

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ РОДА *SACCHAROMYCES* ИЗ КУМЫСА РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНОВ СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА

Г.С. Кургамбаева, Р.А. Ханнанов, О.А. Тен, Д.С. Балпанов

Филиал РГП «Национальный центр биотехнологии» в г. Степногорск, здание №21, 7 микрорайон, а/я 114, Степногорск, Акмолинская область, 021500, Казахстан
ipbncbrk@mail.ru

АБСТРАКТ

Кумыс – беловатый пенистый кисломолочный напиток, изготавливаемый из кобыльего молока. Свежий пенистый кумыс обладает приятным кисло-сладким освежающим вкусом и его еще называют «живым» из-за того, что длительному хранению он не подлежит, а приготовить его в промышленных масштабах практически невозможно.

В традиционной технологии кумыс представляет собой продукт естественного брожения (ферментирования) в процессе взаимного действия двух различных групп микроорганизмов: молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, являющихся продуцентами веществ, которые выполняют главную роль в определении качества продукта, а также дрожжей рода *Saccharomyces*, чье присутствие критично для придания органолептических свойств продукту.

Для выделения штаммов использовали образцы кумыса северных регионов Казахстана (Акмолинской и Кокчетавской областей). Из 10 образцов кумыса было выделено 42 изолята дрожжей, которые по культурально-морфологическим признакам были отнесены к роду *Saccharomyces*. После проведения идентификации по физиолого-биохимическим характеристикам 10 изолятов были идентифицированы как представители вида *Saccharomyces cerevisiae*. Молекулярно-генетический анализ на основе сопоставления последовательностей генов подтвердил морфолого-биохимическую классификацию выделенных изолятов и принадлежность к виду *Saccharomyces cerevisiae*.

Ключевые слова: кумыс, кобылье молоко, штамм, изолят, *Saccharomyces cerevisiae*, нуклеотидные последовательности.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ISOLATED FROM KOUMISS

G.S. Kurgambaeva, R.A. Khananov, O.A. Ten, D.S. Balpanov

The Branch of "National Center for Biotechnology", the MES in Stepnogorsk, microrayon # 7, building # 21, p/b 114, Akmola oblast, 021500, Kazakhstan
ipbncbrk@mail.ru

ABSTRACT

Koumiss – a whitish foamy sour-milk drink, made from fermented mare's milk. It has pleasant sweet-sour refreshing taste and it is also called "live" because of the fact that its long-term storage it is not applicable and it is impossible to produce it in industrial scale.

In the conventional technology koumiss represents a product of natural fermentation in the process of interaction of two different groups of microorganisms: lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus*, which are producers of substances that play the key role in quality of the product, and as well as yeasts of the genus *Saccharomyces*, which presence is critical for imparting organoleptic properties of the product.

To isolate strains there were used samples of koumiss from the northern regions of Kazakhstan (Akmola region).

Out of 10 samples of koumiss there had been obtained 42 isolates of yeasts, which were referred to the genus *Saccharomyces* according to the culture-morphological characteristics. After identification of physiological and biochemical characteristics the 10 isolates were identified as representatives of the *Saccharomyces cerevisiae* species. The molecular genetic analysis based on comparison of the gene sequences confirmed the morphological and biochemical classification of the isolates, and their affiliation to the *Saccharomyces cerevisiae* species.

Keywords: Koumiss, mare's milk, strain, isolate, *Saccharomyces cerevisiae*, the nucleotide sequences

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время, в связи с ростом стрессовых ситуаций и ухудшением экологической обстановки, пристальное внимание уделяется натуральным продуктам, оказывающим профилактический и лечебный эффект. Одним из таких продуктов является кумыс.

Впервые готовить кумыс начали кочевые племена Средней Азии и Монголии. Самые ранние найденные следы употребления кумыса соответствуют эпохе энеолита (5500 лет назад). В долине Сусамыр, среди прочих свидетельств приручения лошадей, были обнаружены кожаные сумки из козьих шкур со следами кобыльего молока, возможно, сброженного как кумыс. Кумыс – беловатый пенистый кисломолочный напиток, изготавливаемый из кобыльего молока. Свежий пенистый кумыс обладает приятным кисло-сладким освежающим вкусом и его еще называют «живым» из-за того, что длительному хранению он не подлежит, а приготовить его в промышленных масштабах практически невозможно.

В традиционной технологии кумыс представляет собой продукт естественного брожения (ферментирования) в процессе взаимного действия двух различных групп микроорганизмов: молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, являющихся продуцентами веществ, которые выполняют главную роль в определении качества продукта, а также дрожжей рода *Saccharomyces*, чье присутствие критично для придания органолептических свойств продукту [1-4].

Традиционно известно, что кумыс из различных регионов часто отличается по вкусовым и органолептическим качествам. Поэтому целью нашей работы было выделение специфических культур из образцов кумыса северных областей Казахстана. В предыдущей работе мы описали этапы работ по выделению молочнокислых культур рода *Lactobacillus* [5]. В данной статье приведены результаты работ по выделению дрожжевых культур из образцов кумыса северных регионов Казахстана (Акмолинской и Кокчетавской областей) [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследований являлись образцы кумыса, отобранного в Акмолинской области в поселке Азат, и в Северо-Казахстанской области в поселке Макинск, в разное время года, и изоляты дрожжей, выделенные из кумыса.

Чистые культуры выделяли методом, предложенным Р. Кохом [7]. Принцип метода заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии с помощью многократных пересевов на питательные среды Wort (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Mumbai-400086, India). Культуру выращивали при температуре $(29\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 2 суток.

Чистоту культур проверяли методом микроскопии и по отсутствию постороннего роста в жидкой питательной среде МПБ.

Выросшие колонии на питательной среде Wort отсеивали петлей в пробирки на поверхность скошенной плотной агаризованной среды Wort и культивировали при температуре $(29\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 2 суток.

Изучение свойств и идентификацию изолятов проводили с использованием стандартных приемов по методике, предложенной Бабьевой И.П. и Голубевым В.И. [8].

Физиолого-биохимические характеристики дрожжей исследовали на питательной среде следующего состава, г/л: пептон – 5,0; K_2HPO_4 – 1,0; добавили индикатор бромтимоловый синий из расчета 2 мл 1,6%-ного спиртового раствора на 1 л, доводим дистиллированной водой до 1 л, раствор сахаров в концентрации 10% – галактоза, лактоза,

DOI: 10.11134/btp.4.2014.7

мальтоза, раффиноза, сахароза, ксилоза, арабиноза, глюкоза, пентоза, крахмал. Среду засеивали суспензией клеток дрожжей и выдерживали в течение 96 часов при температуре $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$. Изменение цвета индикатора указывает на образование кислых или щелочных (вследствие разложения пептона) продуктов метаболизма. Результаты наблюдений сравнивали с показателями роста в контрольной среде, не содержащей испытуемого источника углерода [7]. В качестве контрольной использовали культуру *Saccharomyces cerevisiae* раса Лохвитская, полученную из коллекции промышленных микроорганизмов филиала РГП на ПХВ, г. Степногорск.

Идентификация 10 изолятов дрожжей была осуществлена методом определения прямой нуклеотидной последовательности ITS региона (межгенного транскрибируемого региона) с последующим определением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных GeneBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований из 6 образцов кумыса, отобранных в Акмолинской области в поселке Азат, было выделено 25 чистых изолятов дрожжей, а из 4 образцов, отобранных в Северо-Казахстанской области в поселке Макинск, выделено 17 чистых изолятов дрожжей.

При изучении микро- и макроморфологических свойства культуры на стандартной полноценной питательной среде Wort отмечен рост колоний размером 1-3 мм, выпуклых, округлых, белого цвета, с гладкой поверхностью, мягкой консистенции, с зернистой структурой (рисунок 1).

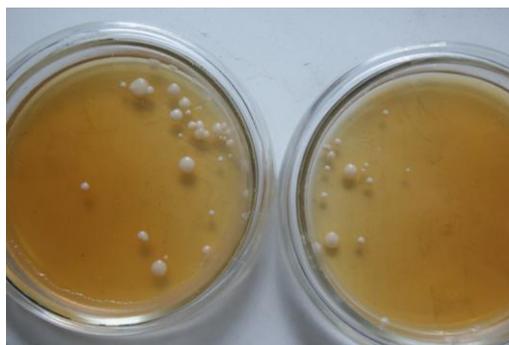


Рис. 1. Колонии дрожжевых культур на питательной среде Wort

Fig. 1. Colonies of yeast culture in a nutrient medium Wort

По культурально-морфологическим признакам выделенные 42 изолята были отнесены к роду *Saccharomyces*, согласно определителю [8]. При микроскопировании наблюдали неподвижные крупные клетки дрожжей, форма клеток округлая, овальная, яйцевидная или слегка удлиненная. Спор не образовывали (рисунок 2).

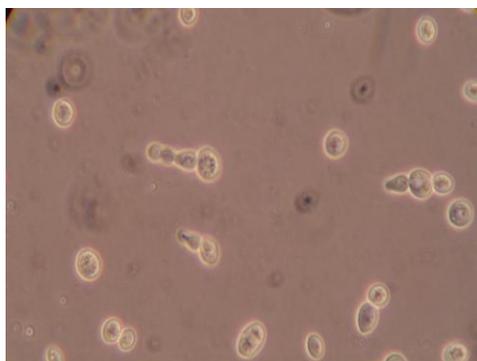


Рис. 2. Дрожжевые клетки культуры *Saccharomyces cerevisiae* (препарат «раздавленная капля», увеличение в 2050 раз)

Fig. 2. The culture of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* (preparation "crushed drop", an increase of 2050 times)

Клетки размером 5-6x10-14 мкм. Оптимальная температура роста (29±1)°С. Хорошо росли на питательной среде Wort. Грамположительные. Аэробы. На агаризованной среде образовывали выпуклые колонии с цельным краем, непрозрачные и непигментированные.

Идентификацию выделенных изолятов дрожжей проводили по физиолого-биохимическим характеристикам. В качестве контроля была выбрана культура *Saccharomyces cerevisiae* раса Лохвитская – продуцент этилового спирта (таблица 1, 2). Результаты оценивали визуально по изменению окраски питательной среды. Изменение цвета питательной среды происходило за счет сбраживания сахаров.

Таблица 1. Физиолого-биохимическая характеристика изолятов дрожжей рода *Saccharomyces*, выделенных из образцов кумыса п. Азат

Table 1. Physiological and biochemical characterization of isolates of the genus *Saccharomyces* yeasts isolated from koumiss samples of the village Azat

Сахара Sugars	Арабиноза Arabinose	Галактоза Galactose	Лактоза Lactose	Мальтоза Maltose	Глюкоза Glucose	Раффиноза Raffinose	Сахароза Saccharose	Пентоза Pentose	Ксилоза Xylose	Крахмал Starch
№ изолята isolate										
S-1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S-2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S-3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
S-4	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
S-5	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
S-6	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
S-7	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
S-8	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
S-9	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
S-10	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S-11	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
S-12	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S-13	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-14	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S-15	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
S-16	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
S-17	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
S-18	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
S-19	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
S-20	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
S-21	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S-22	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
S-23	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S-24	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-

S-25	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> раса Лохвитская (контр) <i>race Lohvitskaya (control)</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-

Как видно из данных таблицы 1, из 25 изолятов, выделенных из образцов кумыса, только 6 изолятов ферментируют глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, рафинозу, пентозу, ксилозу с образованием кислоты без газа, не сбразживали и не усваивали лактозу, крахмал, арабинозу и были идентифицированы, согласно определителю [8], как представители вида *Saccharomyces cerevisiae*.

Таблица 2. Физиолого-биохимическая характеристика изолятов дрожжей рода *Saccharomyces*, выделенных из образцов кумыса п. Макинск

Table 2. Physiological and biochemical characterization of isolates of the genus *Saccharomyces* yeasts isolated from koumiss samples of the village Makinsk

Сахара Sugars	Арабиноза Arabinose	Галактоза Galactose	Лактоза Lactose	Мальтоза Maltose	Глюкоза Glucose	Рафиноза Raffinose	Сахароза Saccharose	Пентоза Pentose	Ксилоза Xylose	Крахмал Starch
№ изолята isolate										
S-26	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
S-27	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S-27	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
S-29	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
S-30	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S-31	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S-32	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
S-33	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
S-34	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S-35	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
S-36	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
S-37	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
S-38	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-39	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S-40	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
S-41	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-

S-42	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> раса Лохвитская (контр) <i>race</i> <i>Lohvitskaya</i> (control)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-

Как видно из данных таблицы 2, из 17 изолятов, выделенных из образцов кумыса, только 4 изолята ферментируют глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, рафинозу, пентозу, ксилозу с образованием кислоты без газа, не сбразживали и не усваивали лактозу, крахмал, арабинозу и были идентифицированы, согласно определителю [8], как представители вида *Saccharomyces cerevisiae*.

В результате проведенных исследований из 42 изолятов, выделенных из образцов кумыса, отобранных в разных регионах Северного Казахстана по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам, 10 изолятов идентифицированы как представители вида *Saccharomyces cerevisiae*.

В дальнейшем было проведено молекулярно-генетическое подтверждение видовой принадлежности. Нуклеотидные последовательности межгенного пространства ITS1 гена 5,8S рРНК и межгенного пространства ITS2 10 идентифицируемых штаммов были проанализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems). После чего были удалены концевые фрагменты (нуклеотидные последовательности праймеров, фрагменты, имеющие низкий показатель качества), что позволило нам получить нуклеотидную последовательность протяженностью 730 п.н., которые были идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST. Нуклеотидные последовательности и результаты идентификации представлены в таблице 3.

Таблица 3. Суммарные результаты идентификации 10 штаммов по межгенному пространству ITS1 гена 5,8S рРНК и межгенному пространству ITS2

Table 3. Summary results of identification of 10 strains on the intergenic space ITS1 gene 5,8S rRNA and intergenic space and ITS2

№ п/н IN	Наименование Name	Результат идентификации The result of identification	Процент идентичности (%) Percent of identity (%)
1	S5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
2	S9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
3	S2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
4	S8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
5	S1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100

6	S3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
7	S6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
8	S4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
9	S10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98
10	S7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99

При идентификации в GeneBank нуклеотидные последовательности ITS1, 5,8S рРНК, ITS2 штаммов имели максимальную идентичность с *Saccharomyces cerevisiae*.

На основании полученных нуклеотидных последовательностей ITS1, 5,8S рРНК, ITS2 было построено филогенетическое дерево, представленное на рисунке 3.

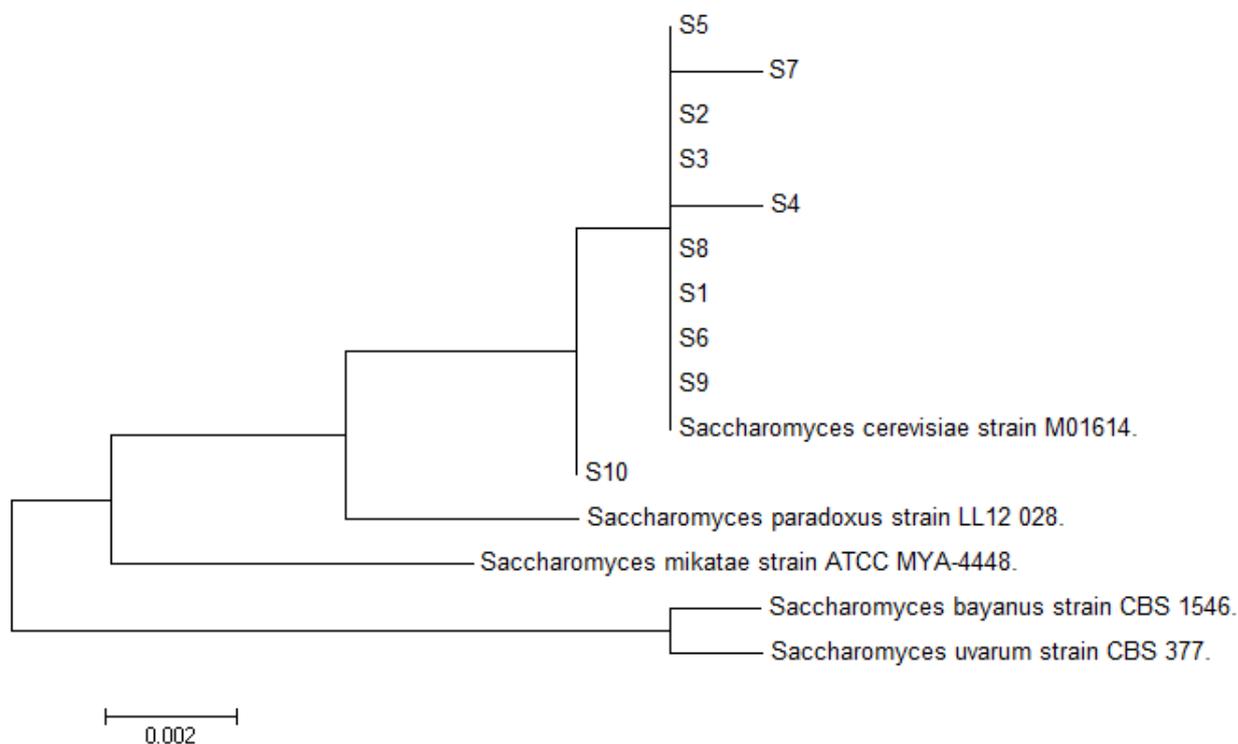


Рис. 3. Филогенетическое дерево выделенных штаммов на основании сравнения нуклеотидных последовательностей ITS1, 5,8S рРНК, ITS2

Fig. 3. Phylogenetic tree of isolated strains on the basis of comparison of the nucleotide sequences of ITS1, 5,8S rRNA, ITS2

Как видно из рисунка 3, выделенные из кумыса штаммы дрожжей располагаются на одной ветви со штаммом *Saccharomyces cerevisiae* M01614.

ВЫВОДЫ

В ходе проведенных исследований из образцов кумыса разных регионов Северного Казахстана было выделено 10 штаммов дрожжей, которые по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим характеристикам были отнесены к виду *Saccharomyces cerevisiae*. Молекулярно-генетический анализ на основе сопоставления

последовательностей генов подтвердил морфолого-биохимическую классификацию выделенных штаммов и принадлежность к виду *Saccharomyces cerevisiae*.

Финансирование

Работа проводилась по межгосударственной целевой программе ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» на 2012-2014 год по теме: 02.11 «Разработка технологии производства закваски прямого внесения для получения кумыса».

ЛИТЕРАТУРА

1. Montanari G, Zambonelli C., Grazia L., Kamesheva G.K., Shigaeva M.K.H. *Saccharomyces unisporus* as the principal alcoholic fermentation microorganism of traditional koumiss // *Journal of Dairy Research*. – 1996. – №63. – P. 327-331.

2. Narvhus J.A., Gadaga T.H. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review // *International Journal of Food Microbiology*. – 2003. – №86. – P. 51-60.

3. Obodai M., Dodd C.E.R. Characterisation of dominant microbiota of a Ghanaian fermented milk product, Nyarmie, by culture and nonculture-based method // *Journal of Applied Microbiology*. – 2006. – №100. – P. 1355-1363.

4. Gadaga T.H., Mutukumira A.N., Narvhus J.A., Feresu S.B. A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe // *International Journal of Food Microbiology*. – 1999. – №53. – P. 1-11.

5. Ермолаева А.Н., Алгожина У.Ж., Тен О.А., Балпанов Д.С. Изучение культур молочнокислых микроорганизмов, выделенных из кумыса различных регионов Северного Казахстана // *Биотехнология. Теория и практика*. – 2012. – №3. – С. 87-90.

6. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей // Товарищество научных изданий КМК. – М., 2004. – 221 с.

7. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

8. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. – М.: Изд-во «Пищевая промышленность», 1979. – 120 с.

REFERENCES

1. Montanari G, Zambonelli C., Grazia L., Kamesheva G.K., Shigaeva M.K.H. *Saccharomyces unisporus* as the principal alcoholic fermentation microorganism of traditional koumiss. *Journal of Dairy Research*, 1996, no. 63, pp. 327-331. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029900031836>.

2. Narvhus J.A., Gadaga T.H. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, no. 86, pp. 1-60. PMID: 12892921. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00247-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00247-2).

3. Obodai M., Dodd C.E.R. Characterisation of dominant microbiota of a Ghanaian fermented milk product, Nyarmie, by culture and nonculture-based method. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, no. 100, pp. 1355-1363. PMID: 16696684.

4. Gadaga T.H., Mutukumira A.N., Narvhus J.A., Feresu S.B. A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, no. 53, pp. 1-11. PMID: 10598109.

5. Ermolaeva A.N., Algozhina U.ZH., Ten O.A., Balpanov D.S. Izuchenie kultur molochnokislykh mikroorganizmov, vydelennykh iz kumysa razlichnykh regionov Severnogo Kazakhstana [The study of cultures of lactic acid microorganisms isolated from koumiss from different regions of Northern Kazakhstan]. *Biotehnologiya. Teoriya i praktika – Biotechnology. Theory and practice*, 2012, no. 3, pp. 87-90. DOI:<http://dx.doi.org/10.11134/btp.3.2012.11>.

6. Babeva I.P., Chernov I.Y. *Biologiya drozhzhej* [Biology of yeasts]. Moscow, Partnership scientific publications KMC. Publ., 2004, 221 p.

7. Netrusov A.I., Egorov M.A. Zakharchuk L.M. *Praktikum po mikrobiologii* [Workshop on Microbiology]. Moscow, Center Academy Publ., 2005, 608 p.

8. Babeva I.P., Golubev V.I. *Metody vydeleniya i identifikatsii drozhzhej* [Methods of isolation and identification of yeasts]. Moscow, Food Industry Publ., 1979, 120 p.

ТҮЙІН

ТҮЙІН

Қымыз – бие сүтінен жасалатын, ақшылтым, көпіршікті сүтқышқылды сусын. Балғын көпіршікті қымыз қышқыл да тәтті, сергітетін дәмге ие және ол ұзақ уақыт сақтауға жарамайтындықтан, өндірістік деңгейде дайындау іс жүзінде мүмкін болмағандықтан, оны «жанды» деп те атайды.

Дәстүрлі технологияда қымыз екі түрлі микроорганизмдер тобының: өнімнің сапасын анықтауда басты рөл атқаратын, заттектердің продуценттері болып табылатын, *Lactobacillus* түріндегі сүтқышқылды бактериялардың, сондай-ақ өнімге органолептикалық қасиеттер беретін *Saccharomyces* түріндегі ашытқылардың өзара әрекеттесу процесінде табиғи ашу (ферменттелу) өнімі болып саналады.

Әртүрлі аймақтардан алынған қымыз түрлерінің бір-бірінен дәмдік және органолептикалық қасиеттері бойынша ерекшеленетіні белгілі. Жұмыстың мақсаты Қазақстанның солтүстік облыстарындағы қымыз түрлерінен *Saccharomyces cerevisiae* өсірінді штаммдарын бөліп алу және анықтау болып табылады.

Штаммдар бөліп алу үшін Қазақстанның солтүстік өңірлерінің (Ақмола және Көкшетау облыстары) қымыз үлгілері пайдаланылды.

Қымыздың 10 үлгісінен өсірінділік-морфологиялық белгілері бойынша *Saccharomyces* тобына жатқызылған, ашытқылардың 42 изоляты бөлініп алынды. 10 изоляттың физиологиялық-биохимиялық сипаттамасы бойынша сәйкестендіру жүргізгеннен кейін олар *Saccharomyces cerevisiae* түрінің өкілдері ретінде анықталды. Гендер жүйеліліктерін салыстыру негізінде жүргізілген молекулалық-генетикалық талдау бөлініп алынған изоляттардың морфологиялық-биохимиялық жіктелуін және *Saccharomyces cerevisiae* түріне жататынын растады.

Негізгі сөздер: қымыз, биенің сүті, штамм, изолят, *Saccharomyces cerevisiae*, нуклеотидті жүйеліліктер.