

DOI 10.54596/2309-6977-2022-3-68-80

УДК 579.64

МРНТИ 34.27.23

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОГО РАЗНООБРАЗИЯ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Шүкүрбек М.Ж.*, Уалиева П.С., Абдиева Г.Ж., Мәлік А.М., Таңатар А.Е.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы,

Республика Казахстан

**E-mail: zhailaubaikyzy1107@mail.ru*

Аннотация

Для молочной промышленности в XXI веке экологические проблемы приобретают особую актуальность в связи с истощением ресурсов и необходимостью сохранения окружающей среды. Как в отечественной, так и в мировой практике не решена проблема использования молочной сыворотки, обладающей высокой пищевой и биологической ценностью, и в наибольшей степени загрязняющей сточные воды. В последние годы активно и целенаправленно формируется принципиально новое направление промышленной переработки молочной сыворотки - получение производных компонентов, являющихся целевыми продуктами, в частности, спирта. В связи с вышеизложенным важно изучение микробиологических показателей молочной сыворотки и выделение перспективных культур. Цель исследования: изучение микробного разнообразия молочной сыворотки и идентификация выделенных чистых культур. В ходе исследования изучены микробиологические показатели и таксономический состав микробного сообщества молочной сыворотки ТОО «Сырзавод «Мерке», ТОО «Амиран» (сыворотка), ТОО «Стелла Альпина» (сырная сыворотка). Изучены физико-химические и органолептические показатели молочной сыворотки. Из образцов сыворотки выделено 1 штамм дрожжей и 1 штамм молочнокислых бактерий. Изучена морфолого-культуральные свойства выделенных дрожжей и молочнокислых бактерий, в результате штаммы *Lactococcus lactis* M1, *Candida inconspicua* A1 были идентифицированы до вида.

Ключевые слова: молочная сыворотка, биоэтанол, дрожжевые культуры, молочнокислые бактерии, штамм, идентификация.

СҮТ САРЫСУЫНЫҢ МИКРОБТЫҚ АЛУАНТҮРЛІЛІГІН ЗЕРТТЕУ ЖӘНЕ БӨЛІНІП АЛЫНҒАН ТАЗА ДАҚЫЛДАРДЫ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ

Шүкүрбек М.Ж.*, Уалиева П.С., Абдиева Г.Ж., Мәлік А.М., Таңатар А.Е.

ал-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан Республикасы

**E-mail: zhailaubaikyzy1107@mail.ru*

Аңдатпа

21 ғасырдағы сүт өнеркәсібі үшін ресурстардың таусылуына және қоршаған ортаны сақтау қажеттілігіне байланысты экологиялық проблемалар ерекше өзекті болып табылады. Отандық және әлемдік тәжірибеде тағамдық және биологиялық құндылығы жоғары, ағынды суларды барынша ластайтын сүт сарысуын пайдалану мәселесі шешілген жоқ. Соңғы жылдары сүт сарысуын өнеркәсіптік өңдеудің принципті жаңа бағыты белсенді және мақсатты түрде қалыптасты - мақсатты өнімдер болып табылатын туынды компоненттерді, атап айтқанда, спирт алу. Жоғарыда айтылғандарға байланысты сарысудың микробиологиялық көрсеткіштерін зерттеу және перспективті дақылдарды анықтау маңызды болып саналады. Зерттеу жұмысының мақсаты: сүт сарысуының микробтық алуантүрлілігін зерттеу және бөлініп алынған таза дақылдарды идентификациялау. Зерттеу барысында «Меркі ірімшік зауыты» ЖШС, «Амиран» ЖШС (сарысу), «Стелла Альпина» ЖШС (ірімшік сарысуы) сүт сарысуларының микробтық қауымдастығының микробиологиялық көрсеткіштері мен таксономиялық құрамы зерттелді. Сүт сарысуының физика-химиялық және органолептикалық сипаттамалары зерттелді. Сарысу үлгілерінен ашытқылардың 1 штаммы және сүт қышқылы бактерияларының 1 штаммы бөлініп алынды. Бөлініп алынған ашытқылар мен сүтқышқылды бактериялардың морфологиялық-культуральдық қасиеттері

зерттеліп, нәтижесінде M1 және A1 штаммдары *M1-Lactococcus lactis*, *A1-Candida inconspicua* түріне дейін идентификацияланды.

Түйін сөздер: сүт сарысуы, биоэтанол, ашытқы дақылдары, сүт қышқылы бактериялары, штамм, идентификация.

THE STUDY OF MICROBIAL DIVERSITY OF MILK WHEY AND IDENTIFICATION OF ISOLATED PURE STRAINS

Shukurbek M.Zh. *, Ualieva P.S., Abdieva G.Zh., Malik A.M., Tangatar A.E.

al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Republic of Kazakhstan

**E-mail: zhailaubaikyzy1107@mail.ru*

Abstract

For the dairy industry in the 21st century, environmental problems are of particular relevance due to the depletion of resources and the need to preserve the environment. Both in domestic and world practice, the problem of using whey, which has a high nutritional and biological value, and which pollutes wastewater to the greatest extent, has not been solved. In recent years, a fundamentally new direction of industrial processing of whey has been actively and purposefully formed - obtaining derivative components that are target products, in particular, alcohol. In connection with the foregoing, we can conclude that it is necessary to carry out the greening of dairy production, associated with solving the problem of using secondary raw materials in this industry. The purpose of the study: to study the microbial diversity of whey and identify isolated pure strains. In the course of the study, the microbiological indicators and taxonomic composition of the microbial community of whey of Merke Cheese Factory LLP, Amiran LLP (whey), Stella Alpina LLP (cheese whey) were studied. The physical-chemical and organoleptic properties of whey have been studied.. 1 strain of yeast and 1 strain of lactic acid bacteria were isolated from serum samples. The morphological and cultural properties of isolated yeasts and lactic acid bacteria were studied, as a result, strains of *Lactococcus lactis* M1, *Candida inconspicua* A1 were identified to the species level.

Key words: whey, bioethanol, yeast cultures, lactic acid bacteria, strain, identification.

Введение

Сырная сыворотка - это жидкость, остающаяся после осаждения и удаления молочного казеина во время производства сыра. В 2015 году в мире было произведено 180 миллионов тонн молочной сыворотки, увеличиваясь со скоростью 3% в год. Более половины (50%) сыворотки, производимой во всем мире, сбрасывается в реки, озера и другие водоемы, что представляет собой значительную потерю ресурсов и серьезные проблемы загрязнения, поскольку она содержит высокую химическую потребность в кислороде (50-80 гКОД Л-1) и высокую биологическую потребность в кислороде (БПК, из-за наличия лактозы и трудноразлагаемых белков). Сырная сыворотка может быть в 100 раз более загрязняющей, чем бытовые сточные воды. Следовательно, обработка сыворотки, по-видимому, является серьезной проблемой для средних и мелких сыроварен [1].

Сырная сыворотка использовалась для производства этанола, поскольку она содержит лактозу и другие питательные вещества, необходимые для роста микроорганизмов. Он содержит около 7% сухих веществ, состоящих из 10-12% белков, лактозы (74%), минеральных веществ (8%) и жира (3%). Таким образом, использование микроорганизмов и сыворотки для производства биоэтанола и других ценных продуктов является лучшей альтернативой решению проблем загрязнения окружающей среды [2].

Производство этанола из сыворотки осуществляется главным образом дрожжами, которые способны сбраживать лактозу в сыворотке. Большинство видов *Saccharomyces* не могут ферментировать лактозу, потому что у них отсутствует ферментативная

система β -галактозидазы, которая расщепляет лактозу на глюкозу и галактозу. Тем не менее, большинство видов *Kluyveromyces* способны ферментировать лактозу до этанола, из которых *K.marxianus* и *K.lactis* широко изучаются с этой целью. Как правило, вид *Kluyveromyces* имеет ряд преимуществ перед видом *Saccharomyces*. Например, в отличие от *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* может производить этанол при более высокой температуре (даже при 52°C); вид *Kluyveromyces* способен ферментировать различные источники углерода (включая инсулин, ксилозу и лактозу), которые не могут быть ферментированы *Saccharomyces* [3].

Сыворотка, жидкость, остающаяся после отделения молочного жира и казеина от цельного молока, является одной из основных проблем утилизации молочной промышленности и требует простых и экономичных решений. Сыворотка составляет около 85-95% объема молока и сохраняет 55% питательных веществ молока. Среди наиболее распространенных из этих питательных веществ – лактоза (4,5– 5% по массе), растворимые белки (0,6–0,8% по массе), липиды (0,4-0,5% по массе) и минеральные соли (8-10% сухого экстракта). Сыворотка представляет собой важную экологическую проблему из-за больших объемов производства и высокого содержания в ней органических веществ[4].

Наиболее характерным соединением этой сыворотки является лактоза, которая может функционировать в качестве углеродного субстрата для роста и образования продуктов в многочисленных биотехнологических процессах, таких как производство биоэтанола [5].

Во многих отчетах показано потенциальное применение штаммов дрожжей в производстве биоэтанола из сырной сыворотки, но большинство из них сосредоточено на *Kluyveromyces sp* из-за его способности непосредственно сбраживать лактозу [6,7].

Методы исследования

Основной целью исследовательской работы является комплексное изучение микробиологических показателей и таксономического состава микробного сообщества сыворотки. Существует ряд причин, почему мы берем сыворотку в качестве основного объекта исследования. Сыворотка-побочный продукт в производстве сыра, творога, казеина. Состав сыворотки существенно различается, и она неразрывно связана с типом производимого сыра сыворотка и ее жирность; для творога – с способом производства творога и его жирностью; казеин - с типом производимого казеина. При производстве жирных сыров в основном потребляются казеин и молочный жир, а остальные компоненты переходят в значительное количество молочной сыворотки.

Определение органолептических показателей

Органолептическая оценка проводится как после отбора пробы, так и после хранения и транспортировки при температуре от 2°C до 6°C не более 8 часов.

Вкус и запах, структура, внешний вид и цвет определяются путем визуального и сенсорного анализа и проверки их соответствия действующим нормативным или техническим документам в стране, принявшей стандарт. Органолептическая оценка запаха и вкуса осуществляется путем нюхания и дегустации продукта. стакан с пробным образцом изделия доставляется в нос на расстоянии 1-2 см.

Запах определяется коротким глубоким двойным дыханием. Затем продукт пьют не менее 10 см, доставляя его в ротовую полость до основания языка и удерживая его в ротовой полости около 7 секунд. Затем образец выливается в плеватальницу. Движение глотания осуществляется через выдох в нос и дается итоговая оценка запаха и вкуса

испытуемого образца. Полость рта тщательно ополаскивают слабо заваренным чаем при температуре $35 \pm 5^\circ\text{C}$.

Определение титруемой кислотности

Определение титруемой кислотности основано на титровании солей, белков, углекислого газа и других соединений в сыворотке гидроксидом натрия. Поддающаяся титрованию кислотность в исходных тестах выражается в градусах Тернера ($^\circ\text{T}$). Для определения титруемой кислотности необходимо отмерить 10 см^3 сыворотки, содержащей три капли 1% раствора фенолфталеина, в конической колбе вместимостью 150 см^3 . Тщательно перемешивая раствор, титровать 0,1 н. щелочь, например, гидроксид натрия (калия), до получения стабильного розового цвета. Этот процесс титрования повторяли три раза, и для определения кислотности использовали среднюю отметку. Формула для расчета кислотности (1.1).

$$X = \frac{n \times 100}{m} \quad (1.1)$$

В этой формуле: X - мера кислотности; n - объем 0,1 н NaOH, использованного для титрования, см^3 ; 100 - коэффициент, необходимый для пересчета на 100 г продукта; m - масса сыворотки, г. Активную кислотность - значения pH молочной сыворотки определяли с помощью лабораторного pH-метра - 150 MI. Процесс измерения pH повторяли каждые 3 дня. pH сыворотки - один из критериев ее использования в качестве среды.

Исследование микробиологических показателей и таксономического состава микробного сообщества сыворотки

Определение численности микроорганизмов для определения физиологических групп проводили методом разбавления образцов природного субстрата в твердых питательных средах. Для определения титра колониеобразующих единиц микроорганизмов в образцах использовался метод Коха. После инкубации инокуляций определялось количество выращиваемых колоний и количество колониеобразующих единиц (ОКР) образца 1 г. Изучение качественного и количественного состава микрофлоры природных субстратов проводилось традиционными методами микробиологии.

Методы выделения чистых культур из образцов сыворотки

Выделение чистых культур осуществлялось механическим делением на поверхности плотной питательной среды. Чистоту отдельных колоний проверяли под микроскопией и закрывали питательными агаровыми пластинками для выращивания. Чистые посевы микроорганизмов культивировали в течение 2-5 дней.

Определение морфолого-культуральных, физиологико-биохимических характеристик микроорганизмов проводилось по общепринятым методам. Морфологические и культуральные свойства дрожжей изучаются по следующим признакам: форма и расположение клеток, размер клеток, характеристика колонии в твердой питательной среде, характер роста в жидкой питательной среде. Выделение и определение перспективных штаммов дрожжей, ферментирующих лактозу, осуществлялось методом ПЦР. В результатах исследования показана идентификация выделенных дрожжевых клеток до вида.

Результаты исследований и их обсуждение

Химический состав, энергетическая или пищевая ценность и физические свойства вторичного молочного сыра в значительной степени зависят от способов его получения.

Во вторичное молочное сырье в той или иной степени переходят почти все соединения, обнаруженные в настоящее время в молоке. Состав молочной сыворотки колеблется в значительных пределах и зависит для подсырной сыворотки от вида вырабатываемого сыра и его жирности; для творожной – от способа производства творога и его жирности; казеиновой - от вида вырабатываемого казеина [8].

В исследовательской работе нами были изучены физико-химические и органолептические свойства молочной сыворотки. В качестве объекта исследований были использованы молочная сыворотка ТОО «Меркенского сырного завода», ТОО «Amiran» (молочная сыворотка), ТОО «Stella Alpina» (подсырная сыворотка). Органолептические характеристики образцов молочной сыворотки представлены в таблице 1.

В результате изучения органолептических свойств молочной сыворотки было показано, что молочная сыворотка ТОО «Меркенский сырный завод» и ТОО «Amiran» имели чистый молочный вкус и молочный запах, консистенция однородная непрозрачная жидкость без осадков, цвет от белого до светло-желтого. Молочная сыворотка «ТОО Stella Alpina» имеет соленый вкус сырный запах, с однородной консистенции непрозрачная жидкость без осадков и хлопьев, цвет желтоватый или бледно-зеленый.

Таблица 1. Органолептические характеристики молочной сыворотки.

Наименование	Сыворотка		
	ТОО Amiran (молочная сыворотка)	ТОО Stella Alpina (подсырная сыворотка)	ТОО «Меркенский сырный завод»
Вкус и запах	чистый молочный вкус без посторонних привкусов и молочный запах	соленый вкус сырный запах	чистый молочный вкус и молочный запах
Внешний вид и консистенция	однородная непрозрачная жидкость без осадков и хлопьев	однородная непрозрачная жидкость без осадков	однородная непрозрачная жидкость без осадков и хлопьев
Цвет	бежевый	желтоватый или бледно-зеленый	желтый

Результаты указывают на хорошее качество продуктов выбранных производителей молочной и подсырной сыворотки и показывает о доброкачественности используемой молочной сыворотки. Равномерность консистенции и нормальный внешний вид, вкус и запах, соответствующие сыворотке, свидетельствуют о соблюдении всех санитарных норм и правил на этапе сбора сыворотки.

Далее в работе были изучены физико-химические показатели образцов молочной сыворотки. Результаты приведены в таблице 2.

Состав и свойства различных видов молочной сыворотки зависит от вида основного получаемого продукта. Основным компонентом в составе молочной сыворотки является лактоза, которая составляет в сухом веществе 70-75%. При этом в творожной сыворотке лактозы несколько меньше за счет сбраживания в молочную кислоту, что отражается на кислотности сыворотки. Степень перехода отдельных

компонентов молока в молочную сыворотку связана с процессами гелеобразования и синерезиса. В молочную сыворотку переходит 6,3-12,4% жира, а абсолютное содержание его в зависимости от жирности исходного сырья и технологии колеблется в широких пределах – от 0,05 до 0,5% [9].

Таблица 2. Физико-химические показатели молочной сыворотки

Сыворотка	Показатели			
	Жиры %	Белки %	Углеводы %	Энергетическая ценность, ккал/г
Amiran (творожная сыворотка)	0.2 ±0,008	0,8±0,032	3,2±0,13	20± 0,8
Stella Alpina (подсырная сыворотка)	0.2±0,008	0,8±0,032	3,5±0,14	20± 0,8
«Меркенский сырный завод»	0.2±0,008	0,8±0,032	3,2±0,13	20± 0,8

Компоненты, входящие в состав сухого вещества молочной сыворотки, определяют их питательные и технологические свойства. Наиболее ценными компонентами вторичного молочного сырья являются белки, молочный жир, углеводы, минеральные соли. По данным таблицы 2, во всех образцах молочной сыворотки: жиры - 0,2%, белки - 0,8%, углеводы в пределах 3,2-3,5%, энергетическая ценность составило 20 ккал/г. Далее в работе нами были определены масса сухого вещества и влажность образцов молочной сыворотки (Таблица 3). Влажность определяли с помощью анализатора влажности MAC 110.X Radwag. Молочные продукты (молоко, сыворотка) измеряются при 110 градусах Цельсия, объем продукта 5 мл. Таким же образом определяли массу сухого вещества до полного высыхания образца.

Таблица 3. Масса сухого вещества и влажность в 100 г молочной сыворотки

Сыворотка	Влажность %	Сухое вещество (г)
ТОО Amiran (творожная сыворотка)	92.067±1,8	8±0,16
ТОО Stella Alpina (подсырная сыворотка)	93.001±1,9	7±0,14
ТОО «Меркенский сырный завод»	92±1,8	8±0,16

Определение сухого вещества является особенно важным и необходимым показателем при оценке качества сырья. Как видно из таблицы 3, влажность образцов молочной сыворотки были в пределах 92-93,001%, массы сухого вещества на 100 г молочной сыворотки составляют от 7-8 г. Содержание основных компонентов в образцах молочной сыворотки представлены на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, состав и свойства различных видов молочной сыворотки соответствуют требованиям нормативно-технической документации на эти виды сырья, что дает полное право считать образцы молочной сыворотки годными для использования при получении биоэтанола. Метод определения титруемой кислотности основан на раствором гидроксида натрия в присутствии нейтрализации кислот, содержащихся в продукте, индикатора фенолфталеина.

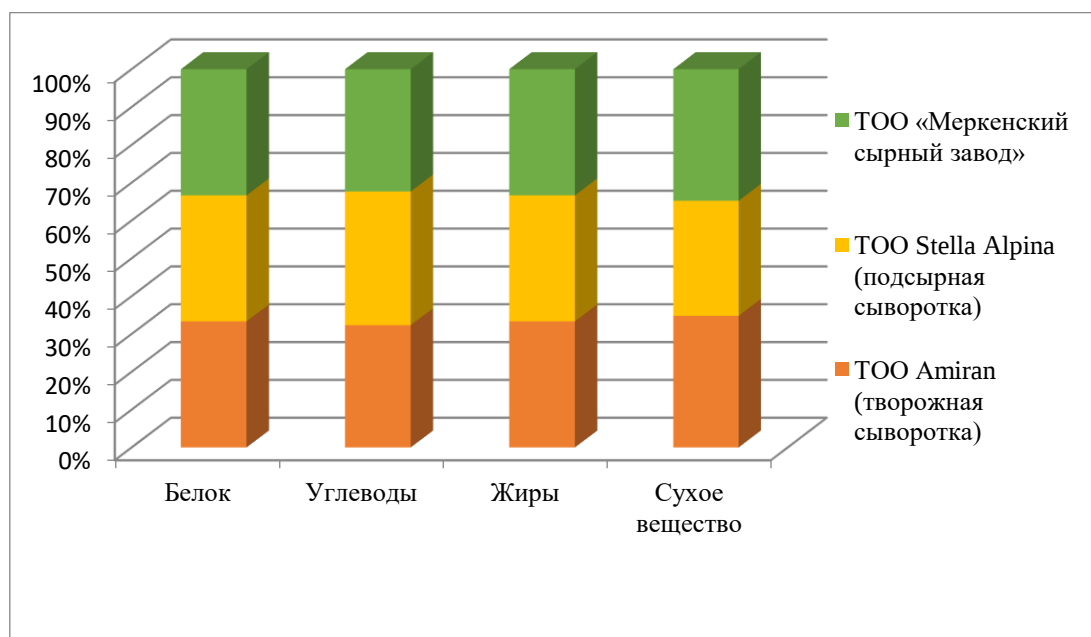


Рисунок 1. Содержание основных компонентов в образцах молочной сыворотки

Она выражается в градусах Тернера ($^{\circ}T$) и для свежесвыдоенного молока составляет 16-18 $^{\circ}T$ [10]. Активная кислотность является одним из показателей качества молока и молочной сыворотки. Активная кислотность (pH) определяется концентрацией водородных ионов. От значения pH зависит коллоидное состояние белков продуктов, рост полезной и вредной микрофлоры, термоустойчивость, активность ферментов.

В связи с этим нами были изучены титруемая кислотность образцов молочной сыворотки (Рисунок 2).

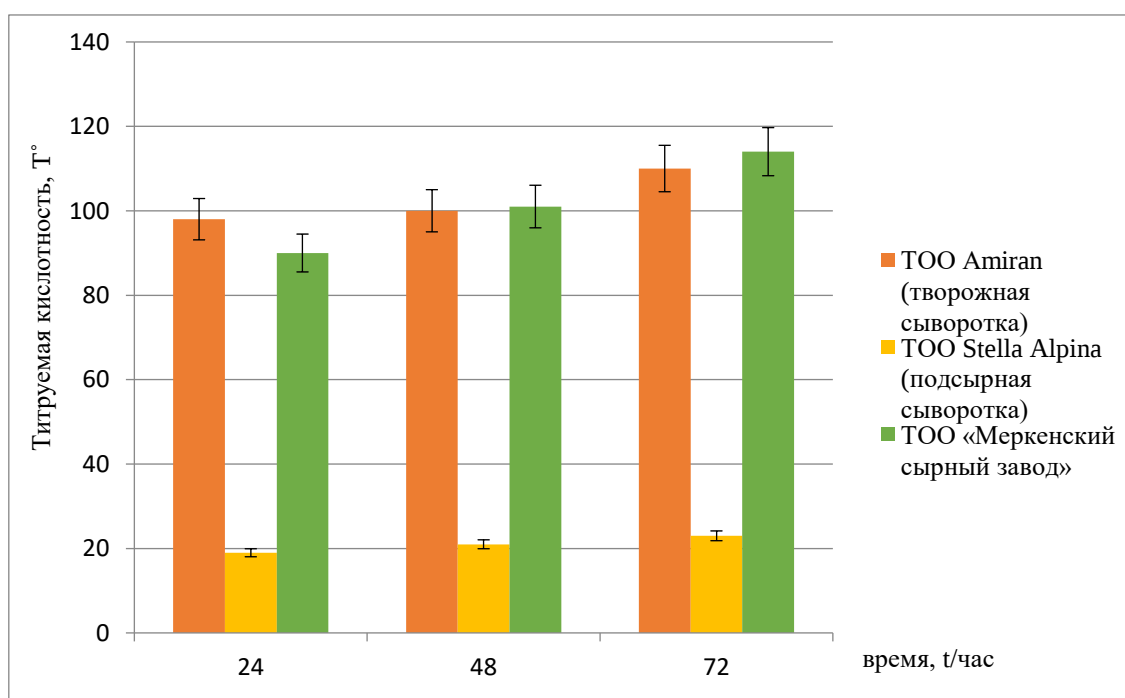


Рисунок 2. Титруемая кислотность образцов молочной сыворотки

Как видно из рисунка 2, титруемая кислотность молочных сывороток имеют тенденцию повышаться со временем. Высокие показатели титруемой кислотности наблюдаются в образцах подсырной сыворотки ТОО «Меркенского сырного завода», кислотность в этих образцах колеблется в пределах 90-114 Т°. Титруемая кислотность в творожной сыворотке ТОО Amiran составило 98-110 Т°, а в подсырной сыворотке ТОО Stella Alpina - 19-23 Т°. Титруемая кислотность образцов молочной сыворотки находится в диапазоне от 19 до 114° Т. Согласно нормативным документам в норме титруемая кислотность подсырной сыворотки составляет 20 Т°, тогда как в творожной и казеиновой сыворотках эти данные колеблется в пределах 70-75 Т° соответственно.

Зачастую многие ученые задаются вопросом о соотношении титруемой кислотности (кислотности в градусах Тернера) и активной кислотности (или истинной кислотности), которая характеризуется величиной водородного показателя рН (концентрация ионов водорода в среде). Для творожной сыворотки усредненный показатель активной кислотности рН находится в пределах от 4,0 до 5,0 ед. Однако кислотность зависит от многих факторов: характеристики исходного молочного сырья, температуры, длительности хранения (рН снижается). Более того, для приготовления питательной среды (при производстве бактериальных заквасок) творожную сыворотку осветляют и приводят к определенному показателю кислотности, например, раскисляют (до рН 6,0-6,5 и выше). Таким образом, рН нативной творожной сыворотки и сыворотки обработанной значительно отличаются. Нами было изучены активная кислотность образцов молочной сыворотки (таблица 4).

Таблица 4. Активная кислотность - значение рН образцов молочной сыворотки

Сыворотка	24 часа	48 часов	72 часа
ТОО Amiran (творожная сыворотка)	5	4.8	4.6
ТОО Stella Alpina (подсырная сыворотка)	5.6	5.5	5.3
ТОО «Меркенский сырный завод»	4.9	4.7	4

Как видно из таблицы 4, значение активной кислотности (рН) творожной сыворотки ТОО Amiran менялась от рН 5 до рН 4,6. Активная кислотность подсырной сыворотки ТОО Stella Alpina составляет рН 5,6 - рН 5,3, тогда как значение (рН) подсырной сыворотки ТОО «Меркенский сырного завода» колеблется в пределах рН 5,6 - рН 5,3. Таким образом, нами в работе были изучены физико-химические и органолептические свойства молочной сыворотки, даны характеристики свойствам молочной сыворотки для использования получения биоэтанола.

Микробиологические показатели и таксономический состав микробного сообщества молочной сыворотки.

В микрофлоре подсырной сыворотки могут обнаруживаться БГКП, лактозосбраживающие молочнокислые микроорганизмы, гетероферментативные молочнокислые бактерии, термоустойчивая микрофлора, заквасочные культуры микроорганизмов, дрожжи и плесневые грибы. В составе микрофлоры творожной сыворотки присутствует мезофильная микрофлора заквасок в виде кокков, диплококков и палочковидной формы [11]. В работе нами изучены микробиологические показатели и таксономически состав микробного сообщества 3 образцов молочной сыворотки. Для определения микрофлоры образцов молочной сыворотки и выделения чистых культур дрожжей и лактобактерий был проведен посев методом Коха на плотные питательные среды, таких как MRS, Sabourand Dextrose Agar и МПА. Таксономически состав микробного сообщества образцов молочной сыворотки приведены на рисунке 3.

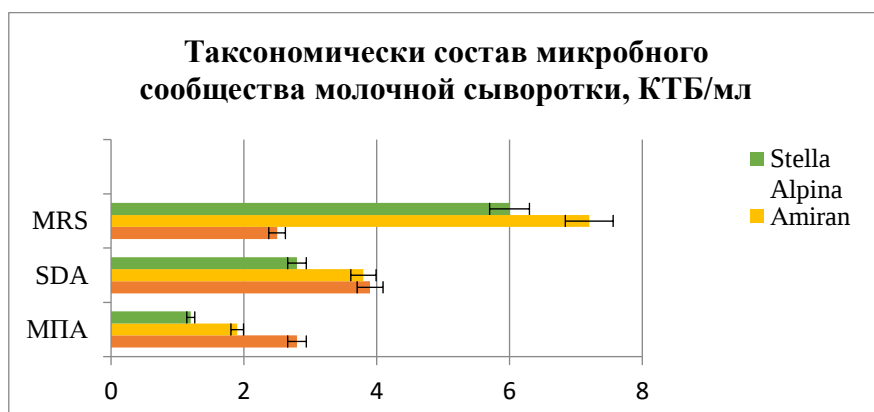
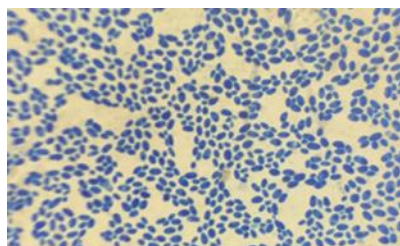


Рисунок 3. Рост микроорганизмов таксономических групп на различных питательных средах

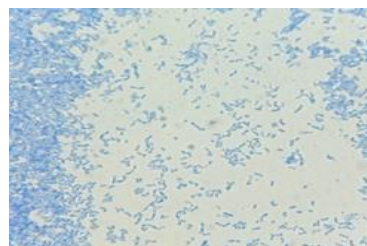
Микробиологический анализ, микроскопия изученных образцов не выявили наличия посторонней микрофлоры в образцах молочной сыворотки. Микробиологическая картина продуктов в основном представлена культурами дрожжей, лактобактерий и лактококков. Как видно из рисунка 3, на твердой питательной среде MRS количество КОЕ молочнокислых бактерий составило $2,5-7,2 \times 10^7$ КОЕ/мл. На среде Sabourand Dextrose Agar количество колоний дрожжей были $2,8-3,9 \times 10^7$ КОЕ/мл. На универсальной среде МПА количество гетеротрофных микроорганизмов составило $1,2-2,8 \times 10^7$ КОЕ/мл, что ниже на порядок по сравнению с микроорганизмами выросших на элективных средах. Это объясняется с тем, что в составе микрофлоры молочной сыворотки доминируют представители молочнокислых микроорганизмов, таких как лактозасбраживающие дрожжи и молочнокислые бактерий. Получение накопительной культуры дрожжей основано на их способности расти в сахаросодержащих субстратах со слабокислой реакцией и на их устойчивости к этиловому спирту. Накопление дрожжей определяли визуально по наличию в питательной среде осадка и характерных продуктов их жизнедеятельности и микроскопическим путем, а лактобактерий были выявлены микроскопированием [12]. Для определения видовой принадлежности штаммов дрожжей и молочнокислых бактерий проводилось изучение традиционными методами морфолого-культуральные свойства [13, 14]. Морфолого-культуральные свойства отобранных дрожжей и молочнокислых бактерий представлены в таблице 5.

Культура	Описание колоний	Морфология и размеры клеток	Вегетативное размножение
M1	Колонии белые, точечные круглые колонии прозрачные по краям	Клетки кокковидные, размеры 0,8 мкм, клетки расположены одиночно, парами или цепочками различной длины	бинарное деление
A1	Края колонии неровные слизистые, у основания белые, выпуклый, поверхность блестящая	Клетки цилиндрической, удлиненной формы размером 1,5–4,6 мкм	Почкование

Макро и микроморфология штаммов дрожжей и молочнокислых бактерий представлены на рисунке 4.



A1



M1

Рисунок 4. Микроморфология штаммов дрожжей и молочнокислых бактерий

Таким образом, в работе изучены микробиологические показатели и таксономически состав микробного сообщества молочной сыворотки. Из образцов молочной сыворотки были выделены 3 штамма дрожжей и 1 штамм молочнокислых бактерий для дальнейших исследований.



A1



M1

Рисунок 5. Макроморфология штаммов дрожжей и молочнокислых бактерий

Молекулярно-генетическая идентификация выделенных штаммов дрожжей и молочно кислых бактерий.

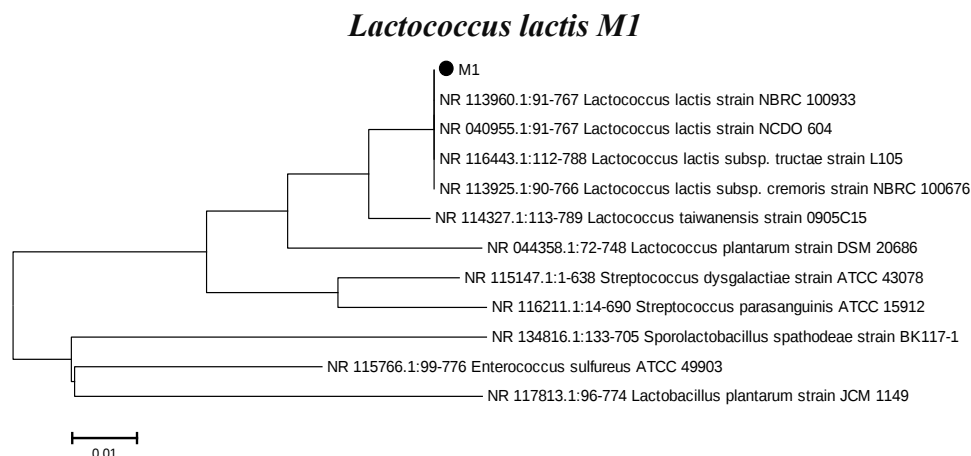
Идентификацию молочнокислой бактерии, проводили методом определения прямой нуклеотидной последовательности ITS региона (межгенного транскрибируемого региона), с последующим определением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных GeneBank [15].

После реакции секвенирования проводили вторую очистку ПЦР-продукта набором для очистки реакций секвенирования BigDye XTerminator Purification Kit и загружали в генетический анализатор ABI3500 для проведения капиллярного фореаза.

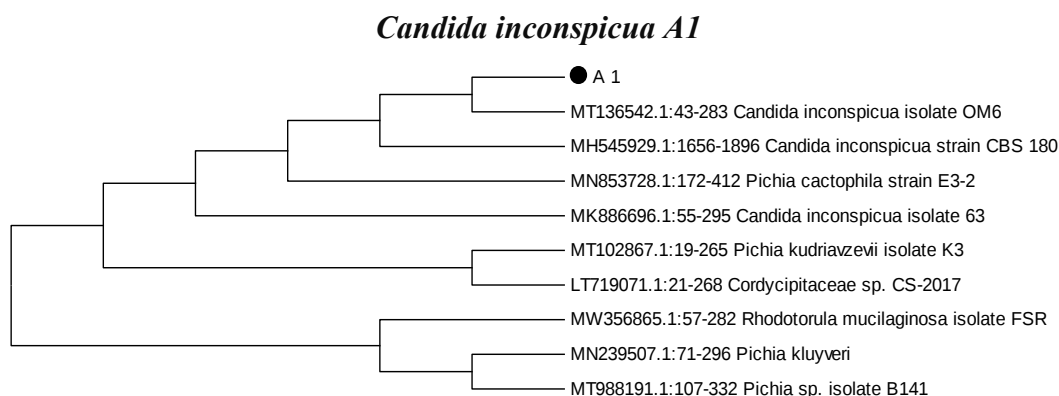
Нуклеотидные последовательности 16S rRNA гена идентифицируемых штаммов были анализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqaA (Applied Biosystems). После получения нуклеотидной последовательности протяжённостью около 600 п.н., была проведена идентификация в Международной базе данных GeneBank по алгоритму BLAST.

Нуклеотидные последовательности и результаты филогенетического анализа последовательностей гена 16S rRNA изучаемых штаммов представлены в виде деревьев, построенных в программе MEGA6, с использованием Neiighbor-Joining кластерного метода расчета генетических расстояний.

Филогенетическое дерево, построенное путем сравнения *ITS* региона исследуемого образца с последовательностями референтных штаммов, размещенных в Международной базе данных Blast.



Степень гомологии с ближайшим штаммом NR 113960.1:91-767 *Lactococcus lactis* strain NBRC 100933 составила 100,00%.



Степень гомологии с ближайшим штаммом MT136542.1:43-283 *Candida inconspicua* isolate OM6 составила 100,0%.

Проведенные исследования по изучению морфолого-культуральных свойств культур дрожжей и молочнокислых бактерий традиционными методами и результаты ПЦР-анализа позволили отнести штаммы дрожжей и молочнокислой бактерий к следующим видам: штамм M1 *Lactococcus lactis*, A1 *Candida inconspicua*.

Закключение

Исходя из результатов исследовательской работы, можно сделать следующие выводы:

1. В результате изучения органолептических свойств молочной сыворотки было показано, что молочная сыворотка ТОО «Меркенский сырный завод» и ТОО «Amiran» имели чистый молочный вкус и молочный запах, консистенция однородная непрозрачная жидкость без осадков, цвет от белого до светло-желтого. Молочная сыворотка «ТОО Stella Alpina» имеет соленый вкус сырный запах, с однородной

консистенции непрозрачная жидкость без осадков и хлопьев, цвет желтоватый или бледно-зеленый;

2. Согласно результатам исследования физико-химических свойств образцов сыворотки, все показатели выборки составили предельное количество, процентное содержание жира $0,2 \pm 0,008\%$, процентное содержание белка $0,8 \pm 0,032\%$, процентное содержание углеводов $3,2/3,5 \pm 0,14\%$, а энергетическая ценность составила $20 \pm 0,8$ ккал, а количество, приходящееся на титровую кислотность и кислотность активности в то время как максимальная титрическая кислотность в 72 часа составляла 90-114 т сырной сыворотки Мерке, самый низкий показатель-19-23 Т сыворотки Stella Alpina. Ну а по кислотности активности определяли показатель pH образцов. Согласно ему, максимальный показатель кислотности ТОО Stella Alpina (подсырная сыворотка) за 24 часа составил 5,6 значения, а минимальный-72 часа ТОО «Меркенский сырный завод» значение pH равнялось 4;

3. В результате изучения динамики роста дрожжевых культур на молочной сыворотке все штаммы показали высокую интенсивность накопления биомассы. Среди штаммов высокую биохимическую активность в отношении молочной сыворотки показал штамм *Lactococcus lactis* M1, количество их клеток составило $2,1 \times 10^9$ КТБ/мл. А у штамма *Candida inconspicua* A1 количество клеток были в пределах $1,7 \cdot 10^9$ - $1,9 \times 10^9$ КТБ/мл;

4. Проведен молекулярно-генетический анализ штаммов, выделенных из образцов молочной сыворотки, штаммы M1- *Lactococcus lactis*, A1- *Candida inconspicua* были идентифицированы до вида.

Проведенная исследовательская работа позволяет использовать образцы сыворотки в различных областях путем безотходной обработки. В том числе, мы считаем, что применение сыворотки в производстве биоэтанола является широкомасштабным, современным, перспективным направлением. Исследовательская работа выполнена в рамках проекта №0221РК00252 ИРН АР09258285 «Получение биоэтанола путем непрерывной ферментации молочной сыворотки с использованием иммобилизованных клеток дрожжей», финансируемого МОН РК.

References:

1. Sebastián-Nicolás J.L., González-Olivares L.G., Vázquez-Rodríguez G.A., Lucho-Constantino Carlos A., Castañeda-Ovando A., Cruz-Guerrero A.E. (2020) Valorization of whey using a biorefinery. *Biofuels*, *Bioprod Biorefn* 14(5):1010–1027. <https://doi.org/10.1002/bbb.2100>
2. Ariyanti D., Aini A.P., Pinundi D.S. (2014) Optimization of ethanol production from whey through fed-batch fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. *Energy Proc* 47:108–112
3. Christensen A.D., Kádár Z., Oleskowicz-Popiel P., Thomsen M.H. (2011) Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38(2):283–289
4. Alexandre, M.P., Gondim, Diego, R.G. and Luciana, R.B.G. (2009) Ethanol Production by Fermentation Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* in Cashew Apple Bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 10, pp. 706-714.
5. Ghaly A.E., El-Taweel A.A. Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey. *Biomass. Bioener* 1997;12:461–72
6. Peregudov, S.S. Othody v dohody / S.S. Peregudov // *Torgpred* - 2005. - № 1. - S. 28.
7. Ozmihi S., Kargi F. Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times. *Biochem Eng J* 2008 ;42(1):180–5.
8. Lijuan G. Rice straw fermentation using lactic acid bacteria // *Bioresource Technology*. – 2008. - № 99 (8). – P. 2742 – 2748.
9. Paul J. Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. – 2008. – № 11(1). – P. 40-44

10. Dale Bruce E. Lignocellulose conversion and the future of fermentation biotechnology // Trends Biotchnol. - 2000. -Vol.5. № 10. - P.287-291.
11. Norman F. Fermented cereals a global perspective // FAO agricultural services bulletin. - №138. - 2009. – P. 268.
12. Efimova M.V. Vvedenie v prikladnuyu biotekhnologiyu. - Petropavlovck: KamchatGTU. - 2004. - 96 c.
13. Tarabukin D.V. Fermentativnye tekhnologii napravlennoj biokonvercii cellyulozo- i krahmalcoderzhashchego ractitel'nogo syr'ya: avtoref. dic. ... kand. biol. nauk: 03.00.23. Inctitut biologii Ufimckogo nauchnogo centra RAN. – Ufa. - 2009. – S. 26.
14. Dedkov V.N. Razrabotka biotekhnologii kormovogo belka iz ractitel'nogo syr'ya: dic. ... kand. tekhn. nauk: 03.01.06. Orlovckij gocudarctvennyj agrarnyj univercitet. – Voronezh. - 2014. - S. 146.
15. Carlsson R. Amaranth species and related species for leaf protein concentrate production //Proceedings of 1st Amaranth conf., Rodale Press Inc., Emma.