|  |  |
| --- | --- |
| Департамент образования и науки города Москвы  Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение  города Москвы «Школа №1770»  115407, г. Москва, Нагатинская набережная, дом 56 | |
| тел: 8-499-615-89-88  e-mail: 1770@edu.mos.ru  ОГРН 1097746831731 | sch1770.mskobr.ru  ИНН/КПП  7725684400 /772501001 |

Исследовательская работа:

**Динамика накопления биологически активных веществ в культуральной жидкости Medusomyces gisevi**

Выполнили:

ученицы 10 «Б» класса

Артюхина Анастасия Артемовна,

Белозерова Екатерина Александровна

Научный руководитель:

учитель биологии

Коршунов Александр Анатольевич

**ОГЛАВЛЕНИЕ:**

Введение -----------------------------------------------------------------------------------------2

1. Литературный обзор -----------------------------------------------------------------------3

1.1. История распространения---------------------------------------------------------3

1.2. Состав и метаболическая активность симбионта ---------------------------4

1.3. Ферментация-------------------------------------------------------------------------5

1.4. Биоактивные соединения----------------------------------------------------------6

1.4.1. Фенольные соединения----------------------------------------------------6

1.4.2. Органические кислоты----------------------------------------------------7

1.4.3. Витамины--------------------------------------------------------------------7

1.4.4. Бактериоцины---------------------------------------------------------------7

2. Методика практической части работы--------------------------------------------------8

3. Результаты и обсуждение ---------------------------------------------------------------- 9

4. Выводы --------------------------------------------------------------------------------------13

5. Список используемой литературы и web-ресурсов --------------------------------14

6. Приложение --------------------------------------------------------------------------------15

**Введение**

В последнее время значительный интерес проявляется к внедрению в ежедневный рацион функциональных продуктов питания, т.е. содержащих в своем составе биологически активные вещества (БАВ). Одним из таких продуктов питания является напиток, производимый чайным грибом (Medusomyces gysevii). Чайный гриб характеризуется сильными оздоровительными свойствами, среди которых отмечены антиоксидантные, дезинтоксикационные, противовоспалительные, иммуностимулирующие и др. [9,10].

Учитывая тот факт, что симбионт «чайный гриб» обладает высоким адаптационным потенциалом при подборе питательных сред, мы считаем **актуальным** выявить как разные субстраты повлияют на выработку и накопление БАВ симбионтом в процессе культивирования.

**Цель данного исследования** – изучение влияние вида субстрата (чая) на содержание биологически активных веществ и физико-химические показатели культуральной жидкости чайного гриба.

**Задачи:**

1. Провести обзор научной и методической литературы по теме исследования;

2. Экспериментально определить наличие витаминов В6, С и белков в культуральной жидкости и их накопление в процессе культивирования (по степени насыщенности цвета раствора)[6];

3. Измерить динамику показателей раствора в процессе культивирования - изменение рН, плотности и общей антиоксидантной активности;

4. Определить зависимость содержания БАВ и показателей культуральной жидкости от выбора субстрата.

**Гипотеза исследования:** выход биологически активных веществ и показатели раствора будут отличать в зависимости от субстрата.

**Объект исследования:** культуральная жидкость чайного гриба.

**Предмет исследования:** содержание БАВ и показателей жизнедеятельности культуральной жидкости КЖ Medusomyces gysevii.

**Методы исследования**: анализ научной теоретической литературы, проведение эксперимента, методы статистической обработки результатов исследования в Microsoft Excel, анализ полученных результатов.

**Оборудование и реактивы**: стеклянные банки, марля, пробирки на штативе, колбы, химические стаканы, автоматическая пипетка, весы, стеклянные палочки, бюретка для титрования, водяная баня, фотоаппарат, белый бокс, штатив, приложение Color Grab, рН-метр, рефрактометр; 3% р-р FeCl3, 10% р-р KOH, медный купорос CuSO4, 0,05н р-р KMnO₄, дистиллированная вода, пищевая сода (NaHCO₃), 1% р-р метиленовый синий.

**Сроки проведения работы**: чайный гриб выращивали в январе-феврале 2024 гола, лаб. часть проходила на базе кабинета биологии Школы №1770.

**Практическая значимость** исследования заключается в поиске более подходящих условий культивирования чайного гриба для получения наибольшего выхода БАВ.

**Теоретическая значимость**: работа может быть использована для наглядных опытов в разделе «Микробиология» на уроках биологии.

**1. Литературный обзор**

**1.1. История распространения**

Первые документированные упоминания об этом напитке относятся к 220 году до н.э. в странах Востока, а в 414 году н.э. врач Комбу привез чайный гриб из Кореи в Японию по повелению императора для лечения его проблем с пищеварением [9]. В последующие века купцы популяризировали чайный гриб в России (возможно повторно напиток популяризировался во время Русско-Японской войны 1904-1905), откуда на рубеже XIX и XX веков «Чайный квас» распространился в Европу. В зависимости от региона мира, напиток получал новые названия: «Чайный гриб», «Маньчжурский чай», «Чайный квас» и другие. Напиток считается весьма полезным для здоровья потребителей [4].

Благотворное воздействие напитка обусловлено антиоксидантной активностью; он может способствовать уменьшению сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. В целом чайный гриб оказывает положительное влияние на пищеварение и микробиоту кишечника, помогает при артритах, обладает противомикробной активностью, оказывает гепатопротекторное действие. Такие свойства достигаются содержанием в напитке:

– фенольные соединения, полифенолы;

– флавоноиды;

– органические кислоты (уксусная, глюконовая, глюкуроновая, лимонная, янтарная, яблочная, винная, малоновая, щавелевая, L-молочная, D-сахарная, пировиноградная, а также усниновая);

– сахароза, глюкоза и фруктоза;

– витамины B1, B2, B6, B12, С;

– 14 аминокислот, липиды, белки, некоторые гидролитические ферменты;

– вещества с антибактериальной активностью;

– диоксид углерода СО2;

– этиловый спирт;

– марганец, железо, никель, медь, цинк, свинец, кобальт, хром, кадмий [9].

**1.2. Состав и метаболическая активность симбионта**

Чайный гриб представляет собой симбионт, образованный несколькими видами дрожжей (Saccharomyces sp.,Zygosaccharomyces sp., Brettanomyces sp.), уксуснокислых бактерий (Gluconobacter sp., Acetobacter sp. Komagataeibacter sp.) и в ряде случаев молочнокислых бактерий (Lactobacillus sp., Lactococcus sp., Leuconostoc sp.) [10]. В процессе первичной ферментации образуются волокна целлюлозы, которые создают слой на поверхности напитка. Постепенно слои накладываются друг на друга, образуя плотную структуру похожую на шляпку гриба. В зависимости от географии, используемого сырья, условий ферментации, обнаруживаются различные штаммы бактерий и дрожжей.

Дрожжи относятся представляют собой эукариотические клетки размером около 8 мкм. Они анаэробы, оптимальная температура в 20–30 °C и рН 4,5–7,0. Наибольшее распространены Saccharomyces. Дрожжи делятся на два класса: 1) облигатно ферментирующие, превращают сахара в спирты и кислоты; 2) облигатно распираторные, превращают сахар и кислород в воду и углекислый газ. Ряд дрожжей могут выполнять обе эти функции [2].

Уксуснокислые бактерии (УКБ) могут быть грам + и - , имеют форму эллипса 0,5 мкм на 1–4 мкм. Могут быть аэробами и анаэробами, оптимальная температура 25–30 °C и рН 5,0–6,5. Разновидностей УКБ достаточно много, Gluconacetobacter xylinus и Komagataeibacter могут образовывать целлюлозу. УКБ полученный от дрожжей этанол окисляют до уксусной кислоты, также они вырабатывают глюкуроновую и глюкуроновую кислоты. Gluconabacter синтезирует витамин С [2,11].

Молочнокислые бактерии являются грам +, овальные или круглые. Оптимальная температура 25–40 °C и рН 4,0–6,0. МКБ могут быть: гомоферментаторами - гидрализуют глюкозу до молочной кислоты, а гетероферменты превращают глюкозу до молочной кислоты, углекислого газа и спирта, а из фруктозы образуют молочную кислоту, углекислый газ и уксусную кислоту [9]. МКБ в чайном грибе могут быть в малых количествах или отсутствовать.

**1.3. Ферментация**

Производство чайного гриба начинается с приготовления чайного настоя. К 1 л горячей воды (70-95°С) обычно добавляют 5-10 г чайного листа и дают настояться 5-15 мин. После удаления листьев чая, добавляют от 50 до 150 г/л сахарозы и охлаждают примерно до 20°С. Затем в раствор можно ввести сам чайный гриб (быстрый способ) или влить настой от предыдущей ферментации (традиционный способ). В любом случае рекомендуется влить 1–10% ранее ферментированного чайного гриба для повышения кислотности и более эффективного начала процесса. Чтобы обеспечить кислородный режим и в то же время защитить от насекомых, биореактор накрывают тканью или марлей. Оптимальная температура для ферментации Чайного гриба колеблется от 20 до 30°C. Через несколько дней после начала ферментации по традиционному способу наблюдается образование нового чайного гриба, плавающего на поверхности напитка, в виде тонкой желеобразной оболочки [9].

Ферментацию проводят от 7 до 60 дней или до тех пор, пока pH не упадет примерно до 4,2. Длительная ферментация может вызвать чрезмерное подкисление напитка из-за метаболизма УКБ и МКБ, что может снизить полезные свойства напитка.

**1.4. Биоактивные соединения**

Биоактивные соединения, содержащиеся в чайном грибе, могут поступать как из чая (фенольные соединения, полисахариды, витамины, минералы, аминокислоты), так и в результате метаболической активности микроорганизмов (полифенолы, органические кислоты, витамины, ферменты, белки, в том числе бактериоцины) [10].

**1.4.1. Фенольные соединения**

Основные фенольные соединения зеленого чая включают флавонолы, флавоны и фенольные кислоты. Флаванолы (галлокатехин, катехин, эпикатехин, эпигаллокатехин) являются наиболее распространенными среди фенольных соединений зеленого чая. Флавоны в зеленом чае это гликозидные структуры, кемпферол и кверцетин и галловая фенольная кислота. Зеленый чай характеризуется более высоким содержанием полифенолов по сравнению с черным чаем и, следовательно, более сильными оздоровительными свойствами поэтому он может быть более привлекательной альтернативой.

**1.4.2. Органические кислоты**

Основные органические кислоты чайного гриба: уксусная, молочная, глюконовая и глюкуроновая. Их польза заключается в антимикробной активности, повышении биодоступности фенольных соединений [1,4].

Уксусная кислота синтезируется УКБ из этилового спирта под действием алкогольдегидрогеназы, а затем альдегиддегидрогеназы.

Глюконовая кислота является продуктом окисления D-глюкозы УКБ, главным образом Глюконобактер и Komagataeibacter.

Молочная кислота является продуктом метаболизма молочнокислых бактерий. Она способствует антимикробным свойствам, улучшает кровообращение, предотвращая образование тромбов.

D-сахарная кислота-1,4-лактон (синтезирует Глюконобактер) ингибирует глюкуронидазу, фермент, косвенно связанный с раком; ингибирует апоптотическую гибель β-клеток поджелудочной железы.

**1.4.3. Витамины**

Витамины, присутствующие в чайных настоях, представляют собой в основном витамины группы В, витамины Е, К, А и С - они обладают сильными антиоксидантными свойствами. Во время ферментации чая содержание витаминов значительно увеличивается в результате метаболической активности как уксуснокислых бактерий, так и молочнокислых бактерий (при их наличии) и дрожжей (источник витаминов группы B).

**1.4.4. Бактериоцины**

Бактериоцины - небольшие белковые структуры, продуцируемые молочнокислыми бактериями (в основном Pediococcus, Lactococcus, Leuconostoc), проявляют антагонистический против патогенных микроорганизмов. Так низин - соединение, активное против грамположительных бактерий, таких как Листерия, Золотистый стафилококк, Клостридия, Синегнойная палочка [9,10].

**2. Методика практической части работы**

Методы исследования: анализ теоретической литературы, химический эксперимент, измерение физико-химических показателей, статистическая обработка результатов.

Оборудование: марля, пробирки на штативе, колбы, химические стаканы, автоматическая пипетка, весы, стеклянные палочки, бюретка для титрования, водяная баня, фотоаппарат, белый бокс, штатив, приложение Color Grab, рН-метр, рефрактометр.

Реактивы: 3% раствор FeCl3, 10 % раствор гидроксида калия (KOH), медный купорос (CuSO4), 0,05 н раствор перманганата калия (KMnO₄), дистиллированная вода, пищевая сода (**NaHCO₃), 1% раствор метиленовый синий.**

Исследование проходило в несколько этапов (подробно методика прописана в Приложении 1).

**1-ый этап.**Подготовка среды для ферментации. Мы приготовили 2 банки чайного настоя - №1 Черный чай и №2 Зеленый чай (Приложение рис. 1). На 1 л горячей воды добавляли 10 г чайного листа и настаивали 10 мин, удаляли чайные листья, потом добавляли 100 г/л сахарозы и охлаждали примерно до 20°С. Затем вводили сам чайный гриб, предварительно промытый в проточной воде. Биореакторы накрывали марлей и убирали банки от прямого солнечного света и сквозняков.

**2-ой этап.** Начиная с первого дня исследования каждый день проводились измерения рН (на pH-метре), плотности (на цифровом рефрактометре ST335A) и органолептических показателей растворов. Ферментация длилась 20 дней.

**3-ий этап.** На 1, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 17 и 20 сутки ферментации. проводилось определения нахождения в культуральной жидкости витаминов B6 (пиридоксин), C (аскорбиновая кислота), белка и общей антиоксидантной активности культуральной жидкости. Подробно методики определения прописаны в Приложении 1. После реакций пробирки фотографировались в белом боксе.

Полученные фотографии обрабатывались и загружались в приложение Color Grab для установления и фиксации насыщенности цвета (S) раствора в цветовой системе HSL (Приложение рис.2). По методике Меньшикова В.В. и соавторов, концентрацию растворов можно определить по насыщенности его цвета [6].

**4-ый этап**. Исследование проводились в трехкратной повторности. Полученные результаты обрабатывались в программе Microsoft Excel и затем анализировались.

**3. Результаты и обсуждение**

**3.1. Влияние типа и концентрации экстрагента**

Мы экспериментально определили наличие витаминов В6, С и белков в культуральной жидкости на черном и зеленом чае, также смогли приблизительно установить динамику содержания аскорбиновой кислоты - Таблица 1, Таблица 2 и Диаграмма 1.

Таблица 1. Динамика показателей культуральной жидкости чайного гриба (субстрат черный чай + сахароза)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| День ферментации | 1 | 3 | 5 | 7 | 10 | 13 | 15 | 17 | 20 |
| Наличие белков | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Наличие витамина В6 | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Наличие витамина С | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Количество аскорбиновой кислоты в 100 мл (по показателю S раствора) | - | - | 0,1 | 0,3 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,7 |

Таблица 1. Динамика показателей культуральной жидкости чайного гриба (субстрат зелёный чай + сахароза)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| День ферментации | 1 | 3 | 5 | 7 | 10 | 13 | 15 | 17 | 20 |
| Наличие белков | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Наличие витамина В6 | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Наличие витамина С | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Количество аскорбиновой кислоты в 100 мл (по показателю S раствора) | - | 0,1? | 0,2 | 0,6 | 1,3 | 1,3 | 1,4 | 1,4 | 1,3 |

Качественная реакция на содержания белка (по биуретовой реакции) в культуральной жидкости была положительным на 7 сутки культивирования, но интенсивность окраски образцов КЖ была, как намного меньше контрольного раствора белка, что позволило предположить, что содержание белка незначительно и даже приблизительное его содержание трудно установить.

С помощью качественных реакций мы определяли водорастворимые витамины в культуральной жидкости Medusomyces gisevi. Также уже начиная с 5 суток мы смогли обнаружить в пробах обеих КЖ пироксидин и аскорбиновую кислоту. За счет разной насыщенности цвета раствора при реакции с метиленовым синим и последующей постройки калибровочной прямой, мы смогли приблизительно высчитать средние показатели содержания аскорбиновой кислоты за дни исследования (Диаграмма 1).

По графику мы видим что пик нахождения аскорбиновой кислоты приходится в обоих случаях на 10 день культивирования, причем скорость накопления в случае КЖ зеленого чая намного выше. После пика на 10 уровень содержания аскорбииновой кислоты остается практически одинаковым до конца исследования, возможно немного убывает к 20 дню.

Качественная реакция на пироксидин смогла установить только его присутствие на 5 день культивирования, к 7 дню насыщенность цвета качественной реакции немного увеличилась и больше не менялось до конца культивирования.

Динамика изменения рН представлена в Диаграмме 2 и Таблице 1 (в Приложении).

По диаграмме изменения активной кислотности КЖ из черного и зеленого чая мы можем отметить изначально более высокий рН у зеленого чая. Также мы можем отметить явное понижение водородного показателя в первые четыре дня со значений 5,6 и 6,4 до 4,5 у обоих образцов, происходящее за счет накопления органических кислот в среде (особенно уксусной, глюконовой и глюкуроновой кислот, вырабатываемых уксуснокислыми бактериями). После 4 дня снижение рН идет очень плавно, практически синхронно для обеих КЖ, через 16 дней ферментации значения рН для обоих образцов находились в диапазоне 3,35, что по литературным данным [9,11] считается приемлемыми для употребления человеком (pH ниже 2,5 может представлять угрозу для здоровья, а pH выше 4,2 могут вызвать вопросы относительно микробиологической безопасности напитка [11]).

Определение изменения плотности раствора представлена в Диаграмме 3 и Таблице 2 (Приложение). Перед определение плотности на рефрактометре, КЖ фильтровали.

Мы ищем объяснение этим данным в литературе.

Ниже представлен график изменения общей антиоксидантной активности КЖ (Диаграмма 4).

По диаграмме мы видим, что изначальная антиоксидантная активность (АОА) зеленого чая была выше, чем у черного в 1,4 раза. Примерно на таком же уровне она находилась первые 7 дней ферментации. По графику мы видим, что на 6-8 дни ферментации приходится пик антиоксидантной активности КЖ на черном чае — 2,02, а потом он начинает плавно убывать. У КЖ на зеленом чае пик антиоксидантной активности пришелся на 14-16 день ферментации и составлял 2,91 и затем показатель выходит на плато (разница с пиком у КЖ черного чая почти 1,5 раза). Мы можем сделать заключение, что изначальная разница в АОА сохраняется и немного увеличивается за счет синтеза симбионтом новых полифенольных соединений из полифенолов изначального чая.

*Органолептические показатели*

В начале ферментирования, когда мы приготовили напиток он был темно-коричневого цвета, с 3 по 6 день он стал заметно светлее, и затем до конца эксперимента не менялся. Первоначальный сладкий чайный раствор становился кислее на вкус, с 4 по 7 дни наблюдалось выделение пузырьков углекислого газа. На 7-8 дни оба раствора приобрели довольно яркий кисло-сладкий вкус, немного похожий на квас. На 13 день ферментирования оба раствора стали очень кислыми с заметным уксусным запахом.

**4. Выводы**

Таким образом, на основе проделанной работы, можно сделать следующие выводы:

1. На 3 диаграммах (изменения рН, плотности и АОА) в начале культивирования выделяются участки, границы которых приходятся на 4-6 день ферментации. Активно происходят процессы, подготавливающие среду для жизнедеятельности самого симбионта - интенсивное снижение рН и накопление органических кислот (цвет раствора становится более светлым). В этот период концентрация полезных для организма веществ незначительна - качественные реакции не выявляют наличие БАВ.

2. Водорастворимые витамины и белок обнаружены в обоих КЖ на 5 день ферментирования (содержание белка незначительно). В КЖ на зеленом чае содержание аскорбиновой кислоты в 2 раза больше.

3. Показатель общей антиоксидантной активности в чайном грибе увеличивается по сравнению с подслащенным чаем до 1,5 раз на 6-8 сутки культивирования в двух КЖ.

4. Наша изначальна гипотеза подтвердилась частично: достоверными отличием для КЖ из разных чаев является содержание аскорбиновой кислоты (больше в КЖ на зеленом чае). Более высокая АОА КЖ может объясняться более высоким наличием там вит. С и изначально более высоким показателем ОАО зеленого чая. Остальные показатели у двух КЖ схожи.

Проведя анализ изменения физико-химических характеристик и накопления биологически активных веществ в КЖ чайного гриба в процессе его ферментации, мы обнаружили некоторые тенденции, позволяющие рекомендовать его применение в качестве профилактической меры для дополнения рациона питания биологически активными веществами, начиная с 5-ого дня культивирования.

**5. Список используемой литературы и web-ресурсов:**

1. Алексаночкин Д.И. // Изучение накопления биологически активных веществ и антиоксидантной активности в культуральной жидкости Medusomyces gisevi (чайный гриб) // «Молодой учёный» № 10 (457), 2023 г., стр 39-45

2. Алиева Е.В., Болтачева К.М. и др. // Антибактериальный потенциал и перспективы использования чайного гриба //Ульяновский медико-биологический журнал. № 4, 2018 , стр 166-171

3. Бондарева Н.И., Митина С.С. // Содержание аскорбиновой кислоты и рутина в ферментативной жидкости чайного гриба (Мedüsomyces gysevii) при различных условиях культивирования // Наука. Инновации. Технологии, №2, 2016 , стр 147-158

4. Веснина А.Д. и др.// Подбор параметров культивирования для наибольшего накопления биомассы и БАВ в напитке из чайного гриба // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». 2021. Т. 9, № 4. С. 5–12

5. Горецкая Т.И., Полехина Н.Н., Пантюхин Д.В. // Динамика накопления биологически активных веществ в культуральной жидкости Мedusomyces gisevi // Sciences of Europe # 69, (2021) , стр 3-6

6. Меньшиков В.В., Лисун Н.М., Симонова М.Ж., Сутягин А.А. Использование мобильных приложений для фотоколометрии в школьных исследованиях // Биология в школе. - 2018 - № 6.

7. Зайнуллин Р.А. и др. //Влияние условий культивирования чайного гриба (сombucha) на его функциональные свойства в пищевых профилактических напитках // Известия вузов. Пищевая технология, № 4, 2010, стр 29-31

8. Поддубная О.В., Ковалева И.В., Мохова Е.В. // Химия. Лабораторный практикум. Качественные реакции на витамины //Горки, 2020, стр. 177.

9. Antolak, H.; Piechota, D.; Kucharska, A//. Kombucha Tea - A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY) //Antioxidants 2021, 10, 1541

10. Ojo, A.O.; de Smidt, O. //Microbial Composition, Bioactive Compounds, Potential Benefits and Risks Associated with Kombucha: A Concise Review// Fermentation 2023, 9, 472.

11. [ru.wikipedia.org›Чайный гриб](https://ru.wikipedia.org/wiki/Чайный_гриб)

**6. Приложение**

Приложение 1. Описание методики химических экспериментов

Оборудование: марля, колбы, бюретка для титрования, пробирки на штативе, химические стаканы, автоматическая пипетка, весы, стеклянные палочки, водяная баня, фотоаппарат, белый бокс, штатив, приложение Color Grab, рН-метр, рефрактометр.

Реактивы: 3% раствор FeCl3 , 10% раствор гидроксида калия (KOH), медный купорос (CuSO4), 0,05 н раствор перманганата калия (KMnO₄), дистиллированная вода, пищевая сода (**NaHCO₃), 1% раствор метиленовый синий.**

Наличие витамина B6 (пиридоксина) проводили с использование качественной реакции на пиридоксин [1]. В пробирку вносят 2,5 мл КЖ чайного гриба, затем добавляют 1 мл 3 %-ного раствора хлорного железа (FeCl3). Раствор встряхивают и при наличии витамина раствор окрашивается в красный цвет.

Наличие витамина C (аскорбиновая кислота) определялось количественно с качественной реакции с метиленовой синью [3,8]. Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты и восстановлением метиленовой сини в бесцветную лейкоформу: В пробирку наливают 1 каплю 1%-ного раствора метиленовой сини, 2 мл 10% раствора соды, 10 мл КЖ и нагревают на водяной бане. Жидкость обесцвечивается. Для контроля делают ту же реакцию с экстрактом чая. Обесцвечивания жидкости не происходит.

Наличие белка определялось с помощью Биуретовой реакции - это качественная реакция на обнаружение всех белков. К 5 мл раствора КЖ чайного гриба добавляют 5 капель 10% раствора гидроксида калия (KOH) и 1-2 капли раствора медного купороса (CuSO4). При наличии белка раствор окрашивается в фиолетовый цвет [5].

Общую антиоксидантную активность определяли методом перманганатометрии. В большую фарфоровую чашку наливают 250 мл дистиллированной воды, 12,5 мл раствора индигокармина и 5 мл КЖ. Раствор в чашке, окрашенный в синий цвет, титруют 0,05 н раствором перманганата калия, прибавляя его небольшими порциями и всё время перемешивая жидкость в чашке стеклянной палочкой, до появления жёлтого окрашивания.

Одновременно необходимо провести контрольный опыт: в чашку наливают 250 мл чая, 12,5 мл индигокармина и титруют 0,05 н раствором перманганата. Опытное и контрольное титрования повторяют 3 раза.

Вычисляют суммарное содержание антиоксидантов по формуле:

X= (a-b)\*100K\*0,0064V1 / V2

где а — объём 0,1 н раствора перманганата калия, израсходованного на титрование опытного раствора, мл;

b — то же для контрольного опыта;

К — поправка на титр 0,1 н раствора перманганата калия;

0,0064 — масса водного экстракта трав танина, окисляемого 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия, г;

V1 — объём КЖ, мл;

V2 — объём водного экстракта, взятого для титрования, мл.

Таблица 1. Значения рН культуральной жидкости чайного гриба

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Значения рН субстрата | |
| День культивирования | №1  Черный чай | №2  Зеленый чай |
| 1 | 5,65 | 6,45 |
| 2 | 5,35 | 5,65 |
| 3 | 5,07 | 5,11 |
| 4 | 4,55 | 4,42 |
| 5 | 4,38 | 4,24 |
| 6 | 4,24 | 4,11 |
| 7 | 4,11 | 4,04 |
| 8 | 3,98 | 3,94 |
| 9 | 3,94 | 3,85 |
| 10 | 3,92 | 3,77 |
| 11 | 3,84 | 3,71 |
| 12 | 3,79 | 3,69 |
| 13 | 3,65 | 3,56 |
| 14 | 3,57 | 3,52 |
| 15 | 3,5 | 3,49 |
| 16 | 3,38 | 3,41 |
| 17 | 3,36 | 3,4 |
| 18 | 3,35 | 3,39 |
| 19 | 3,36 | 3,38 |
| 20 | 3,34 | 3,38 |

Таблица 2. Значения показателя плотности КЖ чайного гриба

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Значения плотности раствора | |
| День культивирования | №1  Черный чай | №2  Зеленый чай |
| 1 | 1,039 | 1,039 |
| 2 | 1,04 | 1,04 |
| 3 | 1,041 | 1,042 |
| 4 | 1,044 | 1,046 |
| 5 | 1,056 | 1,055 |
| 6 | 1,056 | 1,054 |
| 7 | 1,055 | 1,052 |
| 8 | 1,054 | 1,052 |
| 9 | 1,054 | 1,049 |
| 10 | 1,054 | 1,046 |
| 11 | 1,053 | 1,046 |
| 12 | 1,053 | 1,046 |
| 13 | 1,053 | 1,046 |
| 14 | 1,052 | 1,045 |
| 15 | 1,052 | 1,045 |
| 16 | 1,051 | 1,044 |
| 17 | 1,05 | 1,043 |
| 18 | 1,048 | 1,043 |
| 19 | 1,048 | 1,043 |
| 20 | 1,048 | 1,043 |

рис. 1



рис. 2

