Ткаченко К. С., Волосянко О. В., Фоміна М. О.

УДК: 579.8

БІОРІЗНОМАНІТТЯ ДРІЖДЖІВ З ГУЦУЛЬСЬКИХ МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ ДОМАШНЬОГО ПРИГОТУВАННЯ, ІДЕНТИФІКОВАНИХ ЗА ФЕНОТИПОВИМИ ОЗНАКАМИ

К. С. ТКАЧЕНКО, аспірант*

О. В. ВОЛОСЯНКО, доктор ветеринарних наук, зав. відділу Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК

Національний університет біоресурсів і природокористування України

М. О. ФОМІНА, доктор біологічних наук, провідний науковий співробітник відділу фізіології промислових мікроорганізмів

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України

E-mail: m.fomina@ukr.net

<https://doi.org/10.31548/dopovidi2019.01.005>

Анотація. Дріжджі з молочних продуктів домашнього приготування на території України, особливо в Прикарпатському регіоні на Гуцульщині, є мало дослідженими. Метою роботи було вивчити різноманіття ізолюваних із традиційних гуцульських молочних продуктів дріжджів, ідентифікованих за фенотиповими ознаками. Дріжджові ізоляти з сметани та сичужного сиру були виділені в чисту культуру за допомогою методу серійних розведень з висівом на сусло-агарі. Визначення таксономічного положення проводили, ґрунтуючись на морфологічних, біохімічних та фізіологічних характеристиках дріжджів. Нами було виділено та ідентифіковано 23 ізоляти дріжджів, що належали до десяти видів восьми родів (*Candida*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*,

Kluveromyces, *Lipomyces*, *Pichia*, *Shwanniomyces* та *Torulaspora*). У цілому, в досліджених молочних продуктах найчисленнішими були представники родів *Kluveromyces*, *Debaryomyces* та *Torulaspora*. У сметані найчастіше трапляються типові для молочних продуктів дріжджі виду *K. marxianus* (33,3%), а в сири – *D. occidentalis* var. *occidentalis* (23,5%), що були нами вперше виділені з молочних продуктів. Дріжджові штами, ізолювані з мало вивчених традиційних гуцульських продуктів, можуть слугувати джерелом для пошуку біотехнологічно перспективних дріжджів з оздоровчими ефектами та продуцентів біологічно-активних речовин.

Ключові слова: дріжджі, молочні продукти, біорізноманіття

*Науковий керівник – доктор біологічних наук М. О. Фоміна

Ткаченко К. С., Волосянко О. В., Фоміна М. О.

Дріжджі є широко розповсюдженими в навколишньому середовищі і невід'ємними компонентами в багатоскладових екосистемах, у тому числі і в специфічних мікробіоценозах молочних продуктів. Широко дослідженими є молочнокислі бактерії, які є основними складовими молочних ферментованих продуктів, але щодо дріжджового складу таких продуктів така інформація обмежена, а для Прикарпатського регіону, особливо Гуцульщини – відсутня [9, 13]. Гуцульщина є унікальним місцем з особливою культурою та укладом життя, де високогірна місцевість завжди сприяла більшій географічній ізоляції. Це може суттєво відображатися на мікробіоті автентичних продуктів харчування домашнього приготування. Молочні продукти, у тому числі ферментовані, є широкоживаними і типовими для раціону населення. Рядом дослідників було показано значну користь на здоров'я та самопочуття людей, які регулярно вживають молочні продукти [1, 4]. В світі зростає інтерес до дріжджів з оздоровчими ефектами [13], джерелом яких можуть бути мало досліджені аутентичні молочні продукти на території України, особливо в Прикарпатському регіоні на Гуцульщині.

Дріжджі відносять до убіквітарних одноклітинних грибів, що широко розповсюджені в

навколишньому середовищі. Їх повсемісно виділяють з проб ґрунту, водного середовища, а також зависей повітря. Широко дріжджі використовуються і в біотехнологічних процесах [7, 11]. Дріжджі є хемоорганогетеротрофами і використовують органічні сполуки як для отримання енергії, так і як джерело вуглецю. Їм необхідний кисень для дихання, проте за його відсутності багато видів здатні отримувати енергію за рахунок бродіння з виділенням спиртів та діоксиду вуглецю, тобто вони є факультативними анаеробами [3]. Вже більше 60 років як було закладено золотий стандарт фенотипової ідентифікації дріжджів. Вікерманом (Wickerham) було укладено методи для визначення здатності до асиміляції та ферментації різних субстратів [12]. Асиміляція базується на здатності засвоювати визначений субстрат, як єдине джерело вуглецю чи азоту, а ферментація – здатність в анаеробних умовах зброджувати визначений субстрат з утворенням CO_2 . Як додаткові таксономічні ознаки визначають здатність рости за різних температур; рости в середовищі без вітамінів, галотолерантність та інші [7].

Частина видів чи груп видів дріжджів займає високоспеціалізований екотоп. Знання природного місця існування і особливостей екологічної ніші

Ткаченко К. С., Волосянко О. В., Фоміна М. О.

сприяє більш повному розумінню біології виду та його ролі в екосистемах, що може бути використано для направлено пошуку в природі дріжджів перспективних для практичного використання.

Метою роботи було вивчити біорізноманіття ізолюваних з традиційних гуцульських молочних продуктів дріжджів, ідентифікованих за фенотиповими ознаками.

Матеріали та методи. В дослідженні було використано 23 ізоляти дріжджів з молочних продуктів харчування – сметани та сичужного сиру, що є традиційними гуцульськими продуктами домашнього приготування, які (с. Білоберезка, Івано-Франківська область). Культури були виділені в 2013-2014 рр. за допомогою методу серійних розведень з висівом суспензії на сусло агарі (СА) [10]. Загальна кількість дріжджів нараховувала 10^2 КУО/г (сметана) та 10^7 КУО/г (сир).

Фенотипова ідентифікація. Для фенотипової ідентифікації дріжджів таксономічні ознаки поділяють на наступні групи: морфологічні, які описують окремі колонії та клітини, а також спосіб вегетативно розмноження; характеристики статевого процесу; фізіологічні ознаки, які характеризують тип харчування, ріст та енергетичний метаболізм; і біохімічні ознаки, які об'єднують особливості утворення

різноманітних метаболітів, ферментативну активність. Морфологія дріжджів була описана після 72 годин культивування за 32°C на СА з використанням світлової мікроскопії. Біохімічні характеристики включали в себе визначення здатності асимілювати наступні джерела вуглецю: глюкоза, сахароза, рафіноза, мелібіоза, галактоза, лактоза, трегалоза, мальтоза, меліцитоза, розчинний крохмаль, целобіолоза, саліцин, L-соброза, L-рамноза, D-ксилоза, D-арабіноза, L-арабіноза, етанол, гліцерол, еритрол, D-манітол, рибітол, DL-лактат, сукцинат, цитрат, D-глюконат, D-глюкозамін, N-ацетил-D-глюкозамін, інουλін, метил- α -D-глюкозид. За допомогою трубок Дунбара було визначено здатність дріжджів зброджувати глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, рафінозу та трегалозу [7].

Для індукування спороутворення, дріжджі попередньо були вирощені на сусло агарі (72 год за 32°C), з наступним висівом на ацетатне середовище та середовище Городкової (24, 72 та 120 год за 32°C) [3]. Також було визначено здатність рости при $37-42^{\circ}\text{C}$ на СА за стаціонарних умов. Ідентифікацію проводили за ключами визначника Курцман і Фел (2011 рік) та онлайн програми CBS - Грибне біорізноманіття (KNAW Fungal

Ткаченко К. С., Волосянко О. В., Фоміна М. О.
Biodiversity,
<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/>.

Результати та обговорення. В результаті проведеної роботи з використанням фенотипової ідентифікації нами було визначено таксономічну приналежність 23 дріжджів, що були виділені з молочних продуктів харчування – сметани (6 ізолятів) та сичужного сиру (17 ізолятів) (табл. 1). Було виявлено, що виділені дріжджі належать до родів *Candida*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Shwanniomyces* та *Torulaspora*. Найчисленнішими родами для досліджених молочних продуктів, в цілому, виявились представники *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* та *Torulaspora* (табл. 1, рис.1).

Для переважної більшості ізолятів (87%) було встановлено видову приналежність, і тільки три штами були ідентифіковані до роду (F7 – *Torulaspora* sp., F11 і F29 – *Candida* sp.). Хоча спільними для сметани та сиру були дріжджі родів *Kluyveromyces*, *Torulaspora* і *Galactomyces*, досліджені молочні продукти якісно та кількісно відрізнялись по видовому складу дріжджів (рис. 2). Види *K. marxianus* і *K. lactis* var. *lactis*, а також *G. geotrichum* зустрічались в обох молочних продуктах. Види *K. marxianus* (анаморфа *Candida kefir*) та *K. lactis* var. *lactis* (анаморфа *Candida sphaerica*) [7], і *G. geotrichum* є загальновідомими для молочних продуктів, особливо сирів.

1. Фенотипова ідентифікація дріжджів з молочних продуктів

Код штаму	Джерело виділення	Вид
F4, F6	Сметана	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
F5		<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>
F7		<i>Torulaspora</i> sp.
FF4		<i>Galactomyces geotrichum</i>
FF14		<i>Lipomyces mesembrius</i>
F11, F29	Сир	<i>Candida</i> sp.
F8, F12		<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>
F9, F10		<i>Kluyveromyces marxianus</i>
F26, F27, F28, F32		<i>Debaryomyces occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>
F30, F31, F36		<i>Torulospora delbrueckii</i>
F33		<i>Shwanniomyces vanrijiae</i> var. <i>yarrowii</i>
F35		<i>Pichia anomala</i>
F37, F38		<i>Galactomyces geotrichum</i>

Ткаченко К. С., Волосянко О. В., Фоміна М. О.

Вони є широко розповсюдженими та повсемірно виділяються з молочної продукції. Завдяки синтезу цілої низки метаболітів, вони приймають участь у створенні специфічного аромату та консистенції, що властиві молочній продукції. Також, рядом дослідників було встановлено і

позитивний ефект певних метаболітів, що синтезуються цими дріжджами, на макроорганізм [4, 8].

Видове різноманіття дріжджів, виділених зі сметани домашнього приготування, було меншим (6 штамів, 5 видів), ніж для сиру (17 штамів, 8 видів) (рис. 2).

Рис. 1. Кількість штамів виділених з молочних продуктів дріжджів, що належать до різних родів

Загалом кількість дріжджів у сметані не перевищувала 10^2 КУО/г, з яких 50% належала до типових представників молочної продукції – дріжджів роду *Kluyveromyces*, що, як відомо, здатні зброджувати лактозу та разом із молочнокислими бактеріями створювати особливу консистенцію та аромат властиві молочної продукції. Разом з

дріжджами роду *Kluyveromyces* та *G. geotrichum* в сметані були виявлені дріжджі *Torulaspora* sp. (1 штам). За даними інших авторів рід *Torulaspora* зустрічається в молочних продуктах. Також повідомлялося, що дріжджі роду *Torulaspora* виділялися з традиційного сиру домашнього приготування в Сербії та Хорватії [13].

Ткаченко К. С., Волосянко О. В., Фоміна М. О.

В сичужному сирі кількість дріжджів сягала 10^7 КУО/г. Більшість ізольованих з сиру дріжджів належали до виду *Debaryomyces occidentalis* var. *occidentalis* (4 штами, 23,5%). В літературі даний вид зустрічається під синонімічними назвами *Schwanniomyces occidentalis* або *S. castellii*. Також синонімічною є назва *S. ukrainicus*, з реферативним

посиланням на українських вчених (Нагорна, Квасніков і Щелокова), які в 1979р. виділили даний вид дріжджів з кореня та листків осики (*Populus tremula*) в Україні [6,7]. Слід відзначити, що в літературі немає даних про виділення дріжджів *D. occidentalis* var. *occidentalis* з молочних продуктів.

Рис. 2. Видове різноманіття дріжджів, ізольованих з гуцульських молочних продуктів домашнього приготування: (А) сметани, (Б) сичужного сиру. Відносна кількість видів показана у відсотках.

Друге місце за кількістю штамів в сирі належало виду *Torulospora*

delbrueckii (3 штами, 17,6%). Синонімічними назвами цього виду є

Ткаченко К. С., Волосянко О. В., Фоміна М. О. *Saccharomyces delbrueckii* або *S. rosei* (*S. roseus*), що представляють телеоморфну стадію, а *Candida colliculosa* є їх анаморфою [7]. В меншій кількості (по 2 штами, 11,8%) було виділено штами дріжджів видів *K. marxianus* і *K. lactis* var. *lactis*, *Candida* sp., а також виду *Galactomyces geotrichum*. *G. geotrichum* був ізольований й іншими дослідниками з різноманітних молочних продуктів (молоко, сир та ферментовані напої). Як і молочні дріжджі *Kluveromyces*, галактоміцети створюють особливий аромат і смак молочної продуктів. Продукція певних метаболітів посилює корисні властивості продукту, що робить їх потенційно важливими кандидатами для використання в біоіндустрії [4, 5, 13]. Присутність в сирі, який виробляється в домашніх умовах, убіквітарних дріжджів *Candida* sp. може бути прогнозованою. Найменш численними в сирі були види *Pichia anomala* та *Shwanniomyces vanrijae* var. *yarrowii* (по 1 штаму, 5,9%).

Більше видове різноманіття дріжджів, ізольованих з сичужного

сиру в порівнянні з сметаною може бути пов'язаним із особливостями приготування даного продукту, наприклад, термін приготування сиру є довготривалішим ніж сквашування сметани.

Висновки. Таким чином, в представленому дослідженні з гуцульської сметани та сичужного сиру домашнього приготування було виділено та ідентифіковано за фенотиповими ознаками 23 ізоляти дріжджів, що належали до десяти видів восьми родів (*Candida*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Kluveromyces*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Shwanniomyces* та *Torulaspora*). В сметані найчисленнішими були типові для молочних продуктів дріжджі виду *K. marxianus* (33,3%), а в сирі – вперше виділені нами з молочних продуктів дріжджі виду *D. occidentalis* var. *occidentalis* (23,5%). Клувероміцетні, галактоміцетні та дебаріоміцетні дріжджі, виявлені в традиційних гуцульських молочних продуктах, можуть бути перспективними для практичного використання.

References

1. Kvasnikov, E.V., Shchelokova I.F. (1991). Yeasts. Biology. Application. Kyiv, Ukraine.: Nauk. dumka, 328 p.
2. Bab`eva I.P., Chernov I.Yu. Geographical aspects of yeast ecology. (1995). Phisiol.Gen.Biol. Rev, 9, 3.

3. Bab`eva I.P., Golubev V.I. (1979). Methods of isolation and identification of yeasts. Moscow, Russia: «The food industry», 118p.

4. Diosma G., Romanin D.E., Rey-Burusco M.F., Londero A., Garrote G.L. (2014) Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and

Ткаченко К. С., Волосянко О. В., Фомина М. О. probiotic characterization. *World J Microbiol Biotechnol*, 30, 43–53.

5. Kumura H., Tanoue Y., Tsukahara M., Takana T., Shimazaki K. (2004). Screening of Dairy yeast strains for probiotic Applications. *J. Dairy Sci*, 87, 4050-4056.

6. Kurtzman C.P., Robnett C.J. (1991). Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast*, 7, 61-72.

7. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Amsterdam-Oxford: Elsevier, 1053.

8. Maccaferri S., Klinder A., Brigidi P., Cavina P., Costabile A. (2012). Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in CACO-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (4), 956-964. Mei J., Guo Q., Wu Y., Li Y. (2014). Microbial diversity of a

camembert-type cheese using freeze-dried tibetan kefir coculture as starter culture by culture-dependent and culture-independent methods. *PLOS ONE*, 9, 10.

9. Pincus, D. H., Orenge, S., Chatellier S. (2007). Yeast identification - past, present, and future methods. *Medical Mycology*, 45, 97-121.

10. Steensels J., Snoek T., Meersman E., Nicolino M.P., Voordeckers K., Verstrepen K.J. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS microbiol rev.* 38(5), 947–995.

11. Wickerham, L.J., Burton, K.A. (1948). Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *J Bacteriol*, 56 363-371.

12. Zivkovic M, Cadez N., Uroic K., Miljkovic M., Tolinacki M, Dousova P., Kos B., Suskovic Y., Raspor P., Topisirovic L., Golic N. (2010). Evaluation of probiotic potential of yeasts isolated from traditional cheeses manufactured in Serbia and Croatia. *J Intercult Ethnopharmacol*, 4(1), 12-18.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ ДРОЖЖЕЙ ИЗ ГУЦУЛЬСКИХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ДОМАШНЕГО ПРИГОТОВЛЕНИЯ, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ПО ФЕНОТИПИЧЕСКИМ ПРИЗНАКАМ

К. С. Ткаченко, О. В. Волосянко, М. А. Фомина

Аннотация. Дрожжи из молочных продуктов домашнего приготовления на территории Украины, особенно в Прикарпатском регионе на Гуцульщине, мало

изучены. Целью работы было изучить разнообразие изолированных из традиционных гуцульских молочных продуктов дрожжей, идентифицированных по фенотипическим признакам. Дрожжевые изоляты из сметаны и сычужного сыра были выделены в чистую культуру с помощью метода серийных разведений с высевом на сусло-агаре. Определение таксономического положения проводили, основываясь на морфологических, биохимических и

Ткаченко К. С., Волосянко О. В., Фоміна М. О.

физиологических характеристиках дрожжей. Нами было выделено и идентифицировано 23 изолята, принадлежащие к десяти видам восьми родов (*Candida*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Kluveromyces*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Shwanniomyces* и *Torulaspora*). В целом, в исследованных молочных продуктах самыми многочисленными были представители родов *Kluveromyces*, *Debaryomyces* и *Torulaspora*. В сметане чаще всего встречались типичные для молочных продуктов дрожжи вида *K. marxianus* (33,3%), а в сыре - *D. occidentalis* var. *occidentalis* (23,5%), которые были нами впервые выделены из молочных продуктов. Дрожжевые штаммы, изолированные из мало изученных традиционных гуцульских продуктов, могут служить источником для поиска биотехнологически перспективных дрожжей с оздоровительными эффектами и продуцентов биологически активных веществ.

Ключевые слова: дрожжи, молочные продукты, биоразнообразие

BIODIVERSITY OF YEASTS FROM HOME-MADE HUTSUL DAIRY PRODUCTS IDENTIFIED BY PHENOTYPICAL FEATURES

K. S. Tkachenko, O. V. Volosyanko, M. O. Fomina

Abstract. Yeasts from home-made dairy products on the territory of Ukraine, especially in the Hutsul region of the Carpathians, are very little studied. The aim of this work was to study the diversity of yeasts, isolated from traditional Hutsul dairy products,

identified by their phenotypical features. Yeast isolates from the sour cream and the rennet cheese were isolated in pure culture using the serial dilution method with subsequent culturing on the malt agar medium. The taxonomic position was determined based on the morphological, biochemical, and physiological characteristics of the yeasts. We isolated and identified 23 yeast cultures belonging to ten species of eight genera (*Candida*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Kluveromyces*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Shwanniomyces* and *Torulaspora*). In general, the representatives of the genera *Kluveromyces*, *Debaryomyces* and *Torulaspora* were the most abundant in the studied dairy products. Typical species for dairy products *K. marxianus* was the most common (33.3%) in sour cream, whereas the species *D. occidentalis* var. *occidentalis*, isolated by us for the first time from dairy products, was the most numerous in cheese (23.5%). Yeast strains isolated from the little studied traditional Hutsul products can serve as a source for the search for biotechnologically perspective yeasts with human wellness improving effects and producers of biologically active substances.

Keywords: yeast, dairy products, biodiversity