

## ІЗОЛЯЦІЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАКТОЗОФЕРМЕНТУЮЧИХ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA KEFYR*

Проведено скринінг лактозоферментуючих штамів дріжджів серед 162 штамів, ізольованих з різних рослин, та 28 штамів, виділених з сиру. Чотири штами дріжджів ферментували лактозу та були ідентифіковані як *Candida kefyр*. Питома активність  $\beta$ -галактозиди досліджених штамів складала 1501–2113 МО/г сухої біомаси. Здатність штамів *C. kefyр* C24 та C30 продукувати етанол з лактози значно пригнічувалась при високій концентрації субстрату (100 г/л).

**Ключові слова:** ферментація лактози, *Candida kefyр*, етанол.

**Вступ.** Сироватка – це рідка фракція молока, що утворюється як побічний продукт сироваріння та складає до 83 % усього об'єму молока, що використовується для продукування сиру. Основною поживною речовиною сироватки є лактоза, концентрація якої становить зазвичай 4–5 % [1]. Низька концентрація цукру в сироватці робить безпосереднє виділення лактози економічно не вигідним через невисокий вихід кінцевого продукту – етанолу, водночас сироватка як основний побічний продукт виробництва сиру повинна утилізуватися. Одним з альтернативних шляхів її утилізації є отримання етанолу з лактози сироватки, що дозволить водночас вирішити проблему забруднення навколишнього середовища відходами виробництва сиру та отримати важливий продукт – етанол [2].

Здатність ферментувати лактозу мають лише окремі види дріжджів, переважно *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyр* (анаморф виду *K. marxianus*) та *Kluyveromyces lactis*. Ці види можна виділити із різноманітних джерел – від молочних продуктів до ґрунту та легенів хворого туберкульозом [3].

Метою даної роботи було провести ізоляцію та селекцію штамів дріжджів, здатних фер-

ментувати лактозу, з різних природних та виробничих джерел.

**Матеріали і методи.** Ізоляцію штамів з рослин проводили на агаризованому середовищі YPD, яке містило (г/л): дріжджовий екстракт – 10, глюкоза – 10, пептон – 20, агар-агар – 20. Для інгібування росту бактерій в середовище додавали 40 мг/л стрептоміцину. Окремі квіти вагою 1 г культивували в пробірках, що містили 10 мл середовища YPD при 25 °С на качалках при 250 об/хв впродовж 3 діб. Серійні розведення висівали на агаризоване середовище YPD з 40 мг/л стрептоміцину.

Для ізоляції дріжджів з сиру використовували середовище YGC, яке містило (г/л): дріжджовий екстракт – 5, глюкоза – 20, агар-агар – 15, хлорамфенікол – 0,1. До 45 мл 0,9%-ного розчину NaCl додавали 5 г сиру, подрібнювали у гомогенізаторі MPW-302 та висівали відповідні розведення на чашки Петрі з агаризованим середовищем YGC.

Чашки культивували при 30 °С протягом 7 діб. Відбирали окремі різні за морфотипом колонії мікроорганізмів та під мікроскопом перевіряли їхню належність до дріжджів.

У роботі використовували 162 штами дріжджів, ізольованих з різних рослин, та 28 штамів дріжджів, ізольованих з сирів (табл. 1), а також штами дріжджів з Української колекції мікроорганізмів: *K. marxianus* УКМ Y-2096, Y-2388, Y-303, Y-308, Y319, Y-320, *K. lactis* УКМ Y-327.

Здатність ізольованих штамів дріжджів до ферментації лактози досліджували у трубках Дунбара. Дріжджі культивували в 0,5%-ному розчині дріжджового екстракту, який містив 2 % лактози, протягом 28 діб при температурі 25 °С, а також при температурі 42 та 48 °С впродовж 7 діб.

Ідентифікацію ізольованих штамів дріжджів здійснювали за морфолого-фізіологічними характеристиками [3]. Використовували також ко-

мерційну систему API 20C AUX («Biomérieux», Франція) згідно з рекомендаціями виробника, а саме: лунки стрипів API 20C AUX засівали дріжджовою суспензією та культивували впродовж 48–72 год при 30 °C [4]. Облік результатів здійснювали за допомогою порівняння росту штамів з негативним контролем. Для інтерпретації результатів використовували комп'ютерне забезпечення APILAB PLUS («Biomérieux», Франція).

Здатність дріжджів використовувати лактозу як джерело вуглецю досліджували на середовищі С1 наступного складу (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3,  $\text{MgSO}_4$  – 0,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1, дріжджовий екстракт – 3. Як єдине джерело вуглецю додавали лактозу (30 та 100 г/л). Ферментацію проводили у флаконах, що містили середовище в об'ємі 450 мл. Для створення мікроаерофільних умов флакони закривали гумовими пробками з водними затворами, в середовище додавали тіогліколят натрію в концентрації 200 мг/л. В колби вносили 1 % (об.) культури дріжджів, вирощеної при 30 °C в середовищі С1 протягом 18–20 год. Культивування проводили при температурі 30 °C, рН 5, в стаціонарних умовах (в термостаті),

Концентрацію лактози визначали за допомогою колориметричного методу з динітросаліциловою кислотою [5]. Культуральну рідину центрифугували при 6000 g впродовж 5 хв, потім 3 мл супернатанту, розведеного у необхідну кількість разів, змішували з 3 мл реагенту DNS (1 г динітросаліцилової кислоти змішували з 200 мг кристалічного фенолу та 500 сульфату натрію у 100 мл 1%-ного гідроксиду натрію). Витримували 5 хв на киплячій водяній бані. Охолоджували та додавали 1 мл 40%-ного розчину гартрату натрію–калію. Вимірювали оптичну густина при 540 нм. Концентрацію цукру визначали за калібровочним графіком.

Концентрацію етанолу в середовищі визначали на газовому хроматографі «Хром-5» з полум'яно-іонізаційним детектором, газ-носії – гелій, 80 °C. Швидкість носія – 20 мл/хв.

Питому активність  $\beta$ -галактозидази визначали з використанням субстрату о-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактопіранозиду (ONPG) [6]. Відцентрифуговані клітини (1 мл культуральної рідини) розводили в Z-буфері (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ), до 1 мл суспензії додавали 50 мкл хлороформу та 50 мкл 0,1 % SDS для пермеабілізації клітин, витри-

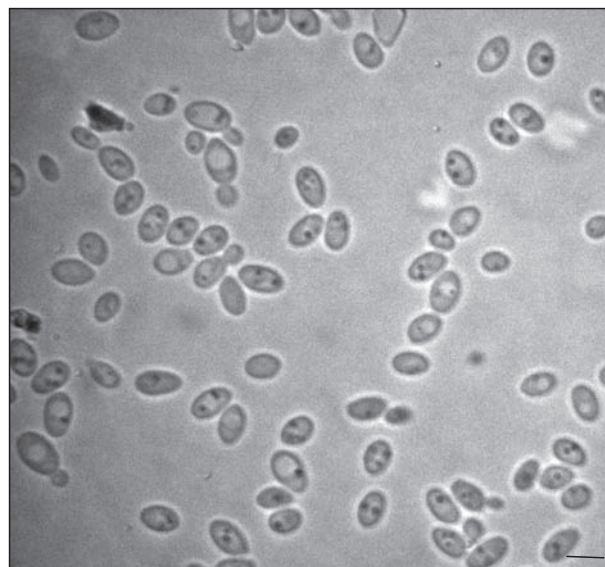
Таблиця 1. Ізоляція дріжджів з різних природних та виробничих джерел

Джерело ізоляції	Кількість ізольованих штамів	Джерело ізоляції	Кількість ізольованих штамів
Мати-й-мачуха <i>Tussilago farfara</i>	13	Горобина звичайна <i>Sorbus aucuparia</i>	5
Глід м'якуватий <i>Crataegus submollis</i>	9	Конюшина <i>Trifolium sp.</i>	11
Фіалка запашна <i>Viola odorata</i>	11	Шипшина собача <i>Rosa canina L.</i>	14
Магнолія <i>Magnolia sp.</i>	2	Спірея <i>Spiraea sp.</i>	3
Анемона жовтецева <i>Anemone ranunculoides</i>	3	Калина <i>Viburnum sp.</i>	11
Кульбаба лікарська <i>Taraxacum officinale</i>	7	Акація біла <i>Robinia pseudoacacia L.</i>	7
Собача кропива п'ятилопатева <i>Leonurus quinquelobatus</i>	3	Медоносна бджола (українська степова) <i>Apis mellifera</i>	8
Форзиція європейська <i>Forsythia europae</i>	10	Пилок	12
Абрикос <i>Armeniaca vulgaris</i>	6	Сир Дуплет Білозгар, Літинський молокозавод	4
Чистотіл звичайний <i>Chelidonium majus</i>	1	Сир Твердий Едам, ВАТ «Дубнмолоко»	7
Вероніка лікарська <i>Veronica officinalis L.</i>	10	Сир Мармуровий, ТУ «Добряна»	2
Жовтушник прямий <i>Erysimum cheiranthoides</i>	1	Сир Російський, ТОВ «Кременецьке молоко»	4
Бузок звичайний <i>Syringa vulgaris</i>	7	Сир Радамер, ВАТ «ШММК»	4
Гірकोкаштан звичайний <i>Aesculus hippocastanum</i>	7	Сир Король Артур, «Мілкіленд»	4
Тюльпан <i>Tulipa gesneriana</i>	1	Сир Голандський класичний, ВАТ «ШММК»	3

мували суміш 15 хв при 30 °С, додавали 0,2 мл 0,04%-ного розчину ONPG та інкубували при 30 °С до появи вираженого жовтого кольору. Реакцію зупиняли додаванням 0,4 мл 1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Суспензію центрифугували при 5000 г 3 хв та вимірювали вивільнений о-нітрофенол на спектрофотометрі КФК-2 при 420 нм. Одна міжнародна одиниця питомої активності β-галактозидази відповідала кількості ферменту, необхідного для утворення 1 мкмоль о-нітрофенолу за 1 хв за умов реакції. Питому активність β-галактозидази визначали в клітинах дріжджів, які культивували в середовищі С1, яке містило 30 г/л лактози як єдине джерело вуглецю.

**Результати досліджень та їх обговорення.** З 29 різних видів рослин ізольовано 162 штами дріжджів. Жоден з штамів не ферментував лактозу при 25 °С. З восьми різних видів сиру було ізольовано 29 різних штамів дріжджів. Лише 4 штами були здатні ферментувати лактозу при 25 °С (табл. 2).

За класичними фенотиповими ознаками проведено ідентифікацію цих штамів, зазначених як С21, С23, С24 та С30. Клітини овальні, еліпсоїдальні або циліндричні, розмір клітин складав (2–4) × (2,5–6) мкм (рисунок). Клітини зазвичай поодинокі. Колонії з маслянистим блиском, кремові, з часом набували світло-коричневого кольору. Спороутворення не спостерігали, псевдоміцелій не утворювався. Характеристика цих штамів за фізіологічними ознаками наведена у табл. 3. Досліджені штами були здатні асимілювати як єдине джерело вуглецю глюкозу, галактозу, рафінозу, лактозу, сахарозу, сорбіт, маніт, гліцерин, етанол, бурштинову та молочну кислоту. Не росли вони на середовищі з мелібіозою, целобіозою, ксилозою, D-арабінозою, L-арабінозою, рибозою, трегалозою, рамнозою, еритритом, манітом, інозитом, рибітом, метил-глюкозидом, D-глюкозаміном, глюконатом, лимонною кислотою, гексадеканоном, глюконо-лактоном, саліцином, крохмалем, дульцитом та глюкуроновою кислотою. Асиміляція мальтози, меліцитози, сорбози, ксиліту, N-ацетил-глюкозаміну та інуліну варіювала для досліджених штамів. Вони ферментували глюкозу, галактозу, сахарозу, лактозу та рафінозу, але не мальтозу, ксилозу, целобіозу, мелібіозу, меліцитозу, трегалозу, інулін, крохмаль



Клітини штаму *C. kefyri* C21, 24 год культивування

та метил-глюкозид. Не асимілювали нітрати та нітрити як єдине джерело нітрогену, але утилізували кадаверин, а також були здатні до росту в середовищі без вітамінів.

Крім того, нами проведено ідентифікацію лактозоферментуючих штамів С21, С23, С24 та С30 за допомогою комерційної системи API 20C AUX («Biomeгіеux», Франція). За морфолого-фізіологічними ознаками та результатами ідентифікації із використанням системи API 20C AUX всі чотири штами віднесено до виду *Candida kefyri*.

В подальшому ми дослідили здатність цих штамів дріжджів ферментувати лактозу при високих температурах (42 та 48 °С). Отримання етанолу за допомогою термотолерантних штамів дріжджів може мати ряд переваг, а саме: зниження можливості інфікування бродильного

Таблиця 2. Лактозоферментуючі штами дріжджів, ізольовані з сирів

Штам	Джерело ізоляції	Ферментація лактози
С21	Сир Радамер, ВАТ «ШММК»	++++
С23	Сир Радамер, ВАТ «ШММК»	++++
С24	Сир Радамер, ВАТ «ШММК»	++++
С30	Сир Король Артур, «Мілклєнд»	++++

процесу, економія енергії завдяки зниженню витрат на охолодження, зменшення кількості зупинок на виробництві через проблеми з перегрівом та зниження об'ємів стічних вод [7]. Жоден з штамів не ферментував лактозу при 48 °С, а при 42 °С спостерігалось слабке ферментування (табл. 4). Отже, ізольовані штами не є термотолерантними.

Фермент β-галактозидаза є невід'ємною частиною процесу катаболізму лактози та відповідає за гідроліз дисахариду лактози на моноцукри – глюкозу та галактозу. Одним з перспективних

шляхів утилізації сироватки пропонується використання її як поживного середовища для отримання β-галактозидази [8, 9]. Для штаму *K. marxianus* UFV-3, який характеризувався високою зброджувальною активністю, встановлена кореляція між активністю β-галактозидази та продукуванням етанолу [10]. Тому нами була визначена активність β-галактозидази відібраних лактозоферментуючих штамів дріжджів. В середовищі з додаванням 200 мг/л тіогліколяту натрію через 24 год культивування питома активність β-галактозидази штамів *S. kefir* C21,

Таблиця 3. Зброджування та асиміляція цукрів ізольованими штамами дріжджів

Зброджування, асиміляція джерел вуглецю та нітрогена	Штам				Зброджування, асиміляція джерел вуглецю та нітрогена	Штам			
	C21	C23	C24	C30		C21	C23	C24	C30
Зброджування									
Глюкоза	+	+	+	+	Мелібіоза	–	–	–	–
Галактоза	+	+	+	+	Меліцитоза	–	–	–	–
Мальтоза	–	–	–	–	Целобіоза	–	–	–	–
Сахароза	+	+	+	+	Трегалоза	–	–	–	–
Лактоза	+	+	+	+	Інулін	–	–	–	–
Рафіноза	+	+	+	+	Крохмаль	–	–	–	–
D-ксилоза	–	–	–	–	α-метил-D- глюкозид	–	–	–	–
Асиміляція									
Глюкоза	+	+	+	+	Рибіт	–	–	–	–
Мальтоза	–	–	+	–	Гліцерин	+	+	+	+
Меліцитоза	D	–	+	–	Етанол	+	+	+	+
Галактоза	+	+	+	+	α-метил-D-глюкозид	–	–	–	–
Рафіноза	+	+	+	+	N-ацетил-глюкозамін	+	–	–	–
Мелібіоза	–	–	–	–	Інулін	±	–	+	–
Целобіоза	–	–	–	–	D-глюкозамін	–	–	–	–
D-ксилоза	–	–	–	–	Бурштинова кислота	+	+	+	+
Сорбоза	–	+	+	–	Молочна кислота	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	Глюконат натрію	–	–	–	–
D-арабіноза	–	–	–	–	Лимонна кислота	–	–	–	–
L-арабіноза	–	–	–	–	Гексадекан	–	–	–	–
Рибоза	–	–	–	–	Глюконо-лактон	–	–	–	–
Трегалоза	–	–	–	–	Саліцин	–	–	–	–
Сахароза	+	+	+	+	Крохмаль	–	–	–	–
Рамноза	–	–	–	–	Дульцит	–	–	–	–
Ксиліт	–	–	+	±	Глюкуронова кислота	–	–	–	–
Сорбіт	+	+	+	+	Нітрати	–	–	–	–
Еритрит	–	–	–	–	Нітрити	–	–	–	–
Маніт	+	+	+	+	Кадаверин	+	+	+	+
Інозит	–	–	–	–	Ріст в середовищі без вітамінів	+	+	+	+

Примітка. «+» – асиміляція або ферментація, «–» – не асимілює, «±» – слабка асиміляція, D – повільна асиміляція.

C23, C24 та C30 складала 8,92; 8,78; 9,09 та 9 міжнародних одиниць (МО)/мл культуральної рідини відповідно, або 2026,5; 1568,45; 2113,95 та 1501 МО/г сухої біомаси (табл. 5). Такий рівень питомої активності β-галактозидази досліджуваних штамів можна порівняти з даними інших авторів. Так, в роботі Furlan et al. [11] β-галактозидазна активність штаму *K. marxianus* CDB 002 в умовах лімітування кисню становила 0,7–11 од./мл, хоча за умов інтенсивної аерації активність ферменту підвищувалась в 2–3 рази. Активність β-галактозидази штаму *K. marxianus* M4 складала 900 од./г сухої біомаси [12]. Подібний рівень активності β-галактозидази лактозоферментуючих дріжджів спостерігали й інші автори [9, 13].

Ріст відібраних штамів в середовищі, що містить лактозу як єдине джерело вуглецю, перевіряли на качалках при 207 об/хв при 30 °C в мікроаеробних умовах (табл. 6). Через 24 год культивування штамів *C. kefir* C21, C23, C24 та C30 накопичення біомаси дорівнювало 4,4; 5,6; 4,3 та 6 г/л відповідно. Досліджені штами активно утилізували лактозу – до 99 % за 24 год культивування.

При культивуванні штамів *C. kefir* C21, C23, C24 та C30 в середовищі, що містило лактози 30 г/л, в мікроаеробних умовах (з додаванням в середовище 200 мг/л тіогліколяту натрію) протягом 3 діб на качалках при 207 об/хв концентрація етанолу складала 12,51–14,74 г/л (табл. 7).

Продуктування етанолу дослідженими штамми помітно не відрізнялося, найкращими продуцентами етанолу за даних умов були штами *C. kefir* C24 та C30 – кількість синтезованого етанолу 14,09 та 13,96 г/л відповідно. Через 24 год культивування в мікроаеробних умовах концентрація етанолу в середовищі досягала 10,2–12,3 г/л, що становить 82,1–87,5 % кінцевого виходу етанолу (72 год культивування). Теоретичний вихід етанолу ( $Y_{p/s}$ ) з лактози складає 0,538 г спирту на 1 г цукру [14], тобто досліджені штами продукували етанол на рівні 0,42–0,47 г етанолу на 1 г лактози, або 77,5–87,3 % від теоретично можливого. Такі показники свідчать про перспективність виділених штамів, якщо порівняти їх з даними інших авторів. Так, штам *K. marxianus* UFV-3 продукував етанолу 0,1–0,348 г на 1 г лактози в

аеробних умовах та 0,2–0,535 – в мікроаеробних умовах, а при концентрації лактози в середовищі 25 г/л (що порівняно з концентрацією лактози, використаній в даній роботі – 30 г/л) вихід етанолу становив 0,105 г/г субстрату в аеробних умовах та 0,406 г/г субстрату в мікроаеробних умовах [15]. Подібний рівень продукування етанолу показаний для штамів *K. marxianus* KD-15 [16], *K. fragilis (marxianus)* KF-1 [17], *K. marxianus* CBS 397 [18].

Відомо, що підвищення концентрації субстрату може як стимулювати [15], так і пригнічувати [19] продукування етанолу кльовероміцетами. Нами досліджено здатність ізольованих штамів *C. kefir* C24 та C30, які були

Таблиця 4. Ферментація лактози свіжоізольованими штамми дріжджів при підвищеній температурі

Штам <i>C. kefir</i>	Ферментація лактози	
	42 °C	48 °C
C21	±	–
C23	±	–
C24	±	–
C30	±	–

Таблиця 5. β-галактозидазна активність лактозоферментуючих штамів *C. kefir* в мікроаеробних умовах

Штам <i>C. kefir</i>	β-галактозидазна активність	
	МО/мл	МО/г біомаси
C21	8,92 ± 0,23	2026,50 ± 52,49
C23	8,78 ± 0,23	1568,45 ± 41,24
C24	9,09 ± 0,24	2113,95 ± 56,39
C30	9,00 ± 0,21	1501,00 ± 35,21

Таблиця 6. Накопичення біомаси та асиміляція лактози ізольованими штамми дріжджів

Штам <i>C. kefir</i>	Накопичення біомаси, г/л	Залишкова лактоза, г/л
C21	4,4 ± 0,15	0,62 ± 0,03
C23	5,6 ± 0,35	0,69 ± 0,04
C24	4,3 ± 0,10	0,68 ± 0,02
C30	6,0 ± 0,30	0,38 ± 0,03

кращими продуцентами етанолу з лактози, та ряду колекційних лактозоферментуючих штамів Української колекції мікроорганізмів ферментувати лактозу в концентрації 100 г/л (табл. 8). За 5 діб культивування досліджені дріжджі асимілювали від 71,89 % (штам *K. marxianus* Y-2096) до 24,78 % лактози (*K. lactis* Y-327), присутньої в середовищі. Переважна більшість досліджених штамів асимілювали лише до 40 % доступного субстрату. Встановлено, що найбільш активні продуценти етанолу серед дев'яти досліджених штамів – *K. marxianus* Y-2096 та 2388, за 5 діб культивування продукували 38,2 та 32,1 г/л етанолу відповідно, вихід етанолу  $Y_{p/s}$  становив 0,53, або 98,4–98,8 % від теоретично можливого. Найменш активні продуценти етанолу – штами

*K. marxianus* 308 та *K. lactis* 327, які продукували 12,75 та 12,07 г/л етанолу, або 61,73 та 90,19 % від теоретично можливого відповідно. Ізольовані з сиру штами *C. kefir* C24 та C30 характеризувалися доволі низьким рівнем продукування етанолу в порівнянні з колекційними штамми дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-2096 та 2388. Таке пригнічення може бути зумовлено як осмотичною чутливістю досліджених штамів [20], так і відносно низькою стійкістю цих штамів до кінцевого продукту – етанолу [21].

Ізольовані з сиру штами *C. kefir* C21, C23, C24 та C30 активно ферментували лактозу та синтезували етанол при низькій концентрації субстрату (30 г/л), однак при підвищенні концентрації лактози до 100 г/л продукування етанолу дослідженими штамми значно зни-

Таблиця 7. Продукування етанолу штамми *C. kefir* при мікроаеробних умовах

Штам <i>C. kefir</i>	Мікроаеробні умови культивування				
	24 год		72 год		
	Концентрація етанолу, г/л	% від теоретичного	Концентрація етанолу, г/л	% від теоретичного	Вихід етанолу, г/г лактози
C21	11,55 ± 0,94	71,56	12,60 ± 1,57	78,06	0,420
C23	10,28 ± 1,01	63,69	12,52 ± 0,88	77,57	0,417
C24	12,33 ± 1,71	76,39	14,09 ± 0,58	87,29	0,469
C30	11,15 ± 0,30	69,08	13,96 ± 0,86	86,49	0,465

Таблиця 8. Продукування етанолу з лактози штамми дріжджів

Показник	Штам дріжджів								
	<i>K. marxianus</i> 2096	<i>K. marxianus</i> 2388	<i>K. marxianus</i> 303	<i>K. marxianus</i> 308	<i>K. marxianus</i> 319	<i>K. marxianus</i> 320	<i>K. lactis</i> 327	<i>C. kefir</i> C24	<i>C. kefir</i> C30
Залишкова лактоза, г/л	28,11	39,82	63,79	61,74	65,06	62,06	75,21	69,04	66,49
Концентрація етанолу, г/л	38,23	32,13	13,81	12,75	14,75	18,05	12,07	14,19	13,6
$Y_{p/s}$ (г етанолу/г лактози)	0,53	0,53	0,38	0,33	0,42	0,47	0,49	0,46	0,4
$Y_{\%T}$ (% від теоретично можливого)	98,47	98,8	70,61	61,73	78,2	88,09	90,19	84,88	75,18
Продуктивність синтезу етанолу, г/л-год	0,32	0,27	0,11	0,11	0,12	0,15	0,1	0,12	0,11

жувалось. Отже, через низький синтез кінцевого продукту при підвищенні концентрації субстрату ці штами не можуть бути рекомендовані для утилізації сироватки з метою отримання етанолу.

*O.D Ianieva, G.O. Voronina,  
V.S. Pidgroskyi*

Zabolonty Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv  
E-mail: yandol@ukr.net

#### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LACTOSE-FERMENTING YEASTS *CANDIDA KEFYR*

The search for lactose-fermenting yeast strains has been conducted among 162 strains isolated from various plants and 28 yeast strains isolated from cheese. Four yeast strains have been shown to ferment lactose. They have been identified as *Candida kefir*. Specific  $\beta$ -galactosidase activity of the studied strains grown on lactose-containing medium was 1501–2113 U/g cell. The ethanol production by strains *C. kefir* C24 and C30 was significantly inhibited by the increase in substrate concentration (100 g/l).

*О.Д. Янева, А.А. Воронина,  
В.С. Подгорский*

#### ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАКТОЗОФЕРМЕНТИРУЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA KEFYR*

Проведен скрининг лактозоферментирующих штаммов дрожжей среди 162 штаммов, изолированных из различных растений, и 28 штаммов, изолированных из сыра. Четыре штамма дрожжей сбраживали лактозу и были идентифицированы как *Candida kefir*. Удельная  $\beta$ -галактозидазная активность исследуемых штаммов составляла 1501–2113 ед./г сухой биомассы. Синтез этанола штаммами *C. kefir* C24 и C30 значительно снижался при высокой концентрации субстрата (100 г/л).

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Siso M.I.G.* The biotechnological utilization of cheese whey: a review // *Biores. Technol.* – 1996. – **57**, № 1. – P. 1–11.
2. *Guimarães P.M., Teixeira J.A., Domingues L.* Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey // *Biotechnol. Adv.* – 2010. – **28**, № 3. – P. 375–384.
3. *The Yeasts* – A Taxonomic Study / Eds C.P. Kurtzman, J.W. Fell). – Amsterdam etc.: Elsevier, 1998. – 1055 p.

4. *Pereira A.P., Pereira J.A., Bento A., Estevinho M.L.* Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects // *Food Chem. Toxicol.* – 2008. – **46**, № 8. – P. 2895–2902.
5. *Miller G.L.* Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Anal. Chem.* – 1959. – **31**, № 3. – P. 426–428.
6. *Miller J.H.* Assay of  $\beta$ -galactosidase // *Experiments in molecular genetics.* – New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. – P. 352–355.
7. *Banat I.M., Nigam P., Singh D. et al.* Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations. 1. Yeasts in general // *World J. Microb. Biot.* – 1998. – **14**, № 6. – P. 809–821.
8. *Braga A.R.C., Gomes P.A., Kalil S.J.* Formulation of culture medium with agroindustrial waste for  $\beta$ -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 // *Food Bioprocess Technol.* – 2012. – **5**, № 5. – P. 1653–1663.
9. *Rollini M., Trinetta V., Musatti A., Manzoni M.* Influence of substrate on  $\beta$ -galactosidase production by *Kluyveromyces* strains // *Ann. Microb.* – 2008. – **58**, № 4. – P. 705–710.
10. *Diniz R.H., Silveira W.B., Fietto L.G., Passos F.M.* The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2012. – **101**, № 3. – P. 541–550.
11. *Furlan S.A., Schneider A.L.S., Merkle R. et al.* Formulation of a lactose-free, low-cast culture medium for the production of  $\beta$ -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* // *Biotechnol. Lett.* – 2000. – **22**, № 7. – P. 589–593.
12. *Rajoca M.I., Latif F., Khan S., Shahid R.* Kinetics of improved productivity of  $\beta$ -galactosidase by a cycloheximide-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus* // *Biotechnol. Lett.* – 2004. – **26**, № 9. – P. 741–746.
13. *Schneider A.L.S., Merkle R., Carvalho-Jonas M.F. et al.* Oxygen transfer on  $\beta$ -D-galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using sugar cane molasses as carbon source // *Biotechnol. Lett.* – 2001. – **23**, № 7. – P. 547–550.
14. *Kargi F., Ozmihci S.* Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters // *Enzyme Microb. Technol.* – 2006. – **38**, № 5. – P. 711–718.
15. *Silveira W.B., Passos F.J.V., Mantovani H.C., Passos F.M.L.* Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels // *Enzyme Microb. Technol.* – 2005. – **36**, № 7. – P. 930–936.

16. Oda Y., Nakamura K., Shinomiya N., Ohba K. Ethanol fermentation of sugar beet thick juice diluted with crude cheese whey by the flex yeasts *Kluyveromyces marxianus* // Biomass Bioenergy. – 2010. – **34**, № 8. – P. 1263–1266.
17. Dragone G., Mussatto S.I., Silva J.B.A., Teixeira J.A. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder // Biomass Bioenergy. – 2011. – **35**, № 5. – P. 1977–1982.
18. Sansonetti S., Curcio S., Calabro V., Iorio G. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective non-vegetable source // Biomass Bioenergy. – 2009. – **33**, № 12. – P. 1687–1692.
19. Ozmihci S., Kargi F. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations // Bioresour. Technol. – 2007. – **98**, № 16. – P. 2978–2984
20. Grubb C.F., Mawson A.J. Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113 // Biotechnol. Lett. – 1993. – **15**, № 6. – P. 621–626.
21. Rosa M.F., Sá-Correia I. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* // Enzyme Microb. Technol. – 1992. – **14**, № 1. – P. 23–27.

Надійшла 14.05.12