

УДК 663.12/14

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ДРІЖДЖОПОДІБНИХ ГРИБІВ

Р. Косів, Л. Паляниця, Н. Березовська

Національний університет "Львівська політехніка"
пл. с. Юра, 3/4, м. Львів 79013, Україна

Ізольовано та виділено чисті культури дріжджів із субстратів бродильних виробництв. Виявлено можливість ідентифікації дріжджоподібних грибів методом АРІ з використанням наборів ID 32 С. Доведено переваги цього методу серед інших.

Ключові слова: дріжджоподібні гриби, ідентифікація, бродильні виробництва.

Чисті культури дріжджів у виробництві продуктів харчування почали використовувати 1883 р., коли Еміл Крістіан Хансен уперше застосував ізольований штам пивоварних дріжджів для промислового одержання пива. Чиста культура – це потомство, одержане з однієї клітини, має такі переваги: за її участю субстрат зброджується глибше, не утворюються побічні продукти бродіння, які надають готовій продукції небажаних органолептичних властивостей.

Незважаючи на наявність багатьох природних захисних чинників і спеціальних технологічних заходів, не можна повністю уникнути інфікування виробничих субстратів бродильних виробництв сторонніми видами дріжджів (окреслених загальним терміном "дикі"), а також бактеріями та плісневими грибами. "Дикі" дріжджі становлять близько 40% загальної кількості інфікувань та можуть спричинити перешкоди в процесі бродіння.

У процесі виробництва продуктів бродіння були ізольовані дріжджі, які належать до різних родів: *Bretanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debariomyces*, *Dekkera*, *Endomyces*, *Filobasidium*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluuyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Torulopsis*, *Zygosaccharomyces* [1]. Не всі "дикі" дріжджі шкідливі для бродильних виробництв, проте їхня наявність у виробничих субстратах під час технологічних процесів є ознакою інфекції.

"Дикі" дріжджі можуть конкурувати з виробничими штамми, особливо тоді, коли фізіологічна активність виробничої культури занижена. З'ясовано, що сторонні дріжджі мають удвічі коротшу тривалість генерації; не здатні до флокуляції, що ускладнює процес їхнього видалення; можуть утворювати метаболіти, які негативно впливають на органолептичні властивості готових продуктів, порушуючи їхню біологічну рівновагу, знижують тривалість зберігання.

Деякі види родів *Bretanomyces* і *Candida* синтезують фенольні сполуки, кислоти й ефіри, негативно впливаючи на органолептичні якості готових продуктів, надаючи їм нетипового смаку овочів, дріжджів або фенолів, дуже неприємної гіркоти, поганого запаху оцту, а також терпкого та гіркокого смаку. Дикі дріжджі *Bretanomyces anomalus*, *Candida versatilis*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula glutinis* мають велику активність нітратної редуктази – ферменту, який каталізує відновлення нітратів до нітритів, що призводить до утворення нітрозамінів (наприклад, диметилнітрозаміну, діазометану), які належать до канцерогенних і мутагенних сполук та сполук ембріотоксичної дії.

З огляду на зазначене вище в бродильних виробництвах важливими є мікробіологічна чистота культур виробничих дріжджів і уникнення інфікування "дикими" дріжджами, що забезпечують мікробіологічним контролем сировини, напівпродуктів і готової

продукції, повітря, води та технологічного обладнання з подальшою ідентифікацією наявних там мікроорганізмів.

Традиційна ідентифікація дріжджів ґрунтується на морфологічних і фізіологічних характеристиках. Виконання близько 90 тестів є тривалим (до п'яти днів), трудомістким, а одержані результати не завжди уможливають однозначну класифікацію. Така тривалість визначення не дає змогу швидко реагувати на появу небажаних видів мікроорганізмів.

Значно зменшити тривалість кількісного аналізу вдалося завдяки застосуванню так званих швидких тестів, до яких належать епіфлюоресценція мікроорганізмів на фільтраційній мембрані (DEFT), флюоресцентне визначення мікроколонії на мембранному фільтрі (MMCF), біолюмінесценція (тести АТФ), методи лазерного сканування, електрометричні та мікрокалотиметричні методи [2].

Якісний аналіз – це визначення систематичної належності ізольованої чистої культури дріжджів, він значно складніший. Серед традиційних способів немає ідеального, який би уможлиблював виявлення “диких” дріжджів з популяції, що досягається одночасним виконанням кількох тестів. Високу чутливість і достовірність мають методи молекулярної біології, які ґрунтуються на аналізі генетичного матеріалу. До них належать гелевий електрофорез у пульсівному полі (PFGE), поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (RFLP), ланцюгова реакція полімерази (PCR), ампліфіковані поліморфічні ДНК (RAPD). Проте використовувані в цьому способі обладнання, фермент термостабільна ДНК-полімераза, стартери ланцюгової реакції дуже дорогі. Тому сьогодні ідентифікація дріжджів методами молекулярної біології має безумовно науковий інтерес, проте не може бути впроваджена у виробничих лабораторіях харчової промисловості.

Оптимальним за вартістю аналізу та його тривалістю й трудомісткістю є використання методу API, що ґрунтується на використанні наборів для ідентифікації мікроорганізмів ID фірми bioMérieux (Франція). Для ідентифікації дріжджоподібних грибів використовують стандартизовані набори ID 32 C, які містять 32 змініаюризовані асиміляційні тести та базу даних. За допомогою цієї системи можна ідентифікувати 62 види дріжджів родів *Candida*, *Cryptococcus*, *Debariomyces*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*, *Zygosaccharomyces*.

Мета роботи: ізолювання та виділення чистих культур дріжджоподібних грибів із субстратів бродильних виробництв, їхня ідентифікація з використанням наборів ID 32 C.

Ізолювання та виділення чистих культур дріжджів виконували чашковим методом з таких субстратів: 1) виноградний виноматеріал, 2) засівні пивні дріжджі; 3) засівні спиртові дріжджі; 4) хлібопекарські пресовані дріжджі; 5) сухі спиртові дріжджі. У результаті з кожного субстрату виділили по одній чистій культурі дріжджів, позначивши їх, відповідно, Д1-Д5.

Для ідентифікації використовували паски ID 32 C, що містять 32 заглиблення, у кожному з яких був відповідний збезводнений вуглеводний субстрат (табл. 1).

Приготування інокуляту полягало в розчиненні у 2 мл стандартного середовища Suspension Medium, що є в наборі, однієї чи кількох ідентичних колоній з молодої чистої культури дріжджів (24–48 год). Густина суспензії повинна відповідати 2 за шкалою McFarland'a, що досягали порівнянням з контролем, який також є в наборі. Після цього 250 мкл одержаної суспензії вносили в ампулу з середовищем C Medium, перемішували й використовували для висівання. У кожне заглиблення вносили по 135 μ л перемішаної суспензії. Паралельно готували суспензії інших чистих культур виділених дріжджів і висівали їх на інші паски. Висіви інкубували при 29°C впродовж 24–48 год. Після цього

Склад паска ID 32 С

Позначення ямки	Тести	Субстрати	Концентрація, мг/ямку
1.0	GAL	<i>D</i> -галактоза	0,70
1.1	ACT	Циклогексимід (актидіон)	0,014
1.2	SAC	<i>D</i> -сахароза	0,66
1.3	NAG	<i>N</i> -ацетилглюкозамін	0,64
1.4	LAT	Молочна кислота	0,64
1.5	ARA	<i>L</i> -арабіноза	0,70
1.6.	CEL	<i>D</i> -целобіоза	0,66
1.7	RAF	<i>D</i> -рафіноза	2,34
1.8	MAL	<i>D</i> -мальтоза	0,70
1.9	TRE	<i>D</i> -трегалоза	0,66
1.A	2KG	2-кетоглюконіан натрію	1,09
1.B	MDG	Метил- α <i>D</i> -глюкопіранозид	1,92
1.C	MAN	<i>D</i> -манітол	0,68
1.D	LAC	<i>D</i> -лактоза	0,70
1.E	INO	Інозитол	0,70
1.F	0	Нема субстрату	-
0.0	SOR	<i>D</i> -сорбітол	2,72
0.1	XYL	<i>D</i> -ксилоза	0,70
0.2	RIB	<i>D</i> -рибоза	0,70
0.3	GLY	Гліцерол	0,82
0.4	RHA	<i>L</i> -рамноза	0,68
0.5	PLE	Палатиноза	0,66
0.6	ERY	Еритритол	1,44
0.7	MEL	<i>D</i> -мелібіоза	0,66
0.8	GRT	Глюкуроніан натрію	0,76
0.9	MLZ	<i>D</i> -мелезитоза	0,66
0.A	GNT	Глюконіан натрію	0,92
0.B	LVT	Левулінова кислота	0,48
0.C	GLU	<i>D</i> -глюкоза	0,78
0.D	SBE	<i>L</i> -сорбоза	0,70
0.E	GLN	Глюкозамін	0,68
0.F	ESC	Ескуліна	0,28
		Цитриніан заліза	0,069

аналізували висіви так: спостерігали контроль у ямці (0); занотовували позитивний результат (наявність росту) там, де помутніння було більше, ніж у контролі; записували негативний результат (відсутність росту) там, де помутніння було меншим, ніж у контролі (табл. 2). Зчитувати результати також можна автоматично за допомогою апаратів АТВ Expression або API.

Інтерпретацію виконували, використовуючи комп'ютерну базу даних V 2.0, куди вносили одержані результати. Після опрацювання результатів програма видала найваж-

Таблиця 2

Результати висівання чистих культур дріжджів на паски ID 32 С

Позначення ямки	Тести	Результати висівів				
		Д1	Д2	Д3	Д4	Д5
1.0	GAL	+	+	+	+	+
1.1	ACT	-	-	-	-	-
1.2	SAC	+	+	+	+	+
1.3	NAG	-	-	-	-	-
1.4	LAT	+	-	+	+	+
1.5	ARA	-	-	-	-	-
1.6	CEL	-	-	-	-	-
1.7	RAF	+	+	+	+	+
1.8	MAL	+	+	+	+	+
1.9	TRE	-	-	+	+	-
1.A	2KG	-	-	-	-	-
1.B	MDG	-	+	+	+	+
1.C	MAN	-	-	-	-	-
1.D	LAC	-	-	-	-	-
1.E	INO	-	-	-	-	-
0.0	SOR	-	-	-	-	-
0.1	XYL	-	-	-	-	-
0.2	RIB	-	-	-	-	-
0.3	GLY	-	-	-	-	-
0.4	RHA	-	-	-	-	-
0.5	PLE	+	+	+	+	-
0.6	ERY	-	-	-	-	-
0.7	MEL	-	-	-	-	-
0.8	GRT	-	-	-	-	-
0.9	MLZ	+	-	+	+	-
0.A	GNT	-	-	-	-	-
0.B	LVT	-	-	-	-	-
0.C	GLU	+	+	+	+	+
0.D	SBE	-	-	-	-	-
0.E	GLN	-	-	-	-	-
0.F	ESC	-	-	-	-	-

лівіші таксони ідентифікованих дріжджів, імовірність належності до того чи іншого виду та запропонувала додаткові тести, якщо в цьому була потреба (табл. 3).

Після додаткових досліджень з'ясували, що всі чисті культури дріжджів, виділені з субстратів бродильних виробництв, належать до роду та виду *Saccharomyces cerevisiae*.

Отже, виявлено можливість ідентифікації дріжджоподібних грибів бродильних виробництв методом API з використанням наборів ID 32 С, що має такі переваги: аналіз є значно дешевшим, ніж у разі використання методів молекулярної біології; дає змогу зменшити трудомісткість і тривалість робіт порівняно з традиційними методами, оскільки немає потреби готувати асиміляційні субстрати, стерилізувати велику кількість посуду

Інтерпретація результатів ідентифікації дріжджів

Позначення культури дріжджів	Найважливіші таксони	Ймовірність, %	Додаткові тести	
			кількість	назва та ймовірність позитивного результату тесту
Д1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida colliculosa</i>	99,9 0,1	1 6	Мелезитоза (15 %) D-мальтоза (17 %) D-сорбітол (86 %) Мелезитоза (14 %) 2-Кетоглюконіан натрію (91%) Палатиноза (22 %) D-манітол (86 %)
Д2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida datilla</i>	99,9 0,1	0 4	D-трегалоза (100 %) гліцерол (86 %) D-сорбітол (100 %) Мелезитоза (83 %)
Д3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida datilla</i>	99,9 0,1	1 3	Мелезитоза (15 %) Молочна кислота (0 %) Гліцерол (86 %) D-сорбітол (100 %)
Д4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida datilla</i>	99,9 0,1	1 3	Мелезитоза (15 %) Молочна кислота (0 %) Гліцерол (86 %) D-сорбітол (100 %)
Д5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida colliculosa</i>	99,9 0,1	0 5	D-мальтоза (17 %) Метил- α D-глюкопіранозид (17 %) D-манітол (86 %) 2-Кетоглюконіан натрію (91%) D-сорбітол (86 %)

тощо. Проте цей метод можна використати для ідентифікації тільки тих дріжджів, які містяться в базі даних.

1. Deak T. Methods for the rapid detection and identification of yeasts in food // Trends Food Sci. Technol. 1995. N 6. P. 287–292.
2. Tuszyński T., Makarewicz M. Drozdze dzikie w przemyśle piwowarskim – zagrożenia i wybrane metody wykrywania // Żywność Technologia Jakość. 1998. N 3 (16). P. 43–57.

IDENTIFICACION OF YEASTS

R. Kosiv, L. Palianytsia, N. Beresovska

National University «Lvivska Polytechnika»

Sq. S. Yura, 3/4, 79013, Lviv, Ukraine

Pure culture s of the yeast are selected from substrates of fermentation's products. Possibility of yeast's identification by method API with set ID 32 C are installed. Advantages of this method among other are proved.

Стаття надійшла до редколегії 29.12.05

Прийнята до друку 12.04.06