

**А. М. Скорогумова**

**ДРОЖЖИ  
МОЛОКА  
И  
МОЛОЧНЫХ  
ПРОДУКТОВ  
И ИХ  
ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ  
ЗНАЧЕНИЕ**

**ИЗДАТЕЛЬСТВО  
«ПИЩЕВАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ»  
МОСКВА · 1969**

## Определение спирта

В начале работы по определению спирта мы остановились на методе, предложенном Никлю, титрования спирта двуххромовокислым калием до появления оливково-зеленого окрашивания, методе, более пригодном для определения малых количеств спирта. При более высоких концентрациях спирта отгоны разбавляли в 10—50 раз (подробнее метод см. Н. И. Иванов, 1932).

Позднее, с разработкой флотационного метода определения спирта, пользовались флотационным методом (изложен в «Практическом руководстве по технической микробиологии молока и молочных продуктов», Скороумова, 1963).

## Определение летучих жирных кислот и молочной кислоты

Летучие жирные кислоты, образующиеся при спиртовом брожении, определяли по методу Дюкло, а молочную кислоту — по методу Фридемана (см. «Большой практикум по микробиологии», Аристовская Т. В. и др., 1962, стр. 220 и 317).

## Определение сбраживания углеводов

В трубки Дунбара разливали среду Ганзена (1000 мл дистиллированной воды, 10 г лептона, 3 г фосфорнооднокалиевой соли, 2—5 г сернокислого магния и 2% испытуемого углевода). Трубки со средой подвергали дробной стерилизации.

В трубки со средой вносили испытуемую культуру и посев выдерживали при 25° С. Через 3—4 суток наблюдали за образованием газа. Накопление газа в закрытом колене указывало на способность исследуемых 'дрожжей сбраживать внесенный в среду углевод.

## Определение гидролиза жира микроорганизмами

Способность дрожжей гидролизовать жир определяли по изменению кислотности жира. Для этого использовали два метода: определение изменения кислотности жира путем титрования; определение изменения кислотности жира на плотной среде по показанию индикатора (бромтимолблау). Эти методы изложены в «Практиче-

ском руководстве по технической микробиологии молока и молочных продуктов», Скородумова, 1963, стр. 75.

Дрожжи, сбраживающие лактозу, в течение 3 суток культивирования на плотной среде с жиром росли слабо, не изменяли окраски среды или вызывали заметное посинение. Дрожжи, гидролизующие жир, давали вокруг штрихов ярко-желтое окрашивание.

## Изучение динамики спиртового брожения по выделению $\text{CO}_2$

Колбы с 250 мл стерильного обезжиренного молока заражали исследуемой культурой дрожжей, закрывали каучуковой пробкой, снабженной затвором Мейссля и клапаном Бунзена и выдерживали при  $25^\circ\text{C}$ . Колбы как контрольную, так и опытные ежедневно взвешивали. Потеря в весе показывала количество углекислоты, выделяемой при брожении за определенное время. Расчет в табл. 8 и 9 дан на 100 мл.

## Определение влияния рН.

При определении влияния различных величин рН на развитие дрожжей пользовались жидкой синтетической средой с 2% глюкозы (см. рецепт среды в описании ауксанографического метода). Подкисляли среду молочной кислотой, подщелачивали углекислым натрием. рН определяли электрометрическим методом с хингидроном; рН от 8 до 10 устанавливали по водородному электроду. Учет производили по внешним признакам роста — появлению помутнения, степени его, по образованию пленки и осадка.

## Определение влияния различных концентраций сахара и соли

Влияние различных концентраций сахара на рост дрожжей определяли в среде Ганзена с добавлением 2% агара и различного количества сахарозы и воды (концентрация дана в расчете на водную фазу среды).

На этой среде приготовляли косой агар, на поверхность которого наносили штрих исследуемой культуры, и учет результатов производили по сравнению мощности роста культуры. Влияние различных концентраций

№ штамма	Рост молочных дрожжей при различных концентрациях соли, %						
	5	7	8	9	10	13	15
40/e	++	++	+	+	±	—	—
41/e	++	++	+	+	+	±	—
51/e	++	++	+	+	±	—	—
54/e	++	+	+	+	—	—	—
63/e	++	++	+	+	+	—	—
83/e	++	++	+	+	+	—	—
87/e	++	+	+	+	±	—	—
101	++	++	+	+	±	±	—
139/e	++	++	++	+	±	±	—
143/e	++	++	+	+	±	—	—

Условные обозначения: ++ умеренный рост; + слабый рост; ± очень слабый; — роста нет.

большой осмофильностью. Развитие их не прекращается при 18% NaCl, а некоторых и при большей концентрации. Как действие соли, так и действие сахара сводится к высушиванию клеток — отнятию влаги от активной протоплазмы клетки. Поэтому культуры молочных дрожжей, реагирующие на повышение концентрации соли, должны быть чувствительны и к повышению концентрации сахара в питательной среде (табл. 7). У изучаемых культур наблюдается сильная задержка роста при содержании 40% сахарозы, а при 55% почти полное отсутствие роста (очень слабый рост по штриху).

В спущенном молоке только при содержании сахарозы около 63,5% не возникает пороков микробиологического происхождения (O. F. Hunziker, 1926). У изученной нами группы дрожжей, сбрасывающих молочный сахар, рост прекращается при значительно более низком содержании сахарозы.

Итак, физиологической особенностью изучаемых штаммов молочных дрожжей является стойкость к повышению кислотности и значительная устойчивость к концентрированным растворам поваренной соли и сахара.

№ штамма	Рост молочных дрожжей при различных концентрациях сахаразы, %							
	23	33,3	37,5	39,2	50,0	54,4	60,0	63,5
40/e	++	+	+	+	±	±	±	±
41/e	+++	+++	+	+	±	±	±	±
51/e	+++	++	+	+	±	±	±	—
54/e	+++	++	++	+	±	±	±	—
63/e	++	++	++	++	++	—	—	—
83/e	++	++	++	+	+	—	—	—
87/e	++	++	++	+	±	±	±	—
101	++	++	++	+	±	±	—	—
139/e	++	+	+	+	±	±	±	±
143/e	++	+	+	+	±	±	±	—

Условные обозначения: +++ хороший рост; ++ умеренный рост; + слабый; ± очень слабый; — роста нет.

#### Глава IV

### РОЛЬ ДРОЖЖЕЙ В СПИРТОВОМ БРОЖЕНИИ МОЛОКА

#### ХИМИЗМ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ В МОЛОКЕ

Исходным материалом для спиртового брожения в молоке служит дисахарид лактоза, который подвергается спиртовому брожению после гидролиза его ферментом лактазой на галактозу и глюкозу ( $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$ ). Этот процесс настолько неуловим, что если брожение прервать, моносахаридов обнаружить не удастся (К. Опенгеймер и Р. Кун, 1932). Продукты гидролиза — галактоза и глюкоза — могут непосредственно сбраживаться с образованием спирта и углекислоты.

По данным, приведенным М. С. Философовым (1931), продукты гидролиза лактозы — глюкоза и галактоза — неодинаково энергично сбраживаются молочными дрожжами (*Sacch. fragilis*), глюкоза сбраживается лучше, чем галактоза.

Позднее Рогоза и Моррисон (Rogosa M., Morrison,

1948) получили такие же результаты. По их сообщению лактозосбраживающие дрожжи приспособились к сбраживанию глюкозы, галактозы или лактозы; лактозу они сбраживают быстрее, чем смесь глюкозы и галактозы. Это происходит потому, что брожение галактозы происходит относительно слабее. Авторы придерживаются той точки зрения, что ферментативный гидролиз лактозы не необходим для ее сбраживания, лактоза может сбраживаться непосредственно путем фосфорилирования ее при участии ферментов АТФ.

С. И. Новикова (1956), изучая начальный этап расщепления лактозы культурами *Str. lactis* (начальный этап молочнокислого брожения аналогичен спиртовому), пришла к выводу, что *Str. lactis* обладает способностью расщеплять лактозу двумя путями: путем образования легкогидролизуемых фосфорных эфиров и путем гидролиза на глюкозу и галактозу. Все исследованные ею культуры *Str. lactis* при росте в молоке, расщепляя лактозу, потребляют неорганический фосфор и образуют легкогидролизуемые фосфорные соединения, состоящие из глюкозо-1-фосфата и еще более легкогидролизуемой углеводфосфорной фракции.

В. Е. Сандин и другие (1962) считают, что прежде чем галактоза может быть использована молочнокислыми бактериями, она должна быть превращена в глюкозу. Это превращение осуществляется в результате реакций фосфорилирования, конечным продуктом которых является глюкозо-1-фосфат, подвергающийся в дальнейшем брожению по той же схеме, что и глюкоза.

Для выяснения сбраживания нашими штаммами молочных дрожжей продуктов гидролиза лактозы-глюкозы и галактозы был поставлен ряд опытов. В одни колбы со средой Ганзена в качестве углевода вносили 5% лактозы, в другие 10% галактозы или 10% глюкозы.

В колбы со средой вносили равное количество клеток дрожжевой суспензии (около 1 млн. на 1 мл). Опыты показали (рис. 10 и 11), что у молочных дрожжей (штаммы № 143, 51) образование спирта, выделение  $\text{CO}_2$ , повышение кислотности — все происходит в почти одинаковой степени при сбраживании как лактозы, так и глюкозы. Брожение галактозы идет немного слабее, у культуры № 143 (*Fabospora fragilis*), что согласуется с данными, полученными М. С. Филосовым.

Химизм спиртового брожения выражается простейшей формулой  $C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_5OH + 2CO_2$ , которая весьма правильно отражает конечные результаты превращения сахара при спиртовом брожении. Биохимическое расщепление сахара сопровождается образованием промежуточных продуктов в результате взаимосвязанных реакций, катализаторами которых служат ферменты.

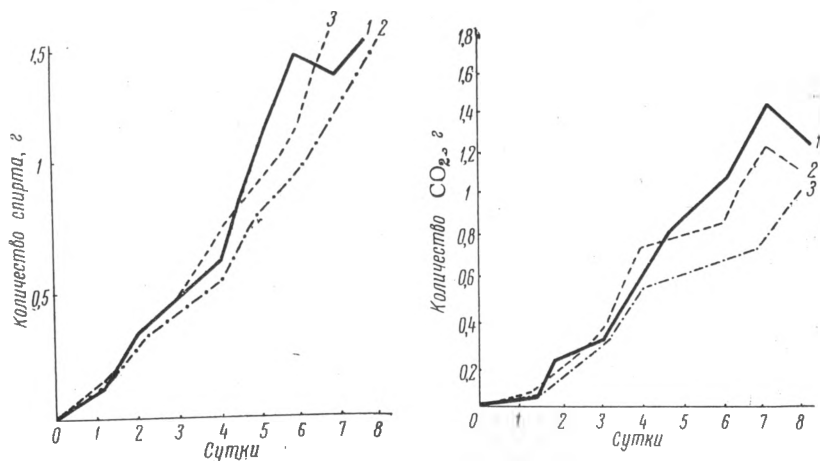


Рис. 10. Динамика спиртового брожения молочных дрожжей в среде Ганзена с различными углеводами (штамм № 143):  
1 — лактозой; 2 — глюкозой; 3 — галактозой

Изучение отдельных звеньев этих реакций и определение промежуточных продуктов явилось предметом исследования многих отечественных и зарубежных биохимиков (Л. Иванов, А. Лебедев, А. Гордон, С. Костычев, К. Нейберг, Г. Эмбден, О. Мейергоф, В. Энгельгардт и др.).

В настоящее время установлено, что брожение осуществляется 11—12 ферментами, действующими в строго определенной последовательности по схеме Эмбдена — Мейергофа (С. Прескотт и С. Дэн, 1959; А. Ключвер и К. Ван-Ниль, 1959; С. А. Коновалов, 1962 и др.). Отщепление водорода от молекулы сахара сопровождается переносом электрона (т. е. происходит окисление) с освобождением энергии с помощью сложной системы ферментов, называемой АДФ—АТФ. (М. Фробишер, 1965; С. А. Коновалов, 1967). Эта энергия накапливается

в органических фосфорных связях и используется в процессе жизнедеятельности клетки.

При спиртовом брожении на первом этапе расщепления участвует фосфорная кислота с образованием гексозодифосфатов, в дальнейшем основным промежуточным продуктом, общим для молочнокислого и спиртового брожения, является пировиноградная кислота.

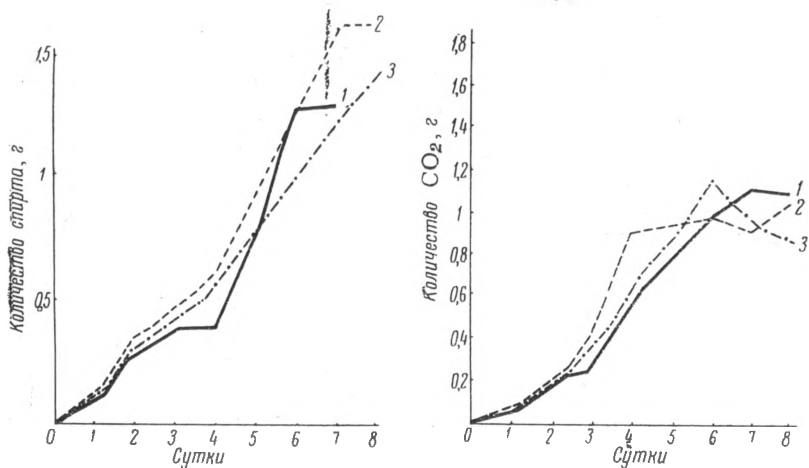


Рис. 11. Динамика спиртового брожения молочных дрожжей в среде Ганзена с различными углеводами (штамм № 51):

1 — лактозой; 2 — глюкозой; 3 — галактозой

При спиртовом брожении пировиноградная кислота расщепляется при воздействии карбоксилазы на уксусный альдегид и углекислоту  $\text{CH}_3\text{COCOON} \rightarrow \text{CH}_3\text{CON} + \text{CO}_2$ , а уксусный альдегид восстанавливается в спирт. Согласно теории Эмбдена, при молочнокислом брожении пировиноградная кислота не превращается в уксусный альдегид, как при спиртовом, а, взаимодействуя с глицеринофосфорной кислотой, дает молочную кислоту, фосфодиоксиацетон и фосфоглицериновый альдегид. Следовательно, основное различие между молочнокислым и спиртовым брожением состоит в том, что при молочнокислом брожении происходит непосредственное восстановление пировиноградной кислоты, а при спиртовом — после декарбоксилирования (восстановления уксусного альдегида).



В наших опытах при спиртовом брожении в молоке под действием чистых культур дрожжей, сбраживающих лактозу, кроме образования спирта, наблюдалось значительное повышение кислотности, хотя молоко при этом и не свертывалось.

Чтобы выяснить различие в сбраживании углеводов молочными и винными дрожжами, мы поставили параллельные опыты на синтетической среде Ганзена с 5% глюкозы. Для сравнения контрольную колбу заражали штаммом *Sacch. cerevisiae* XII, сбраживающим глюкозу и не сбраживающим лактозу. В опытные колбы вводили дрожжи, сбраживающие лактозу (штамм 165/120), и в двух дополнительных опытах — штамм молочных дрожжей, выделенный из кумыса (12 кум). Все колбы со средой Ганзена обсеменяли одинаковым количеством клеток дрожжевой суспензии (около 1 млн. на 1 мл) \* и выдерживали при температуре 25°С. Динамику спиртового брожения определяли по выделению углекислоты в течение 7 суток.

Ежедневно перед взвешиванием колбы встряхивали для удаления CO<sub>2</sub>. После вскрытия колб для химических анализов приготавливали препараты и проверяли чистоту культуры. Затем дрожжи отделяли путем центрифугирования и в прозрачной бражке определяли количество сахара, спирта, летучих кислот, молочной кислоты.

Сахар определяли по Бертрану, молочную кислоту по методу Фридемана, Катонио и Шаффера, летучие кислоты с разгонкой по Дюкло, спирт — флотационным методом.

Изучение динамики спиртового брожения в этих опытах по выделению углекислоты показало, что при внесении одинакового количества дрожжевых клеток более активные штаммы дрожжей, сбраживающих лактозу, ведут почти так же интенсивно спиртовое брожение, как и *Saccharomyces cerevisiae* XII. Испытуемый штамм кумысных дрожжей (12 кум) брожение вел значительно слабее (рис. 12).

Данные химического анализа продуктов спиртового брожения в этих опытах приведены в табл. 8.

---

\* 2- или 3-суточную культуру дрожжей смывали стерильной водой с косо́го су́сло-агара; число клеток подсчитывали по методу Дрейера-Королева или в счетной камере.

Из табл. 8 видно, что к концу брожения, как активный штамм дрожжей, сбраживающих лактозу (165/120), так и *Sacch. cerevisiae*, образуют почти одинаковое количество спирта, углекислоты, летучих кислот, в основном уксусную кислоту (немного пропионовой). В процессе брожения оба вида дрожжей образуют в небольшом

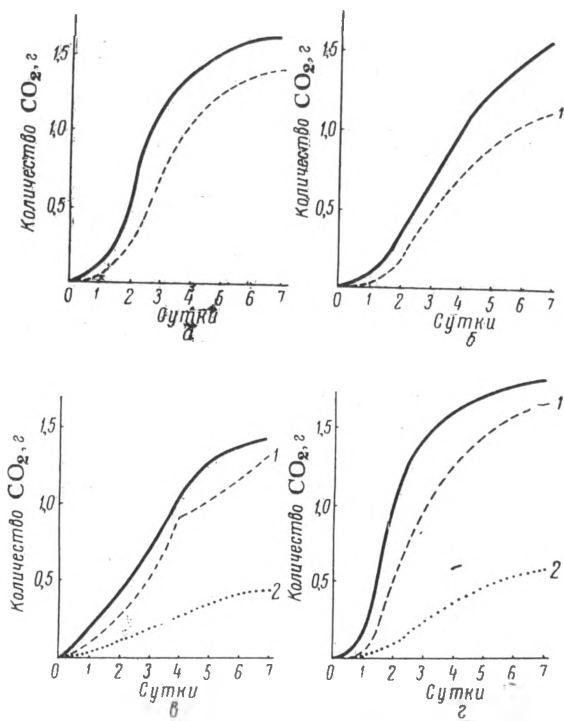


Рис. 12. Динамика спиртового брожения у различных видов дрожжей (по выделению  $\text{CO}_2$  от начала брожения, г на 100 мл):

1 — молочных дрожжей 165/120; 2 — дрожжей из кумыса  
а, б, в, г — соответственно опыты № 1, 2, 3, 4

количестве и молочную кислоту. При спиртовом брожении молочная кислота может образоваться путем восстановления из пировиноградной.

Для решения вопроса, будет ли влиять на количество образовавшейся молочной кислоты аэрация, мы поставили два параллельных опыта: в аэробных условиях (с продуванием стерильного воздуха) и в анаэробных (без

Т а б л и ц а 8

№ п.п.	Возраст культуры в сутках	Название культуры	Количество израсходован- ного сахара, г	Количество продуктов брожения в 100 мл			летучих кис- лог в перес- чете на ук- сусную кис- лоту	молочной кислоты
				г		мл		
				СО <sub>2</sub>	спирта			
1	8	Saccharomyces cerevisiae Молочные дрожжи 165/120	4,05	1,62	1,67	65,6	9,7	
				1,44	1,59	—	9,7	
2	16	Saccharomyces cerevisiae Молочные дрожжи 165/120	4,0	1,68	1,98	46,3	23,5	
				1,59	1,8	75,2	35,5	
3	8	Saccharomyces cerevisiae Молочные дрожжи 165/120	4,3	1,56	1,85	49,2	Нет сведений	
				1,46	1,76	57,3		То же
				0,64	0,89	51,8		„
4	7	Saccharomyces cerevisiae Молочные дрожжи 165/120	4,3	1,75	1,91	46,5	13,44	
				1,67	1,91	94,5	28,0	
		Дрожжи 12 кум.	2,1	0,62	0,88	49,5	25,4	

№ п.п.	Углевод, добавляемый в питательную среду Ганзена	Название культуры	Вид брожения	Расход сахара, г	Количество продуктов спиртового брожения через 7 суток на 100 мл			
					CO <sub>2</sub> , г	спирта, г	летучих кислот, мг	молочной кислоты, мг
1	Глюкоза	<i>Sacch. cerevisiae</i> XII	Анаэробное	3,6	1,57	1,81	115,5	23,6
2	Глюкоза	Молочные дрожжи 165/120		2,1	0,87	1,21	285,5	21,2
3	Лактоза	Молочные дрожжи 165/120		2,7	0,83	1,44	251,1	25,2
4	Глюкоза	<i>Sacch. cerevisiae</i> XII	Аэробное с продувочным	3,6	—	0,15	46,5	37,1
5	Глюкоза	Молочные дрожжи 165/120		3,65	—	0,23	57,0	19,4
6	Лактоза	Молочные дрожжи 165/120		5,0	—	1,76	58,5	43,6

продувания), причем использовали глюкозу и лактозу. Через 7 суток провели анализ образовавшихся продуктов жизнедеятельности дрожжей. Результаты этих опытов приведены в табл. 9.

Полученные данные подтвердили, что при спиртовом брожении под действием *Sacch. cerevisiae* XII и дрожжей, сбраживающих лактозу, образуется незначительное количество молочной кислоты. Как в анаэробных, так и в аэробных условиях получилось примерно одинаковое количество молочной кислоты. Очевидно аэрация не влияет на образование молочной кислоты. При анаэробном брожении (опыты были поставлены в колбах Эрленмейера с затворами Мейсля и в течение всего опыта колбы не встряхивали) под действием молочных дрожжей образуется в 2 раза больше летучих кислот, чем при брожении при тех же условиях у *Sacch. cerevisiae* XII.

В предыдущем опыте при исследовании продуктов спиртового брожения (см. табл. 8) мы этого не наблюдали. Летучих кислот у всех культур образовалось значительно меньше. Возможно, что в этом опыте ежедневное взбалтывание колб перед взвешиванием оказало влияние на содержание летучих кислот.

При аэробном (см. табл. 9) сбраживании глюкозы как *Sacch. cerevisiae* XII, так и молочные дрожжи образуют мало спирта и используют большую часть глюкозы для окислительных процессов при размножении клеток.

В аэробных условиях молочные дрожжи неодинаково сбраживают глюкозу и лактозу: лактозы израсходовано значительно больше (0,5 г), чем глюкозы (3,65 г). При сбраживании лактозы молочными дрожжами в аэробных условиях, по-видимому, одновременно происходит энергичное размножение дрожжей и спиртовое брожение. При сбраживании глюкозы образуется 0,23 г спирта, при сбраживании лактозы в тех же условиях 1,76 г.

Полученные данные объясняют необходимость аэрации и использование молочных дрожжей, как более активных при производстве кумыса.

В опытах с дрожжами, сбраживающими лактозу, при определении количества летучих кислот (после подщелачивания среды КОН и отгонки спирта) выпадали крупные белые кристаллы. Кристаллы не растворимы в воде, эфире, спирте; растворимы в соляной, уксусной,

молочной кислотой. Они образовались только в анаэробных условиях, при брожении дрожжей, сбраживающих лактозу. По нашим определениям (проведение качественного анализа, сжигание и рентгеноскопия), это кристаллы струвита  $\text{NH}_4, \text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (А. Н. Винчелл, 1949).

По-видимому, оставшиеся в питательной среде соли магния и фосфора соединились с продуктами распада пептона и при наличии уксусной кислоты были в растворе; после подщелачивания и кипячения они выкристаллизовались. Этого не происходило при сбраживании *Sacch. cerevisiae* XII, возможно, что все же обмен веществ при брожении и продукты жизнедеятельности у этих видов дрожжей различны.

### ДИНАМИКА СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ

Объем спиртового брожения в молоке ограничивается количеством содержащейся в коровьем молоке лактозы (около 4,5%). Теоретически, исходя из формулы спиртового брожения, предел спиртообразования в нем при чисто протекающем процессе около 2,25%; количество выделяемой углекислоты такое же. В кобыльем молоке, содержащем молочного сахара около 6,5%, предел спиртообразования значительно выше (до 3,25%). Однако в кефире, кумысе, простоквашах параллельно протекает молочнокислое брожение, источником которого служит также молочный сахар и на которое расходуется не меньше 1% сахара. Следовательно, в кисломолочных продуктах спирта образуется меньше.

Динамика спиртового брожения в молоке мало изучена. С. А. Королев (1932) описывает этот процесс как менее энергичный, чем молочнокислый, вследствие медленного размножения дрожжей. Инкубационный период длится около суток, затем начинается энергичное брожение, которое может закончиться в течение 2—3 суток в зависимости от условий.

Нами проведен ряд опытов по изучению динамики спиртового брожения, вызываемого выделенными культурами молочных дрожжей. При постановке их мы пользовались методикой, изложенной выше. Для выяснения возможного влияния химического состава молока на ход брожения мы поставили параллельные опыты в молоке и в среде Ганзена с 5% лактозы. Ежедневно отбирали

одну опытную колбу, взвешивали и определяли количества выделившейся углекислоты, проверяли чистоту культуры путем просмотра препарата, после чего определяли количество спирта, летучих кислот, кислотность, а в конце брожения (у некоторых культур) и количество молочной кислоты. Динамика спиртового брожения представлена на рис. 13.

Как в молоке, так и в среде Ганзена с лактозой спиртовое брожение у более активных культур (51, 143) развивалось почти одинаково. Инкубационный период длится около суток, затем происходит равномерное образование спирта и выделение  $\text{CO}_2$  и на седьмые сутки процесс в основном заканчивается. Предельное количество спирта около 1,6 г на 100 мл молока.

Энергия спиртового брожения у разных культур различна.

Среди выделенных нами культур дрожжей встречались как активные штаммы (51, 143), так и более слабые спиртообразователи (87, 65, 63 и другие). Энергия спиртообразования у одних и тех же культур не постоянна. Иногда происходило ослабление энергии у активных культур и через некоторое время восстановление их первоначальной активности. Наблюдались случаи полной потери способности к ображиванию лактозы (штамм № 22).

Энергия спиртового брожения, как и любого другого брожения, зависит от температуры. При снижении температуры процесс замедляется.

Мы поставили ряд опытов по изучению динамики спиртового брожения при разных температурах. В опытные колбы вносили одинаковое количество дрожжей и выдерживали в течение месяца при следующих температурах:  $5^\circ\text{C}$  (изредка с колебаниями в пределах от  $3$  до  $8^\circ\text{C}$ ),  $10^\circ\text{C}$  (колебания от  $10$  до  $13^\circ\text{C}$ ),  $20^\circ\text{C}$  ( $20$ — $22^\circ\text{C}$ ),  $30^\circ\text{C}$  ( $30$ — $32^\circ\text{C}$ ),  $40^\circ\text{C}$  ( $35$ — $43^\circ\text{C}$ ). Исследовали 2 культуры дрожжей: № 51, выделенную из сметаны г. Пушкина (Ленинград), и культуру № 139, выделенную из южной простокваши г. Пятигорска. Оба штамма до проведения опыта культивировали около 3 лет в одинаковых температурных условиях ( $15$ — $20^\circ\text{C}$ ). Данные опытов представлены на рис. 14.

Культура № 51, как и следовало ожидать, оказалась более приспособленной к развитию при низких темпера-

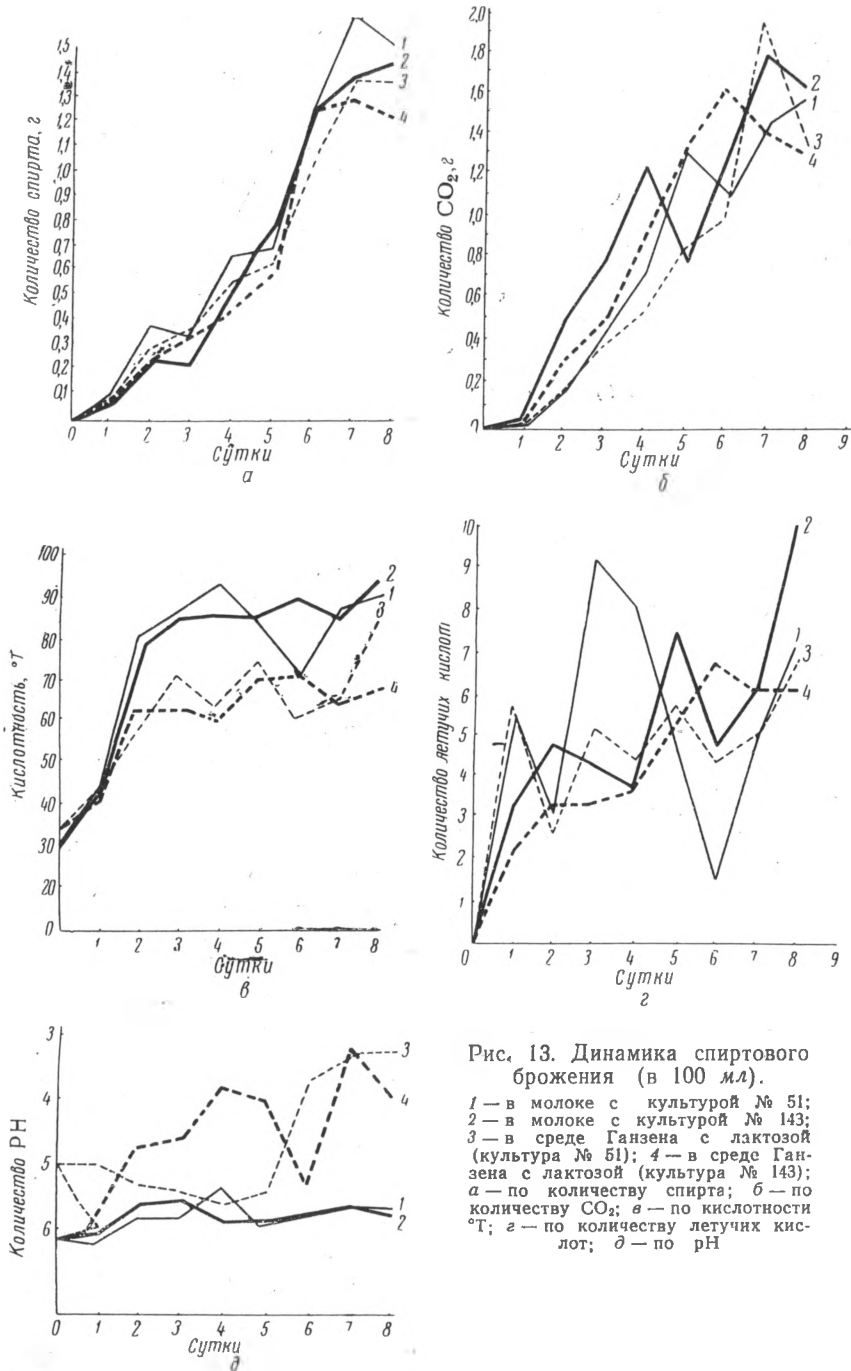


Рис. 13. Динамика спиртового брожения (в 100 мл).

1 — в молоке с культурой № 51;  
 2 — в молоке с культурой № 143;  
 3 — в среде Ганзена с лактозой (культура № 51); 4 — в среде Ганзена с лактозой (культура № 143);  
 а — по количеству спирта; б — по количеству  $CO_2$ ; в — по кислотности °Т; г — по количеству летучих кислот; д — по pH



турах: она способна сбраживать лактозу даже при температуре около  $5^{\circ}\text{C}$ , в то время как культура № 139 при этой температуре не проявляет и признаков брожения. Культура № 51 при  $10$  и  $20^{\circ}\text{C}$  более энергично сбраживает лактозу, чем культура № 139 при этих же температурах. При  $30^{\circ}\text{C}$  обе культуры проводят брожение с одинаковой активностью, а при  $40^{\circ}\text{C}$  энергичнее ведет брожение культура № 139. Оптимальная температура брожения культуры № 139 молочных дрожжей около  $30^{\circ}\text{C}$ .

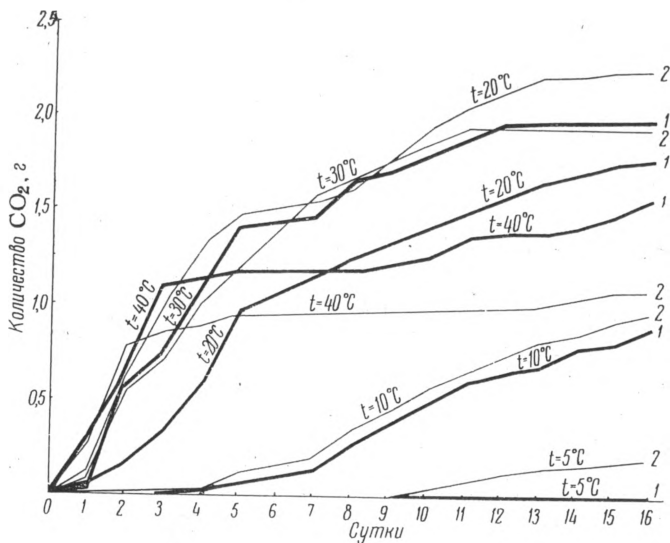


Рис. 14. Динамика спиртового брожения в зависимости от температуры у культур дрожжей молочных продуктов (в 100 мл):

1 — южных (№ 139); 2 — северных (№ 51)

Культура № 51 при  $20$ — $22^{\circ}\text{C}$  ведет брожение энергичнее, чем при  $30^{\circ}\text{C}$ . Следовательно, более психрофильные культуры дрожжей лучше выделять из северных кисломолочных продуктов, а термофильные из южных.

### АНТАГОНИСТЫ И СТИМУЛЯТОРЫ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ

Редкий процесс в природе и в производстве совершается абсолютно чистой культурой, поэтому очень важен вопрос о взаимоотношении микроорганизмов (см.

М. И. Нахимовская, 1938, 1939, Н. А. Дмитриевская и М. Ф. Чеботаревич, 1938).

Воздействие одних микробов на другие может быть антагонистическим, крайней степенью которого является паразитизм, стимулирующим (как при симбиозе) или же подготавливающим почву для развития других групп микроорганизмов (как при метабиозе). В кисломолочных продуктах, где проходит спиртовое брожение, преобладают молочнокислые бактерии; наряду с молочными дрожжами встречаются в большом количестве и дрожжи, не сбраживающие лактозу. Рассмотрим взаимоотношение микробов и влияние их на спиртовое брожение в молоке.

Существует мнение, что молочнокислые бактерии и дрожжи находятся в симбиотических взаимоотношениях. При совместном культивировании молочнокислых бактерий и дрожжей в стерильном обезжиренном молоке без пересевов молочнокислые бактерии могут сохранять свою жизнеспособность и основные биохимические свойства больше года (С. А. Королев, 1932).

С другой стороны, и дрожжи при культивировании с молочнокислыми бактериями дольше сохраняют свою жизнедеятельность, а в большинстве случаев и способность к брожению.

С. А. Королев отмечает, что спиртовой процесс чаще всего является процессом не господствующим, а подчиненным, а поэтому и более чувствительным ко всевозможным влияниям биологической обстановки. А. Ф. Войткевич, М. Ф. Халдина и И. П. Садокова (1936), А. М. Скородумова, Рубайко, Т. А. Кротова, (1938) при изучении микробиологических процессов в кефире наблюдали замедление спиртового брожения при совместном развитии с молочнокислыми стрептококками.

А. Ф. Войткевич сообщает, что способностью угнетать *Torulopsis* при совместном с ним развитии обладают в наибольшей степени штаммы *Str. lactis*, причем это свойство является для них весьма стойким в отличие от других видов стрептококков. Все 24 испытанные штамма *Str. lactis* оказывали резко выраженное угнетающее действие. Воздействие *Str. cremoris* не было резко выраженным (колебания), а *Str. citrovorus* в большинстве случаев совсем не оказывал угнетающего действия, и, по-видимо-

му, лишь некоторые его штаммы оказывают такое действие, притом в малой степени.

По данным О. К. Паладиной (1941 г.), смешанные культуры дрожжей с молочнокислыми бактериями имеют меньший дыхательный коэффициент, чем дрожжи.

А. Ф. Войткевич считает, что стрептококки оказывают угнетающее действие на развитие дрожжей лишь при наличии активного размножения первых. Он объяснял это непосредственным биологическим воздействием живой клетки стрептококка на дрожжевую, а не накоплением каких-либо стойких веществ в среде. Были отмечены два случая агглютинации дрожжевых клеток в результате совместного культивирования со стрептококками. В микроскопических препаратах часто отмечалось, что клетки стрептококков скопляются преимущественно на поверхности дрожжевых клеток.

Явление, сходное с паразитизмом, обнаружила С. А. Ковровцева (1939), изучая совместное развитие дрожжей с молочнокислыми бактериями типа *Streptobacterium plantarum* и *Betabacterium* O. I. Молочнокислые бактерии внедрялись в дрожжевые клетки. Отмечался как бы скрытый период их развития, когда их не было видно на препарате, после чего бактерии появлялись целыми скоплениями на месте разрушения дрожжевых клеток. К. И. Кудзин (1936) отмечает положительное влияние дрожжей на развитие молочнокислых бактерий. Он наблюдал увеличение числа клеток ацидофильной палочки (*Lactobact. acidophilum*) при совместном развитии с *Togula kefir*. К. Ризванов (1960) отмечает симбиотическое взаимоотношение между *Lactobact. bulgaricum* и *Sacch. lactis*.

Для внесения ясности в вопрос влияния молочнокислого брожения на спиртовое, имеющий не только теоретический интерес, но и большое практическое значение, мы поставили ряд опытов по изучению спиртового брожения совместно с молочнокислым.

Опыты проводили с различными культурами молочнокислых стрептококков: *Str. lactis*, *Str. cremoris* и *Str. paracitrovorus* (мац. 8), культурой, выделенной из мацони, и культурами молочнокислых палочек — культурой х/9, выделенной из йогурта, активной по кислотообразованию, и культурой ба, выделенной из айрана, не свертывающей молока (*Betabacterium* O. I.).

У чистых культур молочных дрожжей № 139, 51, 40 максимум брожения наступает раньше и брожение проходит энергичнее, чем при совместном культивировании их с молочнокислыми стрептококками. Спирта при брожении чистых культур молочных дрожжей образуется больше, чем при развитии с молочнокислыми стрептококками. *Str. lactis*, по-видимому, сильнее подавляет спиртовое брожение, чем *Str. paracitrovovus* — мац. 8 (штаммы № 139 и 143).

Таким образом, наши исследования подтвердили данные, полученные А. Ф. Войткевичем и сотрудниками, что *Str. lactis* подавляет спиртовое брожение в молоке. Менее антагонистическое влияние оказывает *Str. paracitrovovus*. У штаммов дрожжей № 139 и 143 максимум брожения наступает раньше при совместном культивировании с молочнокислыми палочками и брожение происходит энергичнее при развитии с молочнокислыми палочками, чем в чистой культуре дрожжей. К концу брожения получается почти равное количество спирта.

У некоторых штаммов молочных дрожжей (63, 65, 22), слабых спиртообразователей, при культивировании в чистых культурах на сусло-агаре наблюдалась потеря способности сбраживать лактозу. При совместном же развитии с молочнокислыми палочками спиртообразование происходило. Эти опыты показали, что молочнокислые палочки почти не задерживают спиртового брожения, а слабые кислотообразователи (*Betabacterium*) даже стимулируют его.

Одной из причин хорошо выраженного спиртового брожения в кумысе (кроме большего количества лактозы) является, по-видимому, развитие молочнокислых палочек, которые ведут в нем молочнокислое брожение. В кефирном грибке, а также в первой грибковой закваске, имеются молочнокислые палочки, отчасти слабые кислотообразователи, они и способствуют нормальному спиртовому брожению. При многократном производстве кефира на одной и той же безгрибковой закваске палочки отстают в развитии, спиртовое брожение происходит слабо и кефир становится похожим на простоквашу.

При подборе культур для производства кисломолочных напитков со спиртовым брожением не дрожжи следует подбирать к молочнокислым бактериям, как это

делалось до сих пор, а молочнокислых бактерий к дрожжам. Необходимо подбирать такие виды бактерий, которые не задерживали бы спиртового брожения.

## ВЛИЯНИЕ СМЕШАННЫХ ДРОЖЖЕВЫХ КУЛЬТУР НА СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ

Вопрос о действии смесей дрожжевых культур на спиртовое брожение не раз рассматривался и отмечалось как вредное, так и полезное действие отдельных видов дрожжей на брожение (Л. И. Комарова, 1937, 1938, 1940; В. Н. Шапошников, 1939). В. Ганзен предложил к производственным пивным дрожжам добавлять дрожжи *Sacch. pastorianus* II, придающие пиву своеобразный вкус и аромат. В виноделии для получения некоторых высококачественных сортов вин также используют смешанные культуры дрожжей, например, при получении хереса (А. Н. Фролов-Багреев, 1925; М. А. Ховренко и Б. И. Бабенко, 1925 и др.).

В спиртовой промышленности довольно широко распространена культура дрожжей «М», составленная Геннебергом из 3—4 рас, куда входят также расы II и XII (М. Глаубиц, 1935, И. М. Курбатов, 1939).

Наблюдения Л. И. Комаровой (1938) над сбраживанием заторов смешанными культурами дрожжей показали, что одновременное применение двух различных рас из рода *Saccharomyces*, как правило, не дает увеличения выходов спирта, в то время как любая комбинация дрожжей *Saccharomyces* в смеси с различными видами из рода *Schizosaccharomyces* заметно увеличивает его выход. Изучение динамики брожения у представителей этих родов — расы XII и *Pombe* — указало на различную скорость брожения этих рас, благодаря чему удалось ускорить дображивание углеводов.

По исследованиям Л. И. Комаровой, свойства дрожжей, находящихся в смешанных культурах, существенно отличаются от свойств этих же дрожжей в чистых культурах. Скорость размножения дрожжевых клеток изменяется, когда они попадают в среду, содержащую другую расу дрожжей. Иногда замедляется размножение дрожжевых клеток. Характер брожения смешанных культур также существенно отличается от брожения, вызываемого чистыми культурами. При применении неко-

торых смешанных культур дрожжей напитков приобретает особый вкус и аромат.

Спиртовое брожение в молоке под действием молочных дрожжей происходит медленно и спирта образуется мало; часто не сбраживается до конца и то количество сахара, которое находится в молоке. В молоке и кисломолочных продуктах мы встречаем большей частью дрожжи, не способные самостоятельно сбраживать лактозу, не обладающие гидролизующим ферментом лактазой.

Исходя из предположения, что добавка к молочным дрожжам дрожжей, энергично сбраживающих глюкозу и галактозу, может ускорить процесс брожения, А. Ф. Войткевич, М. Ф. Халдина и И. П. Садокова (1936, 1937) для усиления спиртообразования в кефире применяли смеси культур молочных дрожжей в комбинации с энергичными спиртообразователями — пивными и винными дрожжами (вводили *Sacch. cerevisiae*, шампанские, токайские, Штейнбергер). Однако добавление их как без молочного стрептококка, так и при его введении не влияло на образование спирта.

Мы делали попытки усилить спиртовое брожение путем добавления к молочным дрожжам культур дрожжей, не сбраживающих лактозу и выделенных из кисломолочных продуктов с энергичным спиртовым брожением, но ожидаемого эффекта также не получили.

Для получения спирта из сыворотки все же рекомендуется к молочным дрожжам прибавлять расу XII спиртовых дрожжей.

Чтобы выяснить, могут ли в молоке накапливаться продукты гидролиза — глюкоза и галактоза — и могут ли за их счет вести брожение другие виды дрожжей, мы поставили опыты по совместному культивированию молочнокислых бактерий, гидролизующих лактазу, и спиртовых дрожжей *Sacch. cerevisiae* XII, способных сбраживать продукты гидролиза — глюкозу и галактозу. Для сравнения были сделаны посевы молочнокислых бактерий с различными расами молочных дрожжей.

При постановке опытов предполагали, что лактаза молочнокислых бактерий будет гидролизовать лактозу, а спиртовые дрожжи — вести спиртовое брожение. Брожение в молоке легко будет заметить по выделению углекислоты. При развитии спиртового брожения в моло-

ке, овернувшимся от молочнокислого брожения, получится рваный, пронизанный пузырьками газа сгусток. Метод для рекогносцировочных анализов прост, эффектен и требует затрат небольшого количества обезжиренного молока (опыты проводятся в пробирках).

Исследования показали, что в молоке при данных условиях спиртовые дрожжи не могут вести спиртового брожения, по-видимому, не накапливается в достаточном количестве продуктов гидролиза молочного сахара — глюкозы и галактозы. Мы решили несколько изменить условия опыта, во-первых, задержать энергию молочнокислого брожения снижением температуры и, во-вторых, для проведения молочнокислого брожения испытать несколько видов молочнокислых бактерий. В последнем случае учитывали, что для спиртового брожения надо подбирать не дрожжи к молочнокислым бактериям, а молочнокислые бактерии к дрожжам, т. е. подбирать такие виды молочнокислых бактерий, которые не задерживали бы спиртового брожения.

Результаты опытов показали, что спиртовые дрожжи могут вести брожение в молоке, но при следующих условиях: молочнокислое брожение замедленно и в среде накапливаются продукты гидролиза лактозы; молочнокислые бактерии не являются антагонистами дрожжей.

Опыты доказали правильность предположения о возможности ускорить и усилить спиртовое брожение в молоке добавкой микробов, образующих лактазу, будь то молочнокислые бактерии или молочные дрожжи.

Нами был поставлен ряд опытов с внесением культур молочных дрожжей 261, 165, 120 и спиртовых расы XII.

В первой серии опытов в 250 мл стерильного обезжиренного молока пипеткой вносили равное количество суспензии молочных и спиртовых дрожжей. Брожение проводили при 30°С. К концу брожения через 4—5 суток определяли содержание спирта по Никлю.

В результате добавления спиртовых дрожжей к молочным в равных количествах не только не увеличилось спиртовое брожение в молоке, но и наблюдалась тенденция к задержке его. При развитии молочных дрожжей совместно со спиртовыми образовалось меньше спирта. Предположив, что добавление большого количества спиртовых дрожжей задерживало развитие молочных дрожжей, в следующей серии опытов мы прибавляли

спиртовых дрожжей в 2—4 раза меньше, чем в первой серии опытов. Во второй серии опытов мы наблюдали обратную тенденцию — смешанные культуры образовывали немного больше спирта, чем чистые культуры молочных дрожжей.

Итак, добавляя в молоко небольшое количество дрожжей, сбраживающих компоненты лактозы — глюкозу и галактозу, можно усилить в нем спиртовое брожение. Введение же больших количеств спиртовых дрожжей задерживает брожение.

## РОЛЬ ДРОЖЖЕЙ В ВЫДЕЛЕНИИ СЕРОВОДОРОДА ПРИ СПИРТОВОМ БРОЖЕНИИ

Дрожжи обладают сильными восстановительными свойствами. Они восстанавливают многие вещества, вносимые в активно бродящую среду, содержащую дрожжи и сахар. Дрожжи восстанавливают альдегиды в соответствующие спирты, кетоны — во вторичные спирты, также восстанавливают метиленовую синь, серу (в сероводород) и другие вещества (С. Прэскот и С. Дэн, 1952).

При производстве напитков, связанном со спиртовым брожением, иногда выделяется сероводород, и продукт получается низкого качества.

А. Ф. Войткевич, М. Ф. Халдина, И. П. Садокова (1936) изучали причины появления в кефире, приготовленном на грибковой закваске, порока, выражающегося в запахе сероводорода. При исследовании обстоятельств, вызывающих в кефире этот порок, установлено, что одновременно в кефире повышалось содержание бактерий группы *Coli*. Кроме того, весной часто наблюдается ослабление развития молочнокислых стрептококков. Авторы высказывают предположение, что запах сероводорода появляется вследствие воздействия *Bact. coli* на белки молока. По исследованию В. Я. Волковой-Рубель (1916) некоторые виды молочных дрожжей при определенных условиях способны выделять сероводород. Возможно, что при приготовлении кисломолочных продуктов из несвежего, долго хранившегося при низкой температуре молока, в котором частично прошла пептонизация, дрожжи, способные выделять сероводород, являются виновниками этого порока. При подборе штаммов



молочных и спиртовых дрожжей для производства следует проверять их способность выделять сероводород. Проверка штаммов молочных дрожжей 261, 165/120 и штамма ВНИМИ показала, что эти штаммы сероводорода не образуют.

## РОЛЬ ВИТАМИНОВ ДРОЖЖЕЙ И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В СПИРТОВОМ БРОЖЕНИИ

Дрожжи так же, как и молочнокислые бактерии, отличаются друг от друга по количеству синтезируемых ими витаминов. Потребность их в витаминах удовлетворяется путем биосинтеза или восприятия из питательной среды. В тех случаях, когда микроорганизмы способны осуществлять биосинтез витаминов со скоростью, превосходящей расход их в процессе обмена, образуется избыток витаминов, накапливающийся в питательной среде.

В последнее время установлена связь между витаминами и ферментами, участвующими в процессах брожения. Некоторые молекулы витаминов входят в состав ферментов. Например, витамин В<sub>1</sub> (тиамин) в сочетании с пирофосфорной кислотой составляет кофермент карбоксилазы, т. е. является компонентом необходимого фермента спиртового брожения и, безусловно, влияет на интенсивность процессов брожения. Витамин В<sub>2</sub> (флавин, лактофлавин, рибофлавин) входит в состав желтого фермента Варбурга, обладающего сильным окислительным каталитическим действием и играющего важную роль в окислительных процессах при дыхательном обмене в клетке животных и микробов. Пантотеновая кислота усиливает углеводный обмен. Никотиновая кислота (или амид никотиновой кислоты) входит в состав козимазы, главная биохимическая роль которой заключается в образовании конечных продуктов брожения спирта или молочной кислоты в результате гидрирования уксусного альдегида или пировиноградной кислоты. Следовательно, витамины влияют на бродильную способность, и изучение потребности дрожжей и молочнокислых бактерий в них и их производных является одним из вопросов, имеющих важное производственное значение.

Молочные дрожжи по их потребности в витаминах

несколько отличаются от других видов дрожжей. Дрожжи, сбраживающие лактозу, нуждаются прежде всего в никотиновой, а также в пантотеновой кислотах и витамине В<sub>1</sub>. (М. Рогоза, 1943; Р. Burkholder и др. 1944; М. Н. Мейсель, Н. П. Трофимова и Н. П. Лисовская, 1945; Г. М. Шавловский и Г. П. Кшеминская, 1965). Они способны самостоятельно синтезировать флаavin (М. Рогоза). Штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, испытанные М. Рогозой, чувствительны к отсутствию флавина и пантотеновой кислоты и не нуждаются в никотиновой кислоте, которую они способны синтезировать.

Таким образом, одно из основных отличий молочных дрожжей от *Saccharomyces cerevisiae* является неспособность их самостоятельно синтезировать никотиновую кислоту или ее амид, активный компонент козимазы. Возможно, что недостаток в окружающей среде этой, необходимой для нормального процесса спиртового брожения составной части козимазы, является одной из причин небольшой энергии спиртообразования молочных дрожжей.

При совместном развитии некоторые дрожжи ведут спиртовое брожение энергичнее, чем в чистой культуре. Это, возможно, обусловлено тем, что одни виды дрожжей способны синтезировать витамины, в которых нуждаются другие. Так, спиртовым дрожжам для роста требуется флаavin, а молочные дрожжи способны его синтезировать; молочным дрожжам необходима никотиновая кислота, спиртовые дрожжи ее синтезируют. Молочнокислым бактериям для роста необходима пантотеновая кислота. Кроме того, они нуждаются во флавине, причем потребность в нем у молочнокислых палочек больше, чем у молочнокислых стрептококков (S. Orla-Iensen, 1936, 1937).

Гомоферментативные молочнокислые палочки *Lact. helveticum*, *Lact. jughurti*, *Lact. bulgaricum*, *Lact. lactis* и *Lact. acidophilum* испытывают потребность в рибофлавине и способны сами синтезировать тиамин. В отличие от гомоферментативных, все гетероферментативные палочки нуждаются в тиамине. Ацидофильной палочке необходима фолиевая кислота. Некоторые штаммы ее способны сами синтезировать витамин В<sub>12</sub> (М. Е. Scharpe, 1962). Молочнокислые стрептококки (*Str. lactis*) синте-

зируют рибофлавин (E. E. Snell a. F. M. Strong, 1939). *Str. lactis*, *Str. cremoris* и *Str. diacetylactis* испытывают потребность в никотиновой кислоте и биотине. Для них не требуется тиамин, фолиевой кислоты и В<sub>12</sub>. Пиродоксаль стимулирует их развитие. Рибофлавин необходим только *Str. cremoris* (P. Johnson и др., 1941).

Большинству штаммов *Str. thermophilus* требуется рибофлавин, биотин, пантотеновая и никотиновая кислоты. Стимулирующее действие оказывают тиамин и пиридоксаль (C. F. Niven, 1944; B. Reiter, A. Moller-Madsen, 1963).

Наши опыты по выяснению влияния молочнокислого брожения на энергию спиртообразования в молоке показали, что молочнокислые стрептококки в зависимости от их вида в большей или меньшей степени задерживают спиртовое брожение: молочнокислые палочки не задерживают брожения, а некоторые их штаммы несколько стимулируют его. Неодинаковая потребность молочнокислых бактерий и дрожжей во флавине служит, по-видимому, одной из причин различных взаимодействий между молочнокислыми бактериями и молочными дрожжами.

Молочнокислым палочкам для роста необходим флавин, который синтезирует молочные дрожжи; это, возможно, и является основой симбиотических отношений между молочнокислыми палочками и дрожжами. Молочнокислые стрептококки не нуждаются во флавине и при развитии вместе с молочными дрожжами большей частью подавляют развитие дрожжей. Никотиновая кислота стимулирует рост лишь некоторых видов молочнокислых палочек (E. E. Snell, F. M. Strong a. W. H. Peterson, 1938, 1939). В связи с этим можно предполагать, что отдельные культуры молочнокислых палочек способны самостоятельно синтезировать никотиновую кислоту и при совместном развитии с молочнокислыми дрожжами повышать энергию спиртового брожения.

Все эти сведения о витаминах основаны на литературных данных. Для подтверждения изложенных предположений о причинах симбиоза и антагонизма между молочнокислыми бактериями и дрожжами необходимы детальные исследования.