УДК 637.146

ИССЛЕДОВАНИЕ УТИЛИЗАЦИИ УГЛЕВОДОВ МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ ДРОЖЖЕВОЙ МИКРОФЛОРОЙ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Олешкевич Ольга Игоревна
аспирант

Куликова Ирина Кирилловна
к.т.н., доцент

Жигулина Олеся Владимировна
аспирант
Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

Подсвирова Ирина Александровна
Заведующий лабораторией клинической микробиологии, Ставропольский краевой клинический центр специализированных видов медицинской помощи, Ставрополь, Россия

Сомов Виталий Сергеевич
Старший менеджер разработки и внедрения Pepsico, Вимм Биль Данн, Москва, Россия

В статье представлены результаты исследования утилизации углеводов молочного сырья дрожжевой микрофлорой кисломолочных продуктов

Ключевые слова: УГЛЕВОДЫ МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ, КИСЛОМОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ, ДРОЖЖИ

UDC 637.146

RESEARCH OF CARBOHYDRATE UTILIZATION BY YEAST MICROFLORA OF FERMENTED MILK PRODUCTS

Oleshkevich Olga Igorevna
postgraduate student

Kulikova Irina Kirillovna
Cand.Tech.Sci., associate professor

Zhigulina Olesya Vladimirovna
postgraduate student
North Caucasian federal university, Stavropol, Russia

Podsvirova Irina Aleksandrovna
Managing laboratory of clinical microbiology, Stavropol regional clinical center of specialized types of medical aid, Stavropol, Russia

Somov Vitaliy Sergeevich
R&D Senior project manager
Pepsico, Wimm Bill Dann, Moscow, Russia

In the article, we present the results of the researches of carbohydrate utilization by yeast microflora of fermented milk products

Keywords: CARBOHYDRATES OF DAIRY RAW MATERIALS, SOUR-MILK PRODUCTS, YEAST

Возможность дрожжей размножаться в молоке определяется способностью их сбраживать лактозу или наличием в молоке другой микрофлоры, в частности молочнокислой, обладающей лактозной активностью.

По биохимической активности, способности сбраживать лактозу и развиваться в молоке дрожжи делятся на три группы.

В первую группу отнесены неспорообразующие, не сбраживающие лактозу и другие углеводы дрожжи вида Candida. Развиваются на поверхности кисломолочных продуктов при их хранении.

Вторую группу представляют спорообразующие дрожжи вида Saccharomyces cartilaginosus, не сбраживающие лактозу. Они сбраживают мальтозу с образованием газа. Эти дрожжи называют «дикими», так как они в производстве не применяются, но хорошо развиваются с молочнокислыми бактериями.

Третью группу составляют дрожжи, сбраживающие лактозу. Это спорообразующие виды Saccharomyces lactis, Lydoccharomyces laktis, Fabospora fladilis, а также неспорообразующие - Torulopsis kefir и Candida pseudotropicalis var.lactis. Первые два вида лактозу сбраживают с образованием газа, мальтозу все перечисленные виды не сбраживают.

Дрожжи третьей группы могут входить в состав микрофлоры кефирных грибков и вводиться в состав заквасок для производства других кисломолочных продуктов [2,3].

Одной из задач при производстве кисломолочных продуктов остается исследование утилизации углеводов молочного сырья дрожжевой микрофлорой. Проблема развития дрожжей особенно актуальна при производстве кисломолочных продуктов. Целью наших исследований явилось изучение дрожжевой микрофлоры кисломолочных продуктов и ее способности утилизировать углеводы молочного сырья. Объектом изучения нами выбраны культуры дрожжей, выделенные из кисломолочных продуктов.

Исследованию углеводного состава подвергались образцы айрана и кефира разной степени свежести: однодневные, трех- и семидневные. Результаты исследований были получены при использовании различных методов анализа: метода тонкослойной хроматографии и метода газожидкостной хроматографии. Хроматограммы углеводного состава исследуемых продуктов, полученные методом тонкослойной хроматографии представлены на рисунке 1.

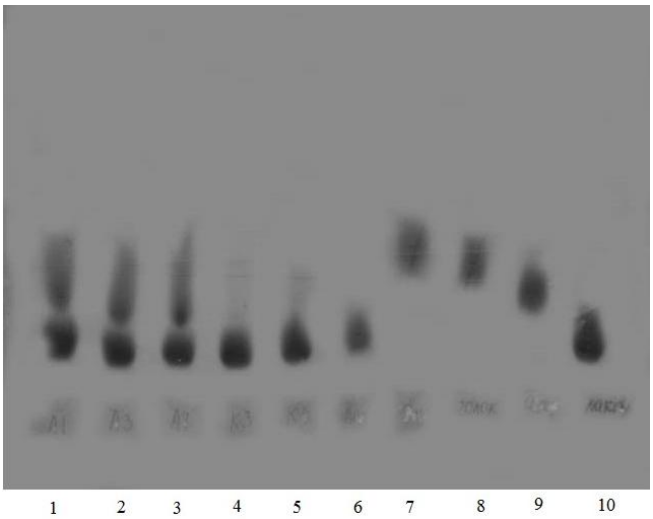

Рисунок 1. Тонкослойная хроматограмма углеводного состава айрана и кефира: 1 – айран однодневный; 2 - айран трехдневный; 3 - айран семидневный; 4 – кефир трехдневный; 5 - кефир семидневный; 6 ,10 – 0,5 % раствор лактозы; 7 – 0,5 % раствор глюкозы; 8 – 0,5 % раствор галактозы; 9 – 0,5 % раствор мальтозы.

На приведенном рисунке отчетливо видно, что исследованные продукты, несмотря на степень выдержки, содержат характерный для кисломолочных продуктов дисахарид лактозу, но айран в отличие от кефира содержит значительное количество моноуглевода галактозы. При этом галактоза накапливалась уже в свежем продукте, в дальнейшем количество этого углевода практически не изменялось. Для подтверждения этого нами дополнительно применен метод газожидкостной хроматографии. Результаты представлены на рисунках 2, 3.

На хроматограммах айрана отчетливо видны участки накопления галактозы в трех изомерных формах (γ, β, α), у кефира они практически отсутствуют. Таким образом, доказано, что в результате жизнедеятельности микрофлоры в айране накапливается свободная галактоза. В количественном отношении в углеводном составе айрана содержится 69,3% лактозы и 30,7% галактозы. В кефире эти цифры составляют, соответственно, 99,46% и 0,54%. Другие углеводы данным методом не выявлены. Полученные данные позволяют сделать вывод, что айран имеет специфику, связанную с накоплением в нем моноуглевода галактозы, что

отличает его от других кисломолочных продуктов, в частности от кефира, где в свободном виде присутствуют только следы этого углевода. На наш взгляд это наиболее существенное отличие свойств этих продуктов.

Как известно, молочнокислые бактерии получают энергию за счет сбраживания углеводов с образованием молочной кислоты в качестве основного продукта брожения. Сбраживание лактозы – основополагающий процесс при производстве кисломолочных продуктов. У молочнокислых микроорганизмов лактоза в процессе переноса в клетку фосфорилируется и сразу же гидролизуется до глюкозо-6-Р и галактозо-6-Р при участии внутриклеточного энзима Р-β-галактозидазы (Р-β-гал). Далее глюкозо-6-Р сбраживается до лактатов гликолитическим путем [1,4,7].

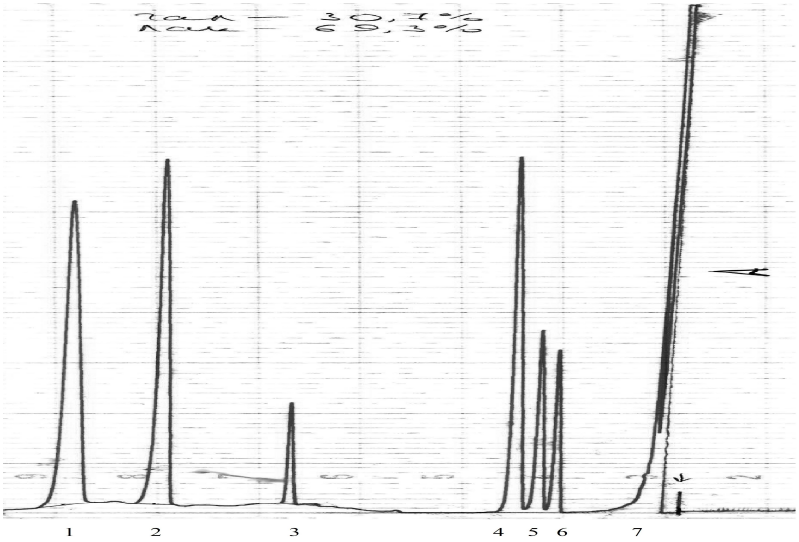

Рисунок 2. Газожидкостная хроматограмма углеводного состава айрана
1 - α-лактоза; 2 - β-лактоза; 3 – внутренний стандарт (фенил-β-Д-глюкопиранозид); 4-γ-галактоза; 5 - β-галактоза; 6 - α-галактоза; 7 – растворитель (непрореагированный агент).

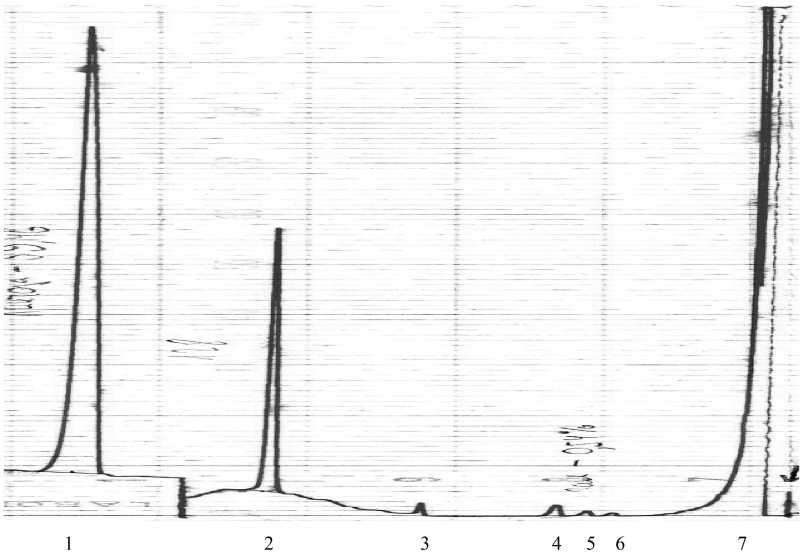

Рисунок 3. Газожидкостная хроматограмма углеводного состава кефира: 1-α-лактоза; 2-β-лактоза; 3–внутренний стандарт (фенил-β-Д-глюкопиранозид); 4-γ-галактоза; 5 - β-галактоза; 6- α-галактоза; 7 – растворитель (не прореагированный агент).

Галактозо-6-Р, образующийся в результате гидролиза лактозы, сбраживается в клетках лактобактерий Д-тагатозо-6-Р путем, который соединяется с гликолитическим путем на уровне триозофосфатов, так что конечным продуктом ферментации галактозы, как и глюкозы, является молочная кислота [5,6]. Таким образом, ни глюкоза, ни галактоза в самих кисломолочных продуктах не появляются: в среду выделяются только молочная кислота и минорные продукты ферментации лактозы.

Однако, известно, что среди термофильных палочек и стрептококков существуют виды неспособные использовать галактозу и, таким образом, в продуктах накапливается свободная галактоза. При этом галактоза будет сбраживаться только после того, как сброжена вся лактоза. Среди термофильных палочек, содержащихся в айране, отмечены виды неспособные сбраживать галактозу и, таким образом, в продуктах накапливается этот углевод в свободном виде. Характерно, что дрожжи, содержащиеся в закваске для айрана, не способны использовать лактозу, но сбраживают галактозу. Вероятно, дрожжи айрана для получения своей энергии предпочитают глюкозу, галактоза будет использована ими только

после того, как молочнокислыми бактериями будет сброжена вся лактоза, поставляющая глюкозу и галактозу.

Дрожжи другой биохимической направленности были выделены в работе Хамнаевой Н.И., Доржневой Ч.Б. (2006) из сброженного в естественных условиях козьего и коровьего молока, ферментативного традиционного монгольского напитка – айран и микробной ассоциации кефирных грибков. Культуры представляли собой штаммы молочных дрожжей, способных самостоятельно сбраживать лактозу в качестве основного источника питания, и ее компоненты – глюкозу и галактозу. Культуры обладали высокой галактоэнзимной ферментной системой и отнесены авторами к роду Torulopsis.

Напротив, выделенные в данной работе дрожжи, частично сбраживают лактозу, обладают низкой галактоэнзимной ферментной системой, что способствует накоплению в среде галактозы.

Для дополнительного изучения дрожжевой микрофлоры айрана и ее способности усваивать углеводы предварительно были исследованы физиологические свойства испытуемых бактерий. Ниже приводится описание идентификационных характеристик чистых культур дрожжей выделенных из домашнего айрана (таблица 1).

Таблица 1 - Идентификационная характеристика дрожжевой микрофлоры домашнего айрана

№ п/п	Показатели	Выделенная культура
1.	Морфология колоний	Общая форма колонии: круглая; Размер: 8±2 мкм; - Цвет: белый с кремовым оттенком: - Поверхность: бороздчатая матовая, колония не прозрачная; - Профиль: бугристый; Край: гладкий; Структура колонии однородная.
2.	Морфологические свойства клеток	Форма клеток овальная, грамположительные; - Клетки почкуются через перемычку, клетки неподвижные; - Споры отсутствуют.
3.	Штрих на МПА (температура культивирования 30° С)	мощность роста - умеренная; блеск - жирный, характер поверхности - шероховатая, бугроватая; оптические признаки - непросвечивающий; консистенция – маслянистая; цвет посевной черты - пигментация молочный; окраска питательной среды - не изменилась
4.	Рост на Сабуро (температура культивирования 20° С)	густой рост, мелкие белые колонии и колонии каплевидной формы, матовые, серо-бежевого цвета - дрожжи
5.	Способность к брожению	
	сахарозы	+
	глюкозы	+
	галактозы	+
	лактозы	±
	фруктоза	+
	мальтоза	+
	маннит	-

Обозначения: + положительный результат; - отрицательный результат; ± возможен положительный и отрицательный результат.

Углеводные среды Гисса с индикаторным красителем и стеклянным поплавком – для определения сахаролитических свойств дрожжевой микрофлоры домашнего айрана, изображены на рисунке 4.

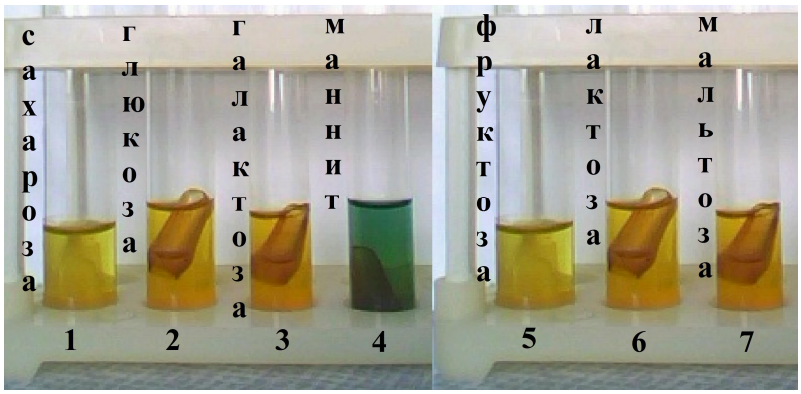

Рисунок 4. Углеводные среды Гисса для определения сахаролитических свойств дрожжевой микрофлоры домашнего айрана

При проведении сравнительного анализа морфологии и особенностей роста лактозосбраживающих дрожжей на стандартных питательных средах были получены определенные результаты.

Микроскопирование препаратов исследуемых культур дрожжей проводилось после 24 часов культивирования на среде Сабуро. При микроскопировании культур наблюдается (рис. 5): 1)C.kefyr – отсутствие псевдомицелия, клетки овальные, крупные; 2)T. pullulans – наличие псевдомицелия, клетки круглые, мелкие; 3)K. marxianus – отсутствие псевдомицелия, клетки круглые, среднего размера; 4)L. scottii – наличие псевдомицелия, клетки круглые, мелкие.

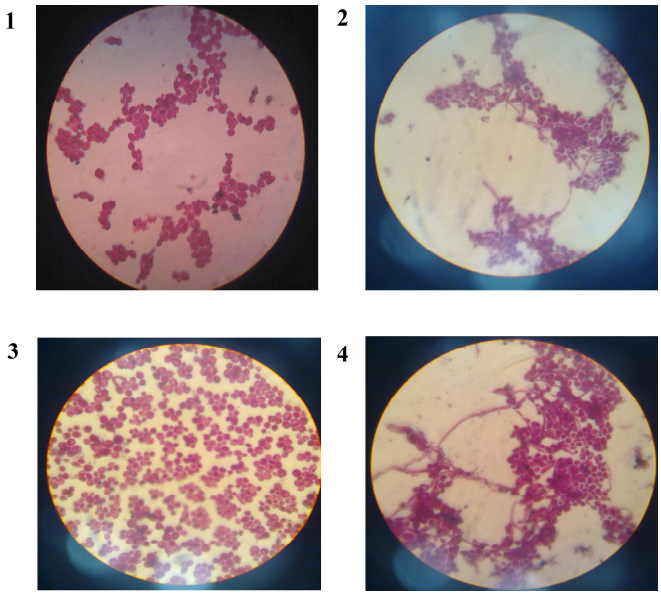

Рисунок 5. Микропрепараты дрожжей, культивируемых на среде Сабуро, краситель фуксин: 1)C.kefyr, 2)T. pullulans, 3)K. marxianus, 4)L. scottii, увеличение 40х15

Таким образом, видно, что путем только микроскопирования, опираясь лишь на морфологию организмов, идентифицировать и отличить различные виды невозможно. Поэтому следующим этапом исследований выступил ряд опытов по изучению культуральных свойств представленных дрожжей.

Культивирование на агаре Сабуро проводилось при температуре 20-25^{0}С, продолжительностью 48 часов. У колоний С. kefyr поверхность глянцевая, блестящая; края волнистые; цвет - от кремового до бледно-розового; структура колоний – однородная; профиль выпуклый. T.pullulans дают ребристые колонии, матовые, кремовые, с частичным посветлением; K.marxianus - колонии глянцевые, светло-кремовые. L.scottii – колонии матовые, кремовые, край волнистый. Форма и цвет колоний показаны на рисунке 6.

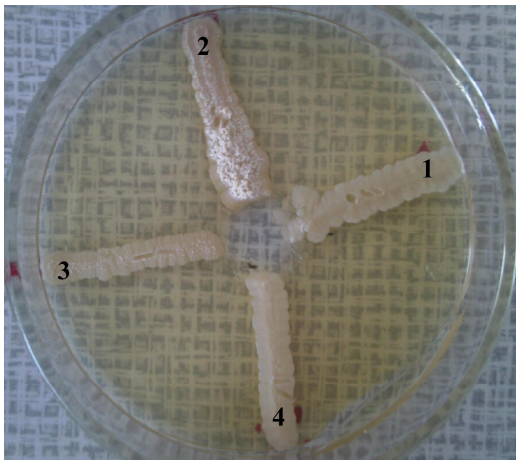

Рисунок 6. Вид колоний дрожжей на среде Сабуро: 1)C.kefyr, 2)T. pullulans, 3)K. marxianus, 4)L. scottii

При исследование влияния красителей на культуральные свойства лактозосбраживающих дрожжей были получены определенные результаты.

Использовались выбранные с помощью вышеизложенных исследований среды АГМ и Сабуро, в которые вносили различные красители: фуксин, метиленовый синий, генцианвиолет, судан III,

резазурин, бромтимоловый синий, бриллиантовый зеленый. Культивирование проводилось в течение 48 ч и при температуре 30^0С.

Добавление анилиновых красителей к элективным питательным средам позволяет отличить разные культуры дрожжей, вследствие различного окрашивания колоний. Наиболее целесообразно вносить красители до стерилизации среды, во избежание обсеменения посторонней микрофлорой. Проведенный опыт по внесению красителя до и после стерилизации показал, что на интенсивность цвета среды условия стерилизации не влияют.

Были проведены исследования данных культур на среде АГМ с добавлением метиленового синего. Отмечены следующие особенности роста колоний: C.kefyr – голубого цвета, с усилением цвета к центру колонии, K. marxianus – бледно-голубые, по краям - белые, L.scotti – слабый рост, имеются вкрапления голубого окрашивания, колонии T.pullulans – слабо-голубого цвета.

Также была использована питательная среда Сабуро с добавлением следующих красителей: фуксина, метиленового синего, бриллиантового зеленого, судана III, генцианвиолета.

Результаты опыта показали, что на среде с бриллиантовым зеленым наблюдается подавление роста, т.к. этот краситель является мощным антисептиком, виден едва заметный рост K marxianus с осветлением среды, и C.kefyr, с позеленением колоний.

На среде с фуксином C.kefyr дает колонии темно – розового цвета, K. marxianus и L.scotti слабо розовые, колонии T.pullulans – после 48 часов культивирования имели бледно розовый цвет, после 7 суток произошло разделение цвета колонии на 2 части – один конец стал более темно-розовым. На среде с метиленовым синим колонии C.kefyr темно – синего цвета, с осветлением среды вокруг, K. marxianus – в середине колонии окраска синяя, по краям - белая, L.scotti – голубого окрашивания, колонии

T.pullulans – после 48 часов культивирования имели светло-голубой цвет, после 7 суток произошло разделение цвета колонии на 2 части – одна часть колонии стала более темной, с последующим пожелтением.

Результаты культивирования на среде Сабуро с добавлением метиленового синего и фуксина представлены на рисунках 7, 8. Результаты исследований сведены в таблицу 2.

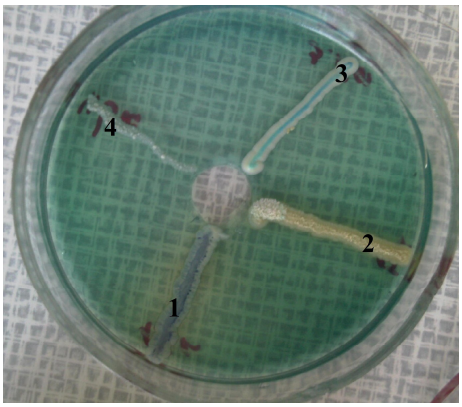

Рисунок 7. Вид колоний дрожжей на среде Сабуро с метиленовым сиим: 1)C.kefyr, 2)T. pullulans, 3)K. marxianus, 4)L. scottii - 48 ч культивирования

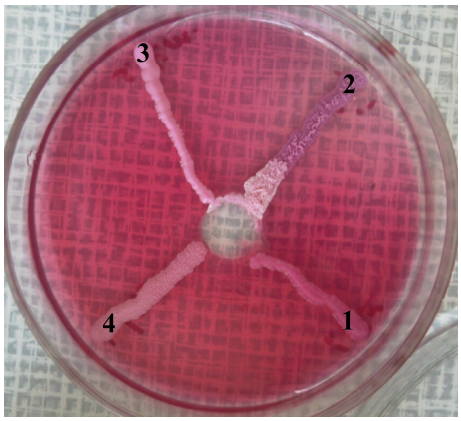

Рисунок 8. Вид колоний дрожжей на среде Сабуро с фуксином: 1)C.kefyr, 2)T. pullulans, 3)K. marxianus, 4)L. scottii - 48 ч культивирования

Таблица 2 – Результаты исследований культивирования дрожжей на среде Сабуро с метиленовым синим и фуксином

Признаки	Дрожжи			
	C.kefyr	T.pull	K.marx	L.scotti
Поверхность колоний	Гладкая, глянцевая, блестящая	Шероховатая, с завитками, сухая	Блестящая, бугристая	Матовая, бугристая
Интенсивность роста	умеренный	быстрый	умеренный	слабый
Форма колоний	выпуклые, край волнистый, ровный	завитки, край волнистый	выпуклые, волнистый край	выпуклые, бугристые
Посветление среды	да	да	нет	нет
Цвет колоний (на среде с фуксином / метиленовой синью)	ярко- розовый / голубой, с усилением цвета к центру	2-х цветн.: одна половина светло-, другая темно-розовая / голубая	розовый, с усилением цвета к центру / по центру синяя полоса	розовый / слабо-голубой

На среде с суданом III рост культур аналогичен росту на Сабуро без красителей. На среде с генцианвиолетом отмечен рост K. marxianus темно-синего цвета, остальные культуры – рост не обнаружен. На среде с резазурином колонии всех культур изменили цвет до серо-фиолетового. На среде с бромтимоловым синим все культуры имеют ярко-желтое окрашивание, кроме T.pullulans –светло-желтые колонии.

После 48 ч культивирования было проведено микроскопирование препаратов исследуемых дрожжей методом «раздавленная капля». Результаты опыта с некоторыми красителями отражены на рисунках 9, 10.

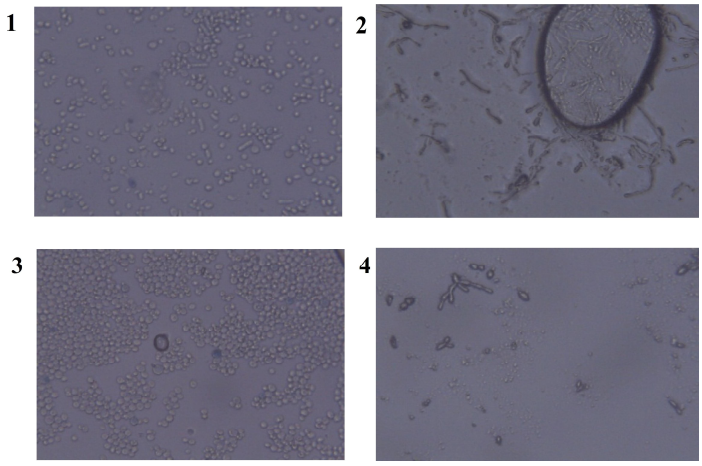

Рисунок 9. Микропрепараты дрожжей после культивирования на среде Сабуро с метиленовым синим. Тип препарата − «раздавленная капля», увеличение 40х15: 1)C.kefyr, 2)T. Pullulans, 3)K. marxianus, 4)L. Scottii

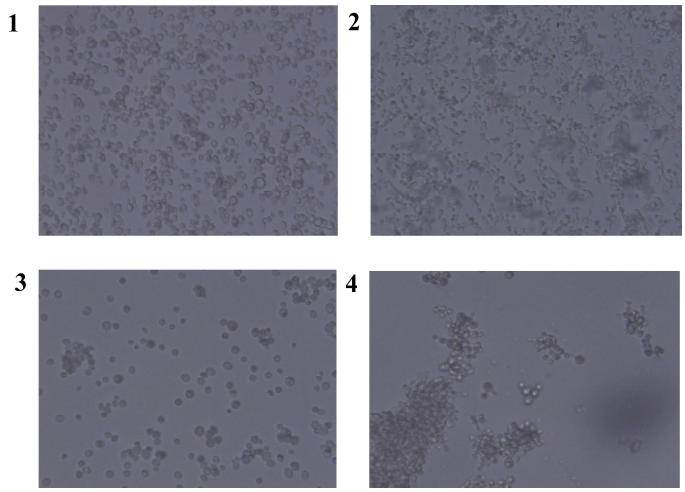

Рисунок 10. Микропрепараты дрожжей после культивирования на среде Сабуро с фуксином. Тип препарата − «раздавленная капля», увеличение 40x15: 1)C.kefyr, 2)T. Pullulans, 3)K. marxianus, 4)L. Scottii

Опыт показал, что у единичных клеток не выявлено изменения цвета при культивировании на среде с красителями. Таким образом, цвет колонии обусловлен массовым накоплением клеток.

При культивировании на среде Сабуро с добавлением красителя как метиленового синего, так и фуксина, в течение 7 суток цвет колоний C.kefyr, K. marxianus, L.scotti не меняется, а у колонии T.pullulans произошло разделение цвета колонии на 2 части – более темную и более светлую.

Анализируя данные и результаты проведенных опытов, приходим к выводу, что окрашивание колоний и изменение цвета среды при добавлении кислотно-щелочных индикаторов, происходит только в интервале pH, оптимальном для развития дрожжей, т.е. pH 4,5-6,5.

Наиболее важным признаком молочных дрожжей является их способность сбраживать молочный сахар. Выделенные нами из айрана дрожжи частично используют лактозу, и используют входящие в его состав моносахара: глюкозу и галактозу. Такие дрожжи способны проявлять деятельность в молоке только совместно с молочнокислыми бактериями, подготавливающими почву для их биохимической деятельности, гидролизуя лактозу [3,5].

С учетом трудностей определения номенклатуры дрожжей, в данной работе мы можем ограничиться указанием только наиболее важного их биохимического свойства: способность сбраживать молочный сахар.

Таким образом, выделенные штаммы дрожжей характеризуются как дрожжи, частично сбраживающие лактозу, сходные по морфологическим и биохимическим свойствам с Kluyveromyces marxianus.

Список литературы

1. Рябцева С.А., Виноградская С.Е., Панфилова А.А. Дрожжи в молочной отрасли: классификация, свойства, применение [Текст] // Молочная промышленность. 2013. №4. С 64-66.

2. Рябцева С.А., Анисимов Г.С., Скрипнюк А.А. Дрожжи в молочной промышленности: причина порчи, нормирование, определение [Текст] // Молочная промышленность. 2013. №5. С 67-68.

3. Королева, Н. С. Техническая микробиология цельномолочных продуктов [Текст] / Н. С. Королева – М.: Пищевая промышленность, 1975. 272 с.

4. Dixit, K. Biotherapeutic properties of probiotic yeast Saccharomyces species in fermented dairy food / K. Dixit, D.N. Gandhi // Accessed: April 16, 2010. Available from: URL: http://www.dairyscience.info/probiotics/105-biotherapeutic-probioticyeast.

5. Horst, F. Yeast molecular biology [Text] / F. Horst – Munich. University of Munich, 2005. 256 p.

6. Querol, A. Yeasts in Food and Beverages [Text] / A. Querol, G. Fleet // Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. 208 p.

7. Winde, J. H. Functional Genetics of Industrial Yeasts [Text] / J. H. de Winde - Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2003. 367 p.

References

1. Rjabceva S.A., Vinogradskaja S.E., Panfilova A.A. Drozhzhi v molochnoj otrasli: klassifikacija, svojstva, primenenie [Tekst] // Molochnaja promyshlennost'. 2013. №4. S 64-66. "(In Russian)"

2. Rjabceva S.A., Anisimov G.S., Skripnjuk A.A. Drozhzhi v molochnoj promyshlennosti: prichina porchi, normirovanie, opredelenie [Tekst] // Molochnaja promyshlennost'. 2013. №5. S 67-68. "(In Russian)"

3. Koroleva, N. S. Tehnicheskaja mikrobiologija cel'nomolochnyh produktov [Tekst] / N. S. Koroleva – M.: Pishhevaja promyshlennost', 1975. 272 s. "(In Russian)"

4. Dixit, K. Biotherapeutic properties of probiotic yeast Saccharomyces species in fermented dairy food / K. Dixit, D.N. Gandhi // Accessed: April 16, 2010. Available from: URL: http://www.dairyscience.info/probiotics/105-biotherapeutic-probioticyeast.

5. Horst, F. Yeast molecular biology [Text] / F. Horst – Munich. University of Munich, 2005. 256 p.

6. Querol, A. Yeasts in Food and Beverages [Text] / A. Querol, G. Fleet // Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. 208 p.

7. Winde, J. H. Functional Genetics of Industrial Yeasts [Text] / J. H. de Winde - Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2003. 367 p.