

И.Б. Высотина, О.С. Воронкова, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара,
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина,
e-mail: irafarma@mail.ru

МОНИТОРИНГ ГРИБОВ – КОНТАМИНАНТОВ ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Цель. Определить возбудителей меловой болезни хлеба. **Методы.** Микробиологические – для определения грибной контаминации хлебобулочных изделий с признаками поражения хлеба путем описания морфологических признаков болезни, изучения микроскопической картины и проведения культуральных исследований. **Результаты.** Установлено, что наиболее часто контаминация хлеба была вызвана представителями рода *Saccharomycopsis* (57,1 % случаев), также выявляли виды родов *Sporobolomyces* (25,0 %) и *Hyphopichia* (17,9 %). Экспериментальная контаминация выделенными штаммами показала, что только в 17,9 % случаев зона роста гриба составляла более 1 см в диаметре, а в 53,5 % – она была меньше 5 мм. Для 57,1 % штаммов *Sporobolomyces* при экспериментальной контаминации хлебобулочных изделий образование зоны роста превышало 1 см. Нанесение суспензий клеток культур других выделенных контаминантов также приводило к проявлению признаков меловой болезни, но зона роста не превышала 5 мм. **Выводы.** При отборе материала для исследований установлено, что грибной контаминации в большинстве случаев подвержены изделия из ржаной муки (71,4 %). Преимущественными контаминантами были виды рода *Saccharomycopsis* (57,1 % случаев). Зона роста гриба более 1 см в диаметре при экспериментальном заражении обнаружена только в 17,9 % случаев, что потенциально указывает на сложность эффективного распознавания контаминированной продукции в производственных условиях и требует разработки мер по предупреждению распространения возбудителей болезней хлеба.

Ключевые слова: меловая болезнь, хлеб, контаминация, дрожжевые грибы.

Порча хлебобулочных изделий при развитии на них ряда дрожжеподобных грибов называется меловой болезнью хлеба. Вызывают такие поражения преимущественно дрожжи видов *Saccharomycopsis fibuligera*, *Hyphopichia burtonii*, *C. parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *Sporobolomyces gracilis* и другие, в том числе и пекарские дрожжи [5].

Чаще всего признаки заболевания обнаруживаются на поверхности мякиша ржано-пшеничного хлеба, подвергнутого нарезке и хранящегося в упаковке из полимерных материалов. Реже меловая болезнь проявляется на корке изделий. Поражения характеризуются образованием на поверхности корки и в мякише хлеба белых, сухих, порошкообразных налетов или отдельных пятен.



Споры возбудителей меловой болезни устойчивы к высоким температурам и не погибают во время выпечки. Их прорастание занимает некоторое время, что усложняет выявление меловой болезни хлеба на производстве. Обычно ее проявления выявляются уже при поступлении хлебобулочных изделий в торговую сеть [2, 6].

Употребление в пищу пораженного меловой болезнью хлеба не считается опасным для человека, поскольку токсичных веществ эти грибы не продуцируют [5]. Однако изделия теряют свою товарную ценность, что наносит существенный урон производителю [2, 4, 6], поэтому определение возбудителей меловой болезни хлеба является важной задачей микробиологического контроля производства хлебобулочных изделий, что позволяет избежать распространения болезни и массовой порчи продукции.

Целью исследования было определить возбудителей меловой болезни хлеба.

Задачи исследования:

- выделить и идентифицировать грибы, контаминировавшие хлеб;
- определить частоту встречаемости грибов-контаминантов на разных сортах хлеба.

Материалы и методы

Для идентификации видов дрожжей – возбудителей меловой болезни хлеба – изучены 28 образцов хлебобулочных изделий с признаками проявления меловой болезни. Из них 20 образцов составляли хлебобулочные изделия из ржаной муки, а 8 – из пшеничной. Все обследованные изделия были упакованы в полимерные материалы. На поверхности корки или срезов (при исследовании образцов нарезанного хлеба) наблюдали образования в виде белых, реже бежевых сухих пятен плотной консистенции и/или такого же цвета порошкообразного либо крошковатого налета, напоминающего мел.

Для проведения идентификации изучали морфологические, культуральные и биохимические свойства выделенных чистых культур [8]. Для выделения чистых культур использовали прямой метод, который основан на снятии дрожжевых клеток с исследуемой поверхности с использованием прозрачного адгезивного материала. Липкой лентой снимали предварительно нанесенную на поверхность объекта тонкую агаровую пленку. Одну полоску ленты с агаром и прикрепившимися к нему дрожжевыми клетками изучали под микроскопом (Биолам-70P-1, ×600) без проращивания, опуская пленки в капли воды на предметном стекле (для улучшения визуализации воду подкрашивали метиленовым синим). Вторую полоску переносили на поверхность питательной среды (сусло-агар со стрептомицином: неохмеленное пивное сусло (8 град. по Баллингу) – 250 мл, агар-агар – 20 г, вода – до 1 л; после стерилизации вносили стрептомицин – 100 ЕД/мл среды) и делали отпечаток, прижимая к поверхности. Чашки с отпечатками инкубировали 5–7 суток при температуре 28 °С. Метод отпечатка позволяет определить плотность грибной контаминации поверхности хлеба и характер распределения дрожжей на поверхности [3].



Для получения чистых культур выделенных штаммов материал с отпечатка пересевали на сусло-агар со стрептомицином, а свойства чистых культур изучали при выращивании в разбавленном солодовом сусле (3 град. по Баллингу) и на сусло-агаре, приготовленном по стандартным прописям [1, 7]. Инкубацию проводили на протяжении 15 суток [3]. Для идентификации всех выделенных штаммов использовали тесты на способность сбрасывать углеводы (глюкоза, рамноза, целобиоза, галактоза, сахароза, мальтоза, лактоза, трегалоза, мелибиоза, инулин) и расти в присутствии этанола [3, 8].

Для подтверждения роли в развитии меловой болезни, выделенные штаммы тестировали путем нанесения суспензии (1×10^9 КОЕ/мл) на поверхность хлебного мякиша изделия из ржаной муки: 1 мл суспензии дрожжевых клеток наносили на хлеб возле корки, давая свободно растечься и впитаться. Инкубировали при температуре 28 °С 5 дней в полиэтиленовых пакетах [5], с третьего дня осуществляя ежедневный контроль роста. Появление крошковатого мелового роста считали подтверждением роли выделенного штамма в развитии меловой болезни хлеба. Исследования проводили в четырехкратной повторности. Визуальное наблюдение за проявлением повреждений на поверхности хлеба позволило условно разделить повреждения в результате контаминации на сильные и слабые. Под слабыми повреждениями имели в виду появление крошковатого налета по размеру примерно соответствующему зоне растекания нанесенной суспензии, а сильными считали проявления с выходом роста гриба за пределы зоны растекания.

Результаты исследований

Всего из обследованных образцов хлеба было выделено 28 штаммов микроорганизмов, среди которых было определено 4 типа отличающихся по своим морфологическим признакам.

При микроскопии материала снятого на пластинку агара во всех случаях отмечено присутствие тесно прилегающих друг к другу клеток во всем поле зрения. При рассмотрении пророщенного отпечатка пораженного мякиша на сусло-агаре со стрептомицином было выявлено 4 различных морфотипа роста (табл. 1).

Для морфотипа 1 при росте на сусло-агаре было характерно образование серо-белых матовых колоний диаметром до 4–5 мм, округлой формы с ровным краем, выпуклых. Рост на жидкой среде имел характер легкого помутнения с образованием небольшого осадка. Установлена способность расти в жидкой среде с глюкозой, целобиозой, сахарозой и мальтозой и в присутствии этанола. Рост в жидкой среде с рамнозой, галактозой, лактозой, мелибиозой и инулином не отмечали, что характерно для представителей рода *Saccharomycopsis* [5, 6, 8].

Культуры, отнесенные к морфотипу 2, на сусло-агаре образовывали блестящие розовато-серые колонии диаметром до 6 мм. Форма колоний округлая, край – волнистый; профиль – плоский. При росте в жидком солодовом сусле отмечали его легкое помутнение и образование крупного серо-коричневого осадка. Отмечали рост культур в жидкой среде с целобиозой и трегалозой.



Роста не было в жидкой среде с лактозой, галактозой, сахарозой, мальтозой, мелибиозой и инулином. В присутствии этанола роста также не было. Подобные признаки характерны для представителей рода *Sporobolomyces* [5, 6, 8].

Таблица 1

Морфологические признаки выделенных возбудителей меловой болезни

Table 1

Morphological characteristics of isolated lime disease pathogens

Тип	Форма и расположение клеток
1 (n=16)	Овальные, продолговатые клетки. Материнские и дочерние клетки образуют цепочки
2 (n=7)	Крупные клетки округлой или овальной формы, располагаются поодиночке или попарно, образуют хаотичные скопления
3 (n=4)	Округлые, расположенные поодиночке клетки
4 (n=1)	Клетки овальной формы, образующие ветвящиеся цепочки, почкующиеся на концах

При посеве на твердую питательную среду культур, отнесенных к морфотипу 3, отмечали образование грязно-белых матовых колоний диаметром до 5 мм. Колонии бугристые, округлой формы с волнистым краем. При засеве в жидкое солодовое сусло отмечали значительное помутнение, а на поверхности образовалась тонкая грязно-белая пленка, на дне пробирки обнаруживался небольшой осадок. Выявляли рост на жидкой среде с глюкозой, сахарозой, целобиозой, галактозой, мальтозой и трегалозой. Роста не было на жидкой среде с рамнозой, лактозой, мелибиозой и инулином. Единственная культура, отнесенная к морфотипу 4, на сусло-агаре образовывала блестящие бежевые с желтизной колонии диаметром до 3 мм. Форма колоний круглая, край ровный, колонии выпуклые. При росте на жидком солодовом сусле отмечали значительное помутнение с формированием осадка и небольшим пристеночным ростом у поверхности. Выявляли рост на жидких средах с глюкозой, целобиозой, сахарозой, галактозой, мальтозой, трегалозой и в присутствии этанола. Рост не выявляли на жидкой среде с рамнозой, мелибиозой и инулином. Культуры морфотипов 3 и 4 отнесены к роду *Huiphopichia*.

Таким образом, проведенная идентификация показала наличие 3 возбудителей меловой болезни на хлебобулочных изделиях, изготовленных из муки разных видов (табл. 2).

Анализ частоты встречаемости контаминации указанными грибами различных видов продукции показал, что представители всех трех родов микроорганизмов вызывали меловую болезнь хлеба из обоих типов муки. Больше количество случаев выявления контаминации имело место на хлебе из ржаной

муки (общая доля образцов хлеба из которой составляла 71,4 %), что косвенно может свидетельствовать о большей подверженности к контаминации хлеба из ржаных сортов муки. Рост 4 морфотипа был выявлен в единственном случае на образце хлеба, содержащем фрукты (черный хлеб с курагой и изюмом), что позволяет предположить контаминацию хлебного изделия через сухофрукты.

Таблица 2

**Частота встречаемости грибов-контаминантов
в зависимости от типа муки**

Table 2

Occurrence frequency of yeasts-contaminants depending on the type of flour

Тип муки	Микроорганизм		
	<i>Saccharomycopsis</i>	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Hyphopichia</i>
Пшеничная, n=8	2	2	4
Ржаная, n=20	14	5	1

Для всех выделенных штаммов были проведены исследования для подтверждения их роли как контаминантов хлебобулочных изделий (табл. 3).

Таблица 3

Характеристика проявлений признаков меловой болезни хлеба из ржаной муки

Table 3

Characteristic of lime disease symptoms of bread made of rye flour

Признаки болезни	Микроорганизм		
	<i>Saccharomycopsis</i>	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Hyphopichia</i>
Крупные очаги на мякише (зона роста более 1 см), налет на корке	1	4	-
Очаги только на мякише	2	1	-
Очаги только на корке	4	-	1
Слабое проявление признаков (зона роста менее 5 мм)	9	2	4

Установлено, что все выделенные штаммы вызывали появление признаков меловой болезни хлеба, что подтверждает их роль как контаминантов. Выявлено, что только 5 из 28 штаммов (17,9 %) вызывали сильное проявление



признаков болезни хлеба. Большинство штаммов (15/ 53,5 %) вызывали слабые проявления признаков. Для остальных штаммов выявлены одиночные признаки только на мякише (10,7 %) или только на корке (17,9 %).

Анализ данных характера поражения, приведенный в табл. 3, показал, что из исследуемых штаммов наиболее сильные признаки меловой болезни хлеба вызвали культуры представителей рода *Sporobolomyces*, 57,1 % штаммов которого провоцировали появление крупных очагов поражения. Для культур представителей родов *Saccharomycopsis* и *Huiphovichia* выявлены преимущественно слабые проявления признаков болезни, что указывает на сложности в выявлении поражения хлеба этими возбудителями в производственных условиях и своевременное снятие товара с реализации.

Таким образом, исследованиями установлено, что из 28 образцов хлебо-булочной продукции с признаками меловой болезни 57,1 % было контаминировано представителями рода *Saccharomycopsis*, 25,0 % – *Sporobolomyces*, 17,9 % – *Huiphovichia*; частота контаминации хлебобулочных изделий выше среди изделий из ржаной муки – 71,4 % образцов; экспериментальное контаминирование выделенными штаммами хлеба из ржаной муки позволило установить, что зона роста при внесении суспензии клеток для 17,9 % штаммов составила более 1 см в диаметре, а для 53,5 % штаммов зона роста не превышала 5 мм в диаметре; определено, что 57,1 % штаммов *Sporobolomyces* провоцировали появление очагов поражения хлеба с диаметром более 1 см, что указывает на наибольшую значимость этого микроорганизма в порче хлебной продукции.

УДК 579.674: 664.66.019

І.Б. Висотіна, О.С. Воронкова, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,
просп. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
e-mail: irafarma@mail.ru

МОНІТОРИНГ ГРИБІВ – КОНТАМІНАНТІВ ХЛІБОБУЛОЧНИХ ВИРОБІВ

Реферат

Мета. Визначити збудників крейдяної хвороби хліба. **Методи.** Мікробіологічні – для визначення грибної контамінації хлібобулочних виробів з ознаками ураження хліба шляхом опису морфологічних ознак хвороби, вивчення мікроскопічної картини і проведення культуральних досліджень. **Результати.** Встановлено, що найчастіше контамінація хліба була викликана представниками роду *Saccharomycopsis* (57,1 % випадків), також виявляли види родів *Sporobolomyces* (25,0 %) і *Huiphovichia* (17,9 %). Експериментальна контамінація виділеними штамами показала, що тільки у 17,9 % випадків зона росту гриба перевищувала 1 см у діаметрі, а в 53,5 % – вона була менше за 5 мм. Для 57,1 % штампів *Sporobolomyces* при експериментальній контамінації хлібобулочних виробів зона росту перевищувала 1 см. Нанесення суспензій клітин культур інших виділених контамінантів також призводило до появи ознак крейдяної хвороби, але зона росту не перевищувала 5 мм. **Висновки.** При відборі матеріалу для досліджень



було встановлено, що грибна контамінація в більшості випадків спостерігається серед виробів з житнього борошна (71,4%). Переважними контамінантами були види роду *Saccharomycopsis* (57,1% випадків). Зона росту гриба більше 1 см в діаметрі при експериментальному зараженні виявлена тільки у 17,9% випадків, що потенційно вказує на складність ефективного розпізнавання контамінованої продукції у виробничих умовах і вимагає розробки заходів щодо попередження поширення збудників хвороб хліба.

Ключові слова: крейджана хвороба, хліб, контамінація, дріжджові гриби.

УДК 579.674: 664.66.019

I.B. Vysotina, O.S. Voronkova, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University,
72, Gagarin avenue, Dnepropetrovsk, 49050, Ukraine, e-mail: irafarma@mail.ru

MONITORING OF YEASTS CAUSED BAKERY PRODUCTS CONTAMINATION

Summary

Aim. The aim of the research was to determine the contaminants of bread, caused lime disease. **Methods.** Microbiological methods were used to determine the yeast contamination of bakery products with signs of bread's disease by describing the morphological signs of the contamination, there were also used the microscopy and cultural study. **The results.** It was found, that in the most cases the contamination was caused by the species of genus *Saccharomycopsis* (57.1% of cases), the species of genera *Sporobolomyces* (25.0%) and *Hyphopichia* (17.9%) were isolated as well. The experimental contamination with the isolated strains showed that only in 17.9% of cases zone of fungal growth was more than 1 cm in diameter, and in 53.5% of cases it was less than 5 mm. 57.1% of *Sporobolomyces* strains in experimental contamination of bakery products caused the formation of the growth zone with more than 1 cm in diameter. Application of cell suspension of other isolated contaminants cultures also led to the manifestation of the lime disease signs, but the growth zone did not exceed 5 mm. **Conclusions.** During the selection of material for the research, it was found that in most cases the fungal contamination took place among the products of rye flour (71.4%). The preferred contaminants were species of genus *Saccharomycopsis* (57.1% cases). In the experimental infection the fungal growth zone of more than 1 cm in diameter was found only in 17.9% of cases. That potentially indicates the complexity of the effective recognition of contaminated products in production environment and demands the development of measures to prevent the spread of pathogens of bread diseases.

Keywords: lime disease, bread, contamination, yeasts.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Л. Я. Технология хлебопекарного производства. – СПб.: Профессия, 2009. – 416 с.
2. Афанасьева О. В. Микробиология хлебопекарного производства. – СПб.: Береста, 2003. – 220 с.
3. Бабьева И. П., Голубев В. И. Методы выделения и идентификации дрожжей. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 120 с.
4. Блекберн К. де В. Микробиологическая порча пищевых продуктов / К. де В. Блекберн (ред.). Пер с англ. – СПб.: Профессия, 2008. – 784 с.
5. Красникова Л. В., Савкина О. А., Машкин Д. В. Возбудители меловой болезни хлебобулочных изделий // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия Процессы и аппараты пищевых производств. – 2011. – № 2 (12). – С. 123–130.
6. Красникова Л. В., Кострова И. Е., Машкин Д. В. Микробиологические процессы при производстве хлеба, кондитерских и макаронных изделий. – СПб.: СПбГУНиПТ, 2007. – 132 с.
7. Матвеева И. В., Белявская И. Г. Биотехнологические основы приготовления хлеба. – М: Делипринт, 2001. – 150 с.
8. *The Yeasts: A taxonomic study* (5th ed.) / ed. C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout. – San Diego: Elsevier, 2011. – 2384 p. Режим доступа: [<https://books.google.ca/books>].

Стаття надійшла до редакції 11.06.2015 р.

