

А.А. Сартаева<sup>1</sup>, З. Оразаева<sup>1</sup>, Э.М. Иманова<sup>1</sup>, Э.А. Кырбасова<sup>1\*</sup>,  
М.Х. Парманбекова<sup>1</sup>, Р.Ж. Бержанова<sup>2</sup>, Г.У. Байташева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казахский национальный женский педагогический университет, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: e.kyrbasova@gmail.com

## МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛАКТОЗОСБРАЖИВАЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ СМЕШАННОГО БРОЖЕНИЯ

Известно, что длительное хранение культур с помощью периодических пересевов не всегда обеспечивает стабильность морфолого-культуральных и физиологических признаков. В связи с этим встает вопрос о необходимости изучения диапазона изменчивости отдельных признаков и влияния внешней среды на свойства гетерогенности коллекционных культур и изучения их морфологических свойств, мы сочли целесообразным вновь вернуться к изучению основных таксономически значимых фенотипических признаков этих дрожжей. В результате отмечено, что культура *Candida sphaerica* KM95 не проявляет естественную изменчивость, которая выражалась бы в макроморфологической гетерогенности популяции: почти все колонии имели аналогичные характеристики. У культуры *Candida kefir var. kumis* 17 при расसेве на плотную среду наблюдается заметная вариабельность по ряду морфологических признаков. Так, популяционный состав представлен несколькими типами колоний, отличающихся друг от друга по размеру, цвету, форме, структуре и т.п. В поисках культур, интенсивно сбраживающих лактозу, было испытано 25 штаммов дрожжей, выделенных из шубата и отнесенных к роду *Candida*. В результате сравнительного изучения ферментативной активности, путем исследования способности разных штаммов сбраживать лактозу, выявлены наиболее активные из них – *C. sphaerica* 1М и *C. sphaerica* 3М. По нашим наблюдениям исследуемые культуры способны ферментировать мальтозу после их длительного выращивания на сусло-агаре, однако, при этом теряется способность к росту на среде с лактозой.

**Ключевые слова:** лактозосбраживающие дрожжи, морфо-физиологические свойства, брожения, колония дрожжей, микрофлора кумыса.

A.A. Sartayeva<sup>1</sup>, Z. Orazayeva<sup>1</sup>, E.M. Imanova<sup>1</sup>, E.A. Kyrbasova<sup>1\*</sup>,  
M.Kh. Parmanbekova<sup>1</sup>, R.Zh. Berzhanova<sup>2</sup>, G. Baitasheva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazakh National Women's Pedagogical University, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: e.kyrbasova@gmail.com

### Morpho-physiological features of lactose-fermenting yeast isolated from fermented milk products of mixed fermentation

It is known that long-term storage of cultures with the help of periodic reseeded does not always ensure the stability of morphological, cultural and physiological characteristics. In this regard, the question arises of the need to study the range of variability of individual characters and the influence of the environment on the heterogeneity properties of collection cultures and study their morphophysiological properties. We considered it appropriate to return to the study of the main taxonomically significant phenotypic characters of these yeasts. As a result, it was noted that the culture of *Candida sphaerica* KM95 does not show natural variability, which would be expressed in the macromorphological heterogeneity of the population: almost all colonies had similar characteristics. The culture of *Candida kefir var. kumis* 17 when sieving on a dense medium, a noticeable variability is observed in a number of morphological features. Thus, the population composition is represented by several types of colonies that differ from each other in size, color, shape, structure, etc. In search of cultures that ferment lactose intensively, 25 yeast strains isolated from shubat and assigned to the genus *Candida* were tested. As a result of a comparative study of enzymatic activity, by examining the ability of different strains to ferment lactose, the most active of them were identified – *C. sphaerica* 1M and *C. sphaerica* 3M. According to our obser-

vations, the studied cultures are able to ferment maltose after their long-term cultivation on wort agar, however, the ability to grow on a medium with lactose is lost.

**Key words:** lactose-fermenting yeast, morphological and physiological properties, fermentation, yeast colony, koumiss microflora.

А.А. Сартаева<sup>1,3</sup>, О. Оразаева<sup>1</sup>, Э.М. Иманова<sup>1</sup>, Э. А. Кырбасова<sup>1\*</sup>,  
М.Х. Парманбекова<sup>1</sup>, Р.Ж. Бержанова<sup>2</sup>, Г.У. Байташева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Қазақ ұлттық қыздар педагогикалық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: e.kyrbasova@gmail.com

### Аралас сүт қышқыл өнімдерінен бөлініп алынған лактозаны ашытатын ашытқылардың морфо-физиологиялық ерекшеліктері

Мерзімді қайта егу арқылы культураларды ұзақ сақтау морфологиялық, культуралық және физиологиялық сипаттамалардың тұрақтылығын қамтамасыз ете бермейтіні белгілі. Осыған байланысты жеке белгілердің өзгергіштік ауқымын және коллекциялық дақылдардың гетерогенді қасиеттеріне қоршаған ортаның әсерін және олардың морфо-физиологиялық қасиеттерін зерттеу қажеттілігі туралы сұрақ туындайды. Сондықтан да, біз осы ашытқылардың негізгі таксономиялық маңызды фенотиптік белгілерін зерттеуге қайта оралғанды жөн деп санадық. Нәтижесінде *Candida sphaerica* KM95 культурасы популяцияның макроморфологиялық гетерогенділігінде көрінетін табиғи өзгергіштік көрсетпейтіні байқалды: барлық дерлік колониялар бір –біріне ұқсас болды. *Candida kefir var. kumis* 17 қатты қоректік ортада өсіргенде бірқатар морфологиялық белгілерде айтарлықтай өзгергіштік байқалды. Сонымен популяция құрамы бір-бірінен көлемі, түсі, пішіні, құрылымы және т.б. бойынша ерекшеленетін колониялардың бірнеше түрлерімен ұсынылған. Лактозаны қарқынды ашытатын культураларды іздеу барысында шұбаттан бөлініп алынған ашытқылардың 25 штаммы зерттеліп, *Candida* тұқымдасына жатқызылған. Ашытқылардың ферменттік белсенділігін салыстырмалы түрде зерттеу барысында, лактозаны ашытатын ашытқылардың ең белсенді штаммдары – *C. sphaerica* 1M және *C. sphaerica* 3M екені анықталды. Біздің бақылауларымыз бойынша, зерттелген культуралар сусло агар қоректік ортасында ұзақ өсіргеннен кейін мальтозаны ашытуға қабілетті, алайда лактозасы бар ортада өсу қабілеті жоғалады.

**Түйін сөздер:** лактозаны ашытатын ашытқылар, морфологиялық және физиологиялық қасиеттері, ашыту, ашытқы колониясы, қымыз микрофлорасы.

### Введение

Важные для биотехнологии признаки некоторых видов дрожжей *Kluyveromyces* (синоним *Zygofabospora*) привлекают большое внимание исследователей [1]. Имеются ряд работ по молекулярной биологии, генетике и их систематике [2-6]. Однако использование генофонда этих дрожжей в генетических и прикладных разработках затрудняется тем, что их существующая классификация формальна. Исходя из специфики биологических свойств, подходы к систематике дрожжей отличаются как от систематики бактерий, так и от систематики мицелиальных грибов. Специальные руководства по их идентификации периодически подвергаются новой интерпретации в связи с разработкой современных подходов [7, 8]. Претерпела изменения и систематика лактозосбраживающих дрожжей. Например, дрожжи, выделенные из кисломолочных продуктов, были отнесены первоначально к *Torulopsis kefir* (Beijerinck) (Lodder, 1934); затем

к *Candida kefir* (Beijerinck) van Uden et Buckley (Lodder, 1970). Разделение двух родов несовершенных дрожжей *Torulopsis* и *Candida* было основано на наличии псевдомицелия у видов рода *Candida* и отсутствии такового у *Torulopsis*. Однако в настоящее время такое разграничение упразднено из-за значительной изменчивости признака. Был проведен цифровой таксономический анализ фенотипических характеристик 147 несовершенных видов дрожжей [9]. Отсутствие оснований таксономического разделения между родами *Candida* и *Torulopsis* сделало возможным слияние этих родов. В результате, ранее разграничиваемые роды *Candida* и *Torulopsis* было предложено объединить.

В настоящее время некоторые виды лактозосбраживающих дрожжей считаются как анаморфами, так и синонимами рода *Kluyveromyces* [10, 11]. Кудрявцев В.И. выделил несколько видов дрожжей в самостоятельные роды *Zygofabospora* и *Fabospora*, позже, J. P. van der Walt пришел к выводу, что эти роды представ-

ляют собой один и тот же таксон: *Kluveromyces van der Walt*. Однако, по мнению Наумова Г.И., оригинальные описания родов *Kuuyveromyces* и *Zygofabospora* (*Fabospora*) не перекрываются и охватывают совершенно различные дрожжи [12]. Дрожжи являются наиболее эффективными микроорганизмами в производстве этанола [13]. Однако не все виды обладают хорошей лактазной активностью, а некоторые неспособны расщеплять лактозу и напрямую ферментировать свежее молоко для производства этанола. Для этого важно выделить дрожжи, способные сбраживать лактозу и впоследствии производить спирт. Это исследование было направлено на то, чтобы выделить и идентифицировать дрожжи из кефира и охарактеризовать их способность в качестве отдельных заквасок для производства кефира. На основании морфологических и физиологических оценок получено 15 предположительных изолятов дрожжей, 10 из которых хорошо росли на лактозосодержащих средах. Молекулярная идентификация подтвердила, что четыре изолята, принадлежат *Kluveromyces marxianus* [14]. Авторы провели молекулярно-генетическое исследование дрожжей *Kluveromyces lactis*, выделенных из различных молочных продуктов в странах постсоветского пространства и других регионах лактозы. Полученные результаты показали, что межштаммовая гибридизация молочных дрожжей *K.lactis* является эффективным методом создания новых штаммов с высокой ферментативной способностью. Выделенные дрожжи с наиболее высокой способностью ферментировать лактозу представляют интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных программ [15, 16]. Авторы обращали внимание на видовой состав молочнокислых бактерий и дрожжей из шубата в разных регионах Казахстана: Алматы, Кызылорда, Шымкент и Атырауская область. Показано, что видовой состав и обилие каждого вида зависит от климатических условий [17].

### Материалы и методы исследования

В работе использовались следующие коллекционные и свежесделанные культуры лактозосбраживающих дрожжей из коллекции НИИ микробиологии и вирусологии МОН РК и кафедры биотехнологии КазНУ им. Аль-Фараби: *Candida (Torulopsis) kefir var. kumis* штамм 17, выделенная из кумыса Алматинской области, Карасайского района. *Candida (Torulopsis) sphaerica*

штамм *KM-95*, выделенная из кумыса Алматинской обл. Кегенского района. *Candida sphaerica* штамм 1М и *Candida sphaerica* штамм 3М, выделенные из шубата Алматинской области, с. Мынбаева.

При изучении культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков культуры использовались стандартные методы культивирования [18].

### Результаты исследования и их обсуждение

Ранее из микрофлоры кумыса, производимого в Казахстане, была выделена культура *Torulopsis kefir var. kumis* штамм 17, которая отличалась от других по скорости и уровню брожения и была рекомендована для использования в составе кумысных заквасок [19]. Дрожжи имели овальную форму клеток размером (2,2-4,7) x (2,6-5,2) мкм. Размножались почкованием. Псевдомицелий не образовывали. На сусло-агаре, сывороточном агаре формировали колонии белого цвета, выпуклые, края ровные, с наростом в середине, поверхность морщинистая. Штрих культуры желтовато-белый, гладкий, блестящий. В жидкой среде образовывали осадок. Максимальная температура роста – 45°C. Дрожжи хорошо развивались при pH 5-8, слабо при pH10. Оказались устойчивы к повышению концентрации поваренной соли: развивались при 2-5% NaCl, при введении 7, 8 и 9% соли рост дрожжей задерживался, а при 10% совсем прекращался. Медленно разжижали желатину, слабо усваивали нитрат калия. В качестве источника углерода использовали лактозу, сахарозу, меньше галактозу. Образовывали 1,5-3,3 об. % спирта на молоке. Предельная кислотность 55°Т. Из углеводов сбраживали глюкозу, сахарозу, лактозу, слабо сбраживали раффинозу, не сбраживали арабинозу. Выделенная культура, по ранее существовавшим определителям, была отнесена к *Torulopsis kefir*, но отличалась способностью сбраживать мальтозу, ассимилировать нитрат калия, большей устойчивостью к NaCl. Поэтому авторы сочли возможным считать его новой разновидностью данного вида и определили, как *T.kefir var. kumis* 17. В результате изучения микрофлоры кумыса из различных областей Казахстана была выделена культура *Torulopsis sphaerica KM-95*. Изначальное ее описание: в жидком сусле через три дня при 25°C образуется тонкая слизистая пленка и осадок. Клетки от сферической до овальной формы размерами (2,7-5,6) x (3,2-7,8) мкм. Размножаются почкова-

нием. Через 7-10 суток при 25°C на сусло- глюкозном агаре колонии серовато-жемчужного цвета, круглые, выпуклые с ровным краем, поверхность гладкая, блестящая. Штрих культуры серовато-белый, гладкий, блестящий, край ровный. При росте на стекле с кукурузным агаром псевдомицелий не образует. Сбраживает глюкозу, галактозу, сахарозу, лактозу, 1/3 раффинозы; не сбраживает мальтозу. Ассимилирует глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу и лактозу; на этиловом спирте и молочной кислоте наблюдается довольно хороший рост, нитрат калия не усваивает. Оптимальная температура роста 37°C, максимальная 42°C. Устойчив к повышению концентрации поваренной соли: при 5-7% поваренной соли рост хороший, при 8-9% – рост задерживается, при 10% -полностью прекращается. Отмечен рост на среде с содержанием глюкозы. При росте на стекле с кукурузным агаром псевдомицелий не образует. Сбраживает глюкозу, галактозу, сахарозу, лактозу, 1/3 раффинозы; не сбраживает мальтозу. Ассимилирует глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу и лактозу; на этиловом спирте и молочной кислоте наблюдается довольно хороший рост, нитрат калия не усваивает. Оптимальная температура роста 37°C, максимальная 42°C. Устойчив к повышению концентрации поваренной соли: при 5-7% поваренной соли рост хороший, при 8-9% – рост задерживается, при 10% -полностью прекращается. Отмечен рост на среде с содержанием глюкозы. Предварительно был произведен рассев суспензий клеток на агаризованную среду. Количество полученных морфологических вариантов учитывали через 3-7 суток инкубирования при температуре 35-37°C. В результате отмечено, что культура *Candida sphaerica KM95* не проявляет естественную изменчивость, которая выражалась бы в макроморфологической гетерогенности популяции: почти все колонии имели аналогичные характеристики. У культуры *Candida kefir var. kumis* 17 при расसेве на плотную среду наблюдается заметная вариабельность по ряду морфологических признаков. Так, популяционный состав представлен несколькими типами колоний, отличающихся друг от друга по размеру, цвету, форме, структуре и т.п.

На 3 сутки роста из общего числа выросших колоний (около 2000) было получено 6 морфологических типов:

I морфотип – колонии диаметром 8-10 мм, круглые, слегка выпуклые, края волнистые, рельеф исчерченный, присутствуют сектора, кре-

мового цвета. Количество колоний данного морфотипа в популяции составило 52,8%.

II морфотип – колонии неправильной формы, выпуклые, с звездчатыми краями, гладкие, блестят, светло-кремового цвета. Частота возникновения таких колоний составила 28,3%.

III морфотип – колонии круглые диаметром 10 мм, с выпуклым соском в центре, зубчатыми краями, гладкие, блестят, светло-кремового цвета. Выявлено 7,4% таких колоний.

IV морфотип – колонии круглые диаметром 15 мм, сильно выпуклые с фестончатыми, слегка волнистыми краями, с кольцами по периферии, гладкие, блестят. Частота появления – 6,5%.

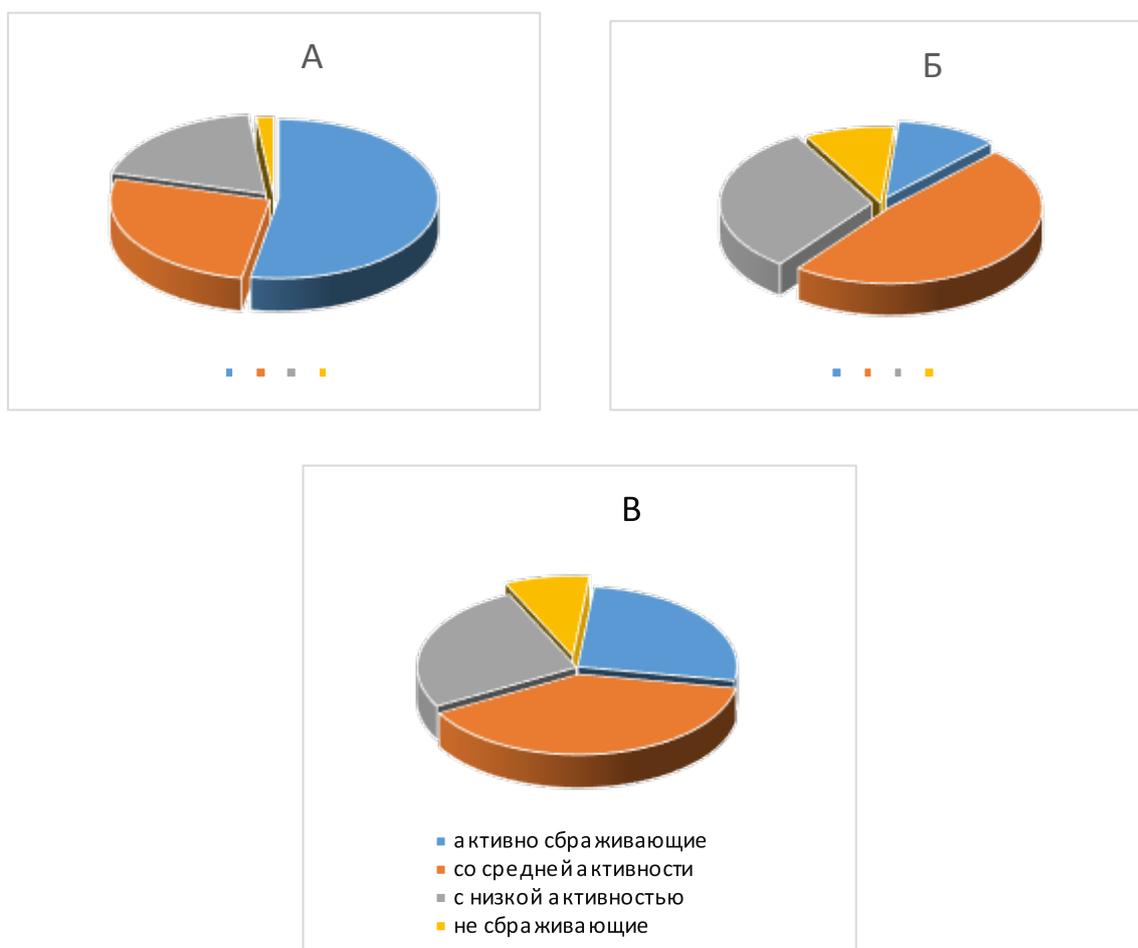
V морфотип – колонии диаметром 12 мм, плоские, края волнистые, в центре слабо выпуклые, периферия бежевого цвета, центр кремовый. Количество колоний с измененной морфологией – 3,2%.

VI морфотип колонии диаметром 3-5 мм, круглые, выпуклые, цилиндрические (с конусовидным профилем), края ровные, рельеф исчерченный, блестят, кремовые. Количество колоний с подобной морфологией составило 1,8 %.

Различия в морфологии колоний, присущих одной и той же популяции, свидетельствуют об их дифференцировке. Появление новых форм может быть результатом спонтанного мутационного процесса. Так, колонии VI морфотипа имели резкие отличия от остальных морфотипов: дрожжевые клетки образовывали колонии, растущие вертикально с образованием длинных (5 мм) тонких многоклеточных структур. Способность к образованию таких структур с нарушением контроля полярности клеток и процессов развития описаны в литературе [19] и названы многоклеточными стеблевыми структурами. К примеру, подобные колонии-мутанты получены у *C. albicans*, *S. pombe*, *E. coli* после воздействия на них УФ облучения.

Колонии вышеописанных морфологических вариантов отсеивали в пробирки на скошенный агар. Всего было отобрано 120 вариантов всех морфотипов с целью дальнейшего изучения их ферментативной активности. Для этого использовали метод с трубками Дунбара [18]. В качестве субстрата для брожения применяли 0,5%-ный дрожжевой экстракт, содержащий отдельные сахара (глюкозу, галактозу и лактозу), доведенные до концентрации 4% в среде. Посевной материал вносился в количестве 2,06 %.

Количественные соотношения вариантов по их способности ферментировать данные сахара, приведены на рисунке 1.



**Рисунок 1** – Гетерогенность популяции дрожжей *C. kefir var. kumis 17/1* по способности ферментировать: А – глюкозу; Б – галактозу; В – лактозу; %

Как видно из 1-рисунка большинство вариантов (более 50%) активно сбраживают глюкозу. Доля вариантов со средней сбраживающей активностью составила 25,0%, с низкой степенью активности 18,3%, вовсе не сбраживающих глюкозу оказалось минимальное количество – 1,66%. По отношению к галактозе большая часть вариантов проявляет низкую и среднюю сбраживающую активность: их доля составляет соответственно 48,3 и 31,6%. Активная энергичность брожения наблюдается только у 10,83 % вариантов, совершенно не сбраживали галактозу – 9,16%. Аналогичная ситуация отмечена на среде с лактозой: основную часть составляли варианты с категорией низкой и средней активности брожения. Количество активных штаммов составило 20,0% не сбраживающих лактозу 6,6%. Такое разделение послужило предпосылкой к выбору объекта для дальнейшего изуче-

ния функциональной активности дрожжей в условиях дыхания и брожения. Надо полагать, что именно среди представителей активных бродильщиков следует вести поиск культур для использования в бродительной промышленности, и наоборот, активно размножающиеся, дышащие за счет углеродного субстрата дрожжи, представляют интерес в производствах, основанных на получении биомассы. В результате скрининга было отобрано 10 наиболее активных вариантов, сбраживающих как глюкозу, так лактозу и галактозу. Из них для дальнейших исследований выбрана клоновая культура *C. kefir var. kumis 17/1*, которая при многократных пересевах сохраняла стабильность морфологических и физиологических признаков (по ферментативной активности к вышеуказанным сахарам).

Микроскопическая картина культуры *C. Kefyr var. kumis 17/1* в жидкой среде после 3-х дней

при 37°C представлена клетками от округлой до цилиндрической формы размерами (2,5-8,3) x (4,1-14,3) мкм, размножающиеся почкованием: почки образуются на узком основании клетки, спор не образуют. Встречаются одиночные клетки, парами или короткими цепочками. На глюкозо-пептонной среде культура дает обильный хлопьевидный осадок, формирует слабое пристеночное кольцо, пленку не образует. На лактозо-пептонной среде через сутки при температуре 37°C штрих культуры матового или светло-кремового цвета, гладкий, блестящий, край ровный. Характер формирования гигантских колоний изучали на плотной питательной среде после 2-х недельного роста культур. Гигантские

колонии диаметром 30-40 мм, плоские, стелющиеся, с влажным блеском, слегка волнистым краем, светло-кремового или бежевого цвета. На поверхности имеются редкие крупные и мелкие складки, с центра до края колонии утолщены сегментом, присутствуют сектора, заметна легкая радиально-концентрическая исчерченность.

Физиолого-биохимические свойства исследуемой культуры в сравнении с уже имеющимися данными, полученными в разное время, начиная с выделения и идентификации до настоящего времени [14; 20, 21], а также в сопоставлении с новым названием данного вида согласно последним определителям [7] представлены в 1-таблице.

**Таблица 1** – Основные физиолого-биохимические свойства *Candida kefyr var.kumis* 17/1 в сопоставлении с другими данными

Культуры	Рост при 37°C	макс. t°C	макс. конц. NaCl %	Сбраживают						Ассимилируют											
				глюкоза	галактоза	лактоза	сахароза	мальтоза	раффиноза	трегалоза	глюкоза	галактоза	лактоза	мальтоза	раффиноза	ксилоза	трегалоза	маннит	сахароза	целлюлоза	нитрат калия
<i>Torulosis kefyr var Kumis17*</i>	+	45	7-8	+	+	+	+	+	±	x	+	±	+	x				+	x	±	
<i>Torulopsis kefyr var.kumis 17**</i>	+	42	7-8	+	+	+	+	-	±	x	+	+	+	+	+	x		+	x	-	
<i>Kl.marxianus***</i>	+	x	x	+	+	+	+	-	-	-	x	+	+	-	+	+	-	x	+	+	-
<i>Candida kefyr var.kumis 17/1****</i>	+	45	10	+	+	+	+	±	±	-	+	+	+	±	+	+	±	+	±	+	+

Представляет интерес имеющиеся в литературе [22] сведения о том, что обычно дрожжам, ферментирующим лактозу, несвойственно ферментировать мальтозу. По нашим наблюдениям исследуемые культуры способны ферментировать мальтозу после их длительного выращивания на сусло-агаре, однако, при этом теряется способность к росту на среде с лактозой. В результате частых пересевов на лактозо-пептонную среду удается вновь восстановить ранее утраченную способность культуры к ферментации лактозы, но способность сбраживать мальтозу ослабевает, а затем и вовсе исчезает. В литературе [23] отмечено, что мальтозосодержащая среда способствует возникновению у дрожжей изменений ферментационных и ассимиляционных свойств.

Ассимиляция целлюлозы, по современной номенклатуре, является одним из таксономиче-

ских признаков дрожжей вида *Kl. marxianus var. marxianus* и *Kl. marxianus var. lactis*. В связи с отсутствием такой информации о наших объектах, нами была изучена их способность к усваиванию целлюлозы на жидкой питательной среде. Жидкую питательную среду наливали тонким слоем в колбу и вкладывали в нее сложенный складками стерильный фильтр. Двухсуточный посевной материал вносили в концентрации 3-5x10<sup>6</sup> клеток и культивировали в течение 7 суток на качалке. В результате было выяснено, что культура *C. kefyr var. kumis* 17/1 на жидкой среде обладает целлюлолитическими свойствами, формируя при этом колонии непосредственно на бумаге. Вероятно, ферменты дрожжей, гидролизующие целлюлозу, не выделяются в культурную жидкость, а синтезируются на клеточной стенке, обуславливая при этом поверхностный контакт дрожжей с целлюлозой.

В литературе [17] выделяют группу нитратположительных и нитратотрицательных видов *Candida*. Большую часть дрожжей этого рода составляют сбраживающие нитратотрицательные виды, кроме того, отсутствуют данные в отношении сбраживания лактозы нитратположительными группами. В данном случае, исследуемая культура является одновременно нитратположительной и сбраживающей углеводы, в частности, лактозу.

В изначально опубликованных данных [19] отсутствовали сведения об отношении *C. kefyri* var. *kumis* 17 к высокому содержанию в среде сахара (осмочувствительность). Нами был отмечен рост на среде с содержанием 50% глюкозы. Кроме того, исследуемая культура устойчива к повышенной концентрации поваренной соли. При 1-9 % наблюдается довольно хороший рост, при 10% – рост умеренный, а при 11-15% – полностью прекращается. По данным литературы [24], толерантность к повышенным концентрациям соли и сахара является одним из физиологических особенностей культур лактозных дрожжей. На наш взгляд, противоречивых результатов между предыдущим описанием вида и свойствами культуры, исследуемой после длительного хранения, не выявлено.

Таким образом, изученная культура по большинству морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков оказалась близ-

ка к описанию *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* [26]. Отрицательные результаты по обнаружению полового процесса позволили отнести исследуемую культуру к анаморфе данного вида дрожжей – к *Candida kefyri*, а некоторые особенности, характерные для объекта (ассимиляция нитрата калия и мальтозы, протеолитическая активность) позволяют рассматривать ее как разновидность данного вида, вероятно, являющейся локальной географической популяцией. В жидкой питательной среде после 3-х дней роста при 37°C клетки *C. sphaerica* KM95 имеют размеры (2,0-8,3) x (4,1-12,4) мкм, почкуются, спор не образуют. Штрих культуры матового цвета, гладкий, блестящий, края ровные. Гигантские колонии диаметром 20-25 мм, круглые, края слегка волнистые, поверхность гладкая, блестит, слабовыпуклые, еле заметные сектора, центр колонии темнее, чем периферия. Сопоставление наших результатов, с ранее полученными данными при идентификации культуры *Torulopsis sphaerica* KM95, не выявило кардинальных различий. Однако на картофельной среде в анаэробных условиях иногда отмечается ложномицелиальный рост. Согласно представлениям последней систематики дрожжей [9], по изученным морфолого-культуральным и физиологическим признакам, дрожжи *Candida sphaerica* KM95 являются анаморфой *Kl. marxianus* var. *lactis* (таблица 2).

**Таблица 2** – Сопоставление основных физиолого-биохимических признаков дрожжей *Candida sphaerica* и *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*

Культура	рост при 37°C	макс. t°C	макс. конц NaCl%	глюкоза	галактоза	лактоза	сахароза	мальтоза	раффиноза	трегалоза	глюкоза	галактоза	лактоза	мальтоза	раффиноза	сахароза	целлюлоза	Нитрат калия
<i>Torulopsis sphaerica</i> KM 95*	+	42	5-7	+	+	+	+	-	±	x	+	+	+	+	+	+	x	-
<i>Candida spgaerica</i> KM95	+	42	8-9	+	+	+	+	±	±	-	+	+	+	±	±	+	-	±
<i>Candida sphaerica</i> 1M	+	40	12	+	+	+	+	±	±	-	+	+	+	±	+	+	-	±
<i>Candida sphaerica</i> 3M	+	40	10	+	+	+	+	±	±	-	+	+	+	±	+	+	-	±
<i>Kl.marxianus</i> var. <i>lactis</i> **	±	x		+	+	+	±	±	±	x		+	+	±	±	+	+	-

Известно, что своеобразной нишей для лактозосбраживающих дрожжей являются кисломолочные продукты смешанного брожения. В Казахстане весьма популярны продукты из верблюжьего молока, которые являются результатом молочнокислого и спиртового брожения. В течение ряда лет изучалась дрожжевая флора этих продуктов. В результате из национального напитка шубата были получены изоляты лактозосбраживающих дрожжей [26].

В поисках культур, интенсивно сбраживающих лактозу, было испытано 25 штаммов дрожжей, выделенных из шубата и отнесённых к роду *Candida*. В результате сравнительного изучения ферментативной активности, путем исследования способности разных штаммов сбраживать лактозу в трубках Дунбара, выявлены наиболее активные из них – *C. sphaerica* 1М и *C. sphaerica* 3М. В жидкой среде они образуют клетки от сферической до овальной формы, размерами (2,08 – 4,16) x (4,16 – 6,24) мкм и (2,6 – 4,1) x (3,3 – 6,0) мкм соответственно. Формируют осадок, пристеночное кольцо. Размножаются почкованием, спор не образуют. Штрих культуры матовый, гладкий, блестящий, край ровный. Колонии круглые с ровными краями, гладкие, слабовыпуклые, светло-бежевого цвета.

Музейные культуры и отобранные новые штаммы дрожжей поддерживались периодическим культивированием на лактозосодержащей среде с целью дальнейшего изучения их морфофизиологических особенностей. Исследуемые

культуры лактозосбраживающих отличаются по морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам. Культура *C. kefir var. kumis 17/1* выделяется способностью усваивать целлюлозу, является нитратположительной и проявляет фенотипическую двойственность

### Заключение

В результате отмечено, что культура *Candida sphaerica KM95* не проявляет естественную изменчивость, которая выражалась бы в макроморфологической гетерогенности популяции: почти все колонии имели аналогичные характеристики. У культуры *Candida kefir var. kumis 17* при рассеивании на плотную среду наблюдается заметная вариабельность по ряду морфологических признаков. Так, популяционный состав представлен несколькими типами колоний, отличающихся друг от друга по размеру, цвету, форме, структуре и т.п. В поисках культур, интенсивно сбраживающих лактозу, было испытано 25 штаммов дрожжей, выделенных из шубата и отнесённых к роду *Candida*. В результате сравнительного изучения ферментативной активности, путем исследования способности разных штаммов сбраживать лактозу, выявлены наиболее активные из них – *C. sphaerica* 1М и *C. sphaerica* 3М. По нашим наблюдениям исследуемые культуры способны ферментировать мальтозу после их длительного выращивания на сусло-агаре, однако, при этом теряется способность к росту на среде с лактозой.

### Литература

1. Park, S.W., Kang, B.H., Lee, H.M. *et al.* Efficient brazzein production in yeast (*Kluyveromyces lactis*) using a chemically defined medium // *Bioprocess Biosyst Eng* 44, 2021. – P. 913–925. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02499-y>
2. Бекенова Н.Е., Дауылбай С.С., Бекенова Э.Е., Ануарбекова С.С. Выделение и идентификация дрожжей перспективных для утилизации лактозы // *Успехи современного естествознания*. – 2015. – № 2. – С. 126–131.
3. Наумов Г.И. Полимерные гены ферментации лактозы у дрожжей *Kluyveromyces lactis*: новый локус LAC3 / Г.И. Наумов, Е.С. Наумова // *Доклады Академии Наук*. – 2014. – Т. 455. – №3. – С. 363–365.
4. Golubev, V.I. Electio et characterisation active fermenti lactosum fermentantis / V.I. Golubev, N.V. Golubev // *De Biochemistry et Microbiologia*. – 2004. – Т. 40. – N. III. – S. 332–336.
5. Сухотина Н.Н., Наумова Е.С., Наумов Г.И. Молекулярная гетерогенность молочных – дрожжей *Kluyveromyces marxianus* // *Успехи медицинской микологии*. – М. Национальная академия микологии. 2006. Москва. С. 2122.
6. Francisco Javier Reyes-Sánchez, Jesús Bernardo Pérez-Lerma, Juan Antonio Rojas-Contreras, Javier López-Miranda, Nicolás Óscar Soto-Cruz, Manuel Reinhart-Kirchmayr. Study of the Enzymatic Capacity of *Kluyveromyces marxianus* for the Synthesis of Esters // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* (2019) 29 (1-6): 1–9. <https://doi.org/10.1159/000507551>
7. Kurtzman P.C., Fell J.W. *The Yeasts, a taxonomic study*. – USA: Elsevier Science, Amsterdam, 1998. – 1035 p.
8. Наумов Г.И., Никитина Т.Н., Кондратьева В.И. Реидентификация дрожжей *Zygodonospora lactis* (Dombrowski) G. Naumov из Всесоюзной коллекции микроорганизмов // *Микробиология*. – 1991. – Т. 60, №5. – С. 915–919
9. Odds C., Sackih M.J., Jones Dorothy. Numeral taxonomic analysis of imperfect yeast species in *Candida* and *Torulopsis* по basis for generic separation // *J. Gen. Microbiol.* – 1990. – Vol.136, №4. – P. 761–765.
10. Kurtzman C.P. Systematics and taxonomy of yeasts // In Ernst, J.F., Schmidt A. (eds.): *Microbiol. Basel. Karger*. 2000. V.5. P.1–14. P. 35–56.

11. Kreger-van-Rij N. I.W. The Yeasts, a taxonomic study. – Groningen, The Netherlands.: Elsevier. Amsterdam, 1984. – 1052 p.
12. Наумов Г.И. Идентификация видов дрожжей рода *Zygoxospora*. kudriavzev emened G. Naumov //Микробиология. – 1988. – Т.57, №1. – С 114-118.
13. Marin, A. R., Lopez, Y. C., Garcia, A. N., Heredia, J. C. R., & Loria, J. del C. Z. (2017). Potential Production of Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized and Coimmobilized with *Zymomonas mobilis*: Alternative for the Reuse of a Waste Organic. InTech. doi: 10.5772/intechopen.69991
14. Kurniawati M, Nurliyani N, Budhijanto W. Isolation and Identification of Lactose-Degrading Yeasts and Characterisation of Their Fermentation-Related Ability to Produce Ethanol / Kurniawati M, Nurliyani N, Budhijanto W. // Fermentation.-2022.- 8(4). S. – 183-185
15. Lyutova L.V, Naumova E.S. Inter-Strain Hybridization of *Kluyveromyces lactis* Yeast for Creating Efficient Lactose-Fermenting Strains / Lyutova L.V, Naumova E.S // *Applied Biochemistry and Microbiology*-2022. 58(8).- S. 332-336.
16. Lertwattanasakul, N., Kosaka, T., Hosoyama, A. et al. Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol Biofuels* 8, 47 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0227-x>
17. Бержанова Р., Сартаева А., Мукашева Т., Сагындыков Ю. Изучение разнообразия молочнокислых микроорганизмов, выделенных из шубата различных районов Казахстана// Журнал Биотехнологии.- 2014.С. 82
18. Rakhmanova A., Wang T., Xing G., Xin W., Zhu Q., Lu X. Isolation and identification of microorganisms in Kazakhstan koumiss and their application in preparing cow-milk koumiss// Journal of Dairy science (2020), Vol. 104, ISSUE 1, P. 151-166. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18527>
19. Шигаева М.Х., Оспанова М.Ш. Микрофлора национальных кисломолочных напитков. – Алма-ата: Наука, 1985. – 152 с.
20. Tang H, Ma H, Hou Q, Li W, Xu H, Liu W, Sun Z, Haobisi H, Menghe B. Profiling of koumiss microbiota and organic acids and their effects on koumiss taste. BMC Microbiol. 2020 Apr 10;20(1):85. doi: 10.1186/s12866-020-01773-z. PMID: 32276583; PMCID: PMC7149844.
21. Концевая, И. И. Микробиология: культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов / И. И. Концевая; М-во образования РБ, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Чернигов: Десна Полиграф, 2017. – 44 с.
22. Domingues L, Guimarães PM, Oliveira C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. Bioeng Bugs. 2010 May-Jun;1(3):164-71. doi: 10.4161/bbug.1.3.10619. Epub 2009 Nov 13. PMID: 21326922; PMCID: PMC3026421.
23. Бабьева, И.П. Биология дрожжей / И.П. Бабьева, И.Ю.Чернов. -М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. – 221 с.
24. Gustavo Graciano Fonseca, Andreas Karoly Gombert, Elmar Heinzle, Christoph Wittmann, Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source, *FEMS Yeast Research*, Volume 7, Issue 3, May 2007, Pages 422–435, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00192.x>
25. Шигаева М.Х., Оразаева З. Т., Касымбекова С.К. Уточнение таксономического положения *Torulopsis kefir var. kumis um*. 17 //Вестник КазНУ, сер. биол. – 2002. – №2. – С. 77-80.
26. Шигаева М.Х., Касымбекова С.К., Сартаева А.А. Дрожжевые организмы, выделенные из шубата Алматинской области //Поиск. – 2003. – №3 (2) – С. 26-31.

## References

1. Babeva, I.P. (2004) *Biologiya drozhzhej* [Biology of yeast]. М.: Товарищество научных изданий КМК. (In Russian).
2. Bekenova N.E., Dauylbaj S.S., Bekenova E.E., Anuarbekova S.S. (2015) Solitudo et idem promittens fermentations ad lactosum utendo [Isolation and identification of promising yeasts for lactose utilization]. Journal of Uspehi sovremennogo estestvoznaniya, no. 2, pp. 126-131. (In Russian).
3. Berzhanova R., Sartaeva A.A, Mukasheva T., Sagyndykov U. (2014) The studying of diversity of lactic microorganisms isolated from shubat of various areas of Kazakhstan [Study of the diversity of lactic acid microorganisms isolated from shubat from different regions of Kazakhstan]. Journal of Biotechnology, p.82. (In Russian).
4. Domingues L, Guimarães PM, Oliveira C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. Bioeng Bugs. 2010 May-Jun;1(3):164-71. doi: 10.4161/bbug.1.3.10619. Epub 2009 Nov 13. PMID: 21326922; PMCID: PMC3026421.
5. Francisco Javier Reyes-Sánchez, Jesús Bernardo Páez-Lerma, Juan Antonio Rojas-Contreras, Javier López-Miranda, Nicolás Óscar Soto-Cruz, Manuel Reinhart-Kirchmayr. Study of the Enzymatic Capacity of *Kluyveromyces marxianus* for the Synthesis of Esters // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* (2019) 29 (1-6): 1–9. <https://doi.org/10.1159/000507551>
6. Golubev, V.I. Electio et characterisation active fermenti lactosum fermentantis / V.I. Golubev, N.V. Golubev // De Biochemistry et Microbiologia. – 2004. – Т. 40. – N. III. – S. 332-336.
7. Gustavo Graciano Fonseca, Andreas Karoly Gombert, Elmar Heinzle, Christoph Wittmann, Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source, *FEMS Yeast Research*, Volume 7, Issue 3, May 2007, Pages 422–435, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00192.x>

8. Koncevaya I.I. (2017) Mikrobiologiya: kultivirovanie i rost bakterij [Microbiology: cultivation and growth of bacteria] Prakticheskoe rukovodstvo dlya stud. biologich. spec. vuzov / – Chernigov: Desna Poligraf, 44 p. (In Russian).
9. Kreger-van-Rij N. I.W. The Yeasts, a taxonomic study. – Groningen, The Netherlands.: Elsevier. Amsterdam, 1984. -1052 p.
10. Kurniawati M, Nurliyani N, Budhijanto W. Isolation and Identification of Lactose-Degrading Yeasts and Characterisation of Their Fermentation-Related Ability to Produce Ethanol / Kurniawati M, Nurliyani N, Budhijanto W. // Fermentation.-2022.- 8(4). S. – 183-185
11. Kurtzman C.P. Systematics and taxonomy of yeasts // In Ernst, J.F., Schmidt A. (eds.): Microbiol. Basel. Karger. 2000. V. 5. P.1-14. P. 35-56.
12. Kurtzman P.C., Fell J.W. The Yeasts, a taxonomic study. – USA: Elsevier Science, Amsterdam, 1998. – 1035 p.
13. Lertwattanasakul, N., Kosaka, T., Hosoyama, A. *et al.* Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol Biofuels* **8**, 47 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0227-x>
14. Lyutova L.V, Naumova E.S. Inter-Strain Hybridization of *Kluyveromyces lactis* Yeast for Creating Efficient Lactose-Fermenting Strains / Lyutova L.V, Naumova E.S // *Applied Biochemistry and Microbiology*-2022. 58(8).- S. 332-336.
15. Marin, A. R., Lopez, Y. C., Garcia, A. N., Heredia, J. C. R., & Loria, J. del C. Z. (2017). Potential Production of Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized and Coimmobilized with *Zymomonas mobilis*: Alternative for the Reuse of a Waste Organic. InTech. doi: 10.5772/intechopen.69991
16. Naumov G.I. (1988) Identifikaciya vidov drozhzhej roda *Zygofabospora* [ Identification of yeast species of the genus *Zygofabospora*]. Journal of Microbiology, vol.57, no. 1, pp. 114-118. (In Russian).
17. Naumov G.I. (2014) Polimernye geny fermentacii laktozy u drozhzhej *Kluyveromyces lactis*: novyj lokus LAC3 [Polymer genes for lactose fermentation in the yeast *Kluyveromyces lactis*: a new LAC3 locus]. Journal of Reports of the Academy of Sciences, vol. 455, no. 3, pp. 363–365. (In Russian).
18. Naumov G.I., Nikitina T.N., Kondrateva V.I. (1991) Reidentifikaciya drozhzhej *Zygofabospora lactis* [Re-identification of the yeast *Zygofabospora lactis*]. *Mikrobiologiya*, vol. 60, no 5, pp. 915-919. (In Russian).
19. Odds C., Sackih M.J., Jones Dorothy. Numeral taxonomic analysis of imperfect yeast species in *Candida* and *Torulopsis* no basis for generic separation // J. Gen. Microbiol. – 1990. – Vol.136, №4. – P. 761-765.
20. Park, SW., Kang, BH., Lee, HM. *et al.* Efficient brazzein production in yeast (*Kluyveromyces lactis*) using a chemically defined medium. *Bioprocess Biosyst Eng* **44**, 913–925 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02499-y>
21. Rakhmanova A., Wang T., Xing G., Xin W., Zhu Q., Lu X. Izolation and identification of microorganisms in Kazakhstan koumiss and their application in preparing cow-milk koumiss// Journal of Dairy science (2020), Vol. 104, ISSUE 1, P. 151-166. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18527>
22. Shigaeva M.H., Ospanova M.Sh. (1985) Mikroflora nacionalnyh kislomolochnyh napitkov [Microflora of national fermented milk drinks]. *Alma-ata: Nauka*, 152 p. (In Russian).
23. Shigaeva M.H., Orazaeva Z. T., Kasymbekova S.K. (2002) Utochnenie taksonomicheskogo polozheniya *Torulopsis kefir* var. kumis sht. 17 [Clarification of the taxonomic position of *Torulopsis kefir* var. kumis pcs. 17], Bulletin of KazNU. Journal of Biological sciences, no. 2, pp. 77-80. (In Russian).
24. Shigaeva M.H., Kasymbekova S.K., Sartava A.A. (2003) Drozhzhevye organizmy, vydelennye iz shubata Almatinskoy oblasti [Yeast organisms isolated from shubat in Almaty region], Poisk, no. 3 (2), pp. 26-31. (In Russian).
25. Suhotina N.N., Naumova E.S., Naumov G.I. Molekulyarnaya geterogenost molochnyh – drozhzhej *Kluyveromyces marxianus* [Molecular heterogeneity of dairy yeast *Kluyveromyces marxianus*] // Uspehi medicinskoj mikologii. – M. Nacionalnaya akademiya mikologii. 2006. Moskva. S. 2122-(In Russian).
26. Tang H, Ma H, Hou Q, Li W, Xu H, Liu W, Sun Z, Haobisi H, Menghe B. Profiling of koumiss microbiota and organic acids and their effects on koumiss taste. *BMC Microbiol.* 2020 Apr 10;20(1):85. doi: 10.1186/s12866-020-01773-z. PMID: 32276583; PMCID: PMC7149844.

#### Information about authors:

Sartayeva Akmaral Altynbekovna – Candidate of Biological Sciences, associate professor of Kazakh National Women’s Teacher Training University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: akmaral6671@gmail.com)

Orazaeva Zuxra Tursynovna Оразаева Зухра Турсыновна – Candidate of Biological Sciences, associate professor of, Kazakh National Women’s Teacher Training University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: zuxhra-05@mail.ru)

Imanova Elmira Myrzabekovna – Candidate of Agricultural Sciences, associate professor of Kazakh National Women’s Teacher Training University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: imanovaelmira@gmail.com)

Кырбасова Эльзира Артыкбаевна (corresponding author) – PhD, u.o. accou. profeccora, Kazakh National Women’s Teacher Training University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: e.kyrbasova@gmail.com)

Parmanbekova Meruyert – Candidate of Biological Sciences, associate professor of Kazakh National Women’s Teacher Training University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: mparmanbekova@gmail.com)

Berzhanova Ramza Zhainabekovna Бержанова Рамза Жаинабековна – Candidate of Biological Sciences, associate professor of Al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: Ramza05@mail.ru)

Baitasheva Gaukhar Umiraliyevna – Candidate of Agricultural Sciences, Director of the Institute of Natural Sciences of Kazakh National Women’s Teacher Training University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: gauhar75e@mail.ru)

**Сведения об авторах:**

*Сартаева Акмарал Алтынбековна – кандидат биологических наук, ассоц. профессор Казахского национального женского педагогического университета (Алматы, Казахстан, e-mail: akmaral6671@gmail.com)*

*Оразаева Зухра Турсыновна – кандидат биологических наук, ассоц. профессор Казахского национального женского педагогического университета (Алматы, Казахстан, e-mail: zukhra-05@mail.ru)*

*Иманова Эльмира Мырзабековна – кандидат сельскохозяйственных наук, ассоц. профессор Казахского национального женского педагогического университета (Алматы, Казахстан, e-mail: imanovaelmira@gmail.com)*

*Кырбасова Эльзира Артыкбаевна (корреспондентный автор) – PhD, ассоц. профессор Казахского национального женского педагогического университета (Алматы, Казахстан, e-mail: e.kyrbasova@gmail.com)*

*Парманбекова Меруерт Хамитбековна – кандидат биологических наук, ассоц. профессор Казахского национального женского педагогического университета (Алматы, Казахстан, e-mail: mparmanbekova@gmail.com)*

*Бержанова Рамза Жаинабековна – кандидат биологических наук, доцент Казахского национального Университета им аль-Фараби (Алматы, Казахстан, e-mail: Ramza05@mail.ru)*

*Байташева Гаухар Умиралиевна – кандидат сельскохозяйственных наук, директор института Естествознания Казахского национального женского педагогического университета (Алматы, Казахстан, e-mail: gauhar75e@mail.ru)*

*Поступила: 10 января 2024 года*

*Принята: 20 мая 2024 года*