional drinks and food. *Pivo i napitki* [Beer and drinks], 2, 94-97.
- Ahmad, R., Butt, M., Sultan, M., Mushtaq, Z., Ahmad, S., Dewanjee, S., De Feo., V., & Zia-Ul-Haq, M. (2015). Preventive role of green tea catechins from obesity and related disorders especially hypercholesterolemia and hyperglycemia. *Journal of Translational Medicine*, 13, 79. <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-015-0436-x>
- Blackburn, C.D.W. (2006). *Food spoilage microorganisms*. CRC Press.
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in food are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223S-229S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223S>
- Du, F.-Y., Li, X.-M., Li, Ch.-Sh., Shang, Zh., & Wang, B.-G. (2012). ChemInform Abstract: Cristatumins A-D, New Indole Alkaloids from the Marine-Derived Endophytic Fungus *Eurotium cristatum* EN-220. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 4650-4653. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.088>
- Jarrell, J., Cal, T., & Bennett, J. W. (2000). The Kombucha consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist*, 14, 166-170. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(00\)80034-8](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(00)80034-8)
- Jayabalan, R., Malbasa, R.V., Loncar, E. S., & Vitas, J. S. (2014). A review on kombucha tea – microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 538-550

- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., & Sathishkumar, M. (2016). Kombucha. *Reference Module in Food Science*, 11, 422. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03032-8>
- Kusano, R., Matsuo, Y., Saito, Y., & Tanaka, T. (2015). Oxidation mechanism of black tea pigment theaflavin by peroxidase. *Tetrahedron Letters*, 56, 5057-5144. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.07.037>
- Mak, J. C. (2012). Potential role of green tea catechins in various disease therapies: Progress and promise. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39, 265–273
- Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127, 1727-1731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>
- Paquin, P. (2009). *Functional and speciality beverage technology*. Woodhead Publishing.
- Peng, Y., Xiong, Z., Li, J., Huang, J.-A., Teng, C., Yushun, G., & Liu, Zh. (2014). Water extract of the fungi from Fuzhuan brick tea improves the beneficial function on inhibiting fat deposition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65, 610 – 614. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.898253>
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.-P., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Zhang, L., Zhang, Zh.-zh., Zhou, Y., Ling, T., & Wan, X.-Ch. (2013). Chinese dark teas: Postfermentation, chemistry and biological activities. *Food Research International*, 53, 600-607. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.016>