

УДК 579.674

ДРОЖЖЕВАЯ МИКРОФЛОРА МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, РЕАЛИЗУЕМЫХ В РОССИИ

© 2024 г. А. Ю. Туаева^а, А. М. Пономарева^{а, б}, В. А. Лившиц^а, Е. С. Наумова^{а, *}

^аНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182, Россия

^бРоссийский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, 125047, Россия

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 23.03.2024 г.

После доработки 25.04.2024 г.

Принята к публикации 29.04.2024 г.

С помощью рестрикционного анализа 5.8S-ITS-фрагмента рДНК и секвенирования домена D1/D2 26S рДНК изучена дрожжевая микрофлора различных молочных продуктов, реализуемых в России. В большинстве изученных кисломолочных продуктов доминировали утилизирующие лактозу дрожжи *Kluveromyces* и *Debaryomyces*, а также Lac^- дрожжи *Saccharomyces*, *Monosporozyma*, *Pichia*, *Geotrichum* и *Yarrowia*. Дрожжи *Kluveromyces marxianus* присутствовали в большинстве изученных кисломолочных продуктов, тогда как родственный вид *K. lactis* обнаружен только в некоторых образцах айрана, творога и сыра. Доминирование *K. marxianus*, по-видимому, связано с их физиологическими особенностями (термо- и осмоотолерантность), которые обеспечивают этим дрожжам лучшую приспособляемость к промышленным условиям ферментации. Доминирующие в напитках смешанного брожения виды *Saccharomyces cerevisiae* и *Monosporozyma unispora* полностью отсутствовали в сырах и продуктах молочнокислого брожения. В целом, видовой состав дрожжей в значительной степени зависел от кисломолочного продукта, вида молока и конкретного производителя.

Ключевые слова: дрожжевая микрофлора молочных продуктов России, доминирующие виды *Kluveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Monosporozyma unispora*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia fermentans*

DOI: 10.31857/S0026365624050106

Молоко и молочные продукты являются важной составной частью рациона человека с древних времен. Согласно археологическим данным и протеомному анализу остатков молочного жира и белка на древних керамических сосудах, а также зубного камня человеческих останков, потребление животного молока началось в Анатолии (регион современной Турции) в седьмом тысячелетии до нашей эры, а позднее распространилось по Европе, евразийским степям и Северной Африке (Charlton et al., 2019; Wilkin, 2022).

Помимо молока и разных типов сыров, молочная промышленность России производит разнообразные кисломолочные продукты. Состав конечного кисломолочного продукта, а также его органолептические характеристики, во многом зависят от вида молока, которое использовалось для его изготовления. В настоящее время основным сырьем для промышленного производства молочных продуктов является коровье молоко. Молоко других млекопитающих в основном используется для производства национальных кисломолочных продуктов

(тан, айран, кумыс, мацони, катык, курут, шубат и другие), которые производятся также из козьего, кобыльего, верблюжьего, овечьего и молока буйволицы. Национальные кисломолочные продукты не так давно стали частью ассортимента молочных продуктов, доступных российским потребителям.

Кроме вида молока на конечный состав и органолептические показатели кисломолочного продукта значительно влияет используемая закваска, условия и продолжительность ферментации. В зависимости от используемой закваски кисломолочные продукты подразделяются на две основные группы: продукты молочнокислого брожения (йогурт, ацидофилин, простокваша, творог, варенец, ряженка, мацони, сметана и др.) и продукты смешанного — молочнокислого и спиртового брожения (кефир, кумыс, айран, тан, шубат и др.). Наряду с молочнокислыми бактериями основными компонентами микробиоты различных кисломолочных продуктов являются дрожжи, которые в процессе своей жизнедеятельности обогащают их витаминами, органическими кислотами и другими биологически активными

веществами. Особую роль в молочной промышленности играют лактозосбраживающие дрожжи, которые образуют спирт и углекислоту, улучшают органолептические свойства готового продукта и подавляют развитие вызывающих порчу микроорганизмов (Скородумова, 1969; Fröhlich-Wyder, 2003; Козырева и соавт., 2009; Fröhlich-Wyder et al., 2019).

Дрожжевая микрофлора различных кисломолочных продуктов (кефира, простокваши, кумыса и катыка) изучалась микробиологами Санкт-Петербурга еще в Российской Империи (Николаева, 1907; Бачинская-Райченко, 1911; Бачинская, 1913; Бачинская, Юницкая, 1916). Исследование дрожжей традиционных и национальных кисломолочных продуктов активно продолжилось в СССР (Богданов, 1930; Старыгина и соавт., 1934; Войткевич и соавт., 1936; Саруханян и соавт., 1936; Скородумова, 1969). В.И. Кудрявцев выделил около 40 штаммов лактозосбраживающих дрожжей из айрана, варенца, мацуна, ряженки и других кисломолочных продуктов в разных регионах СССР (Кудрявцев, 1954).

В последние годы в мире растет популярность использования функциональных продуктов питания, оказывающих благоприятное влияние на здоровье человека. Безусловными лидерами среди них являются кисломолочные продукты, в основном смешанного брожения (Kazou et al., 2021). Наиболее распространенным кисломолочным продуктом смешанного брожения является кефир, для приготовления которого используется кефирная закваска (кефирные зерна или кефирный гриб), представляющая собой устойчивое микробное сообщество молочнокислых и уксуснокислых бактерий, а также различных видов дрожжей (Nejati et al., 2020; Дин и соавт., 2022; González-Orozco et al., 2022). Такой разнообразный состав микробиоты кефира способствует высокой функциональной ценности продукта и комплексному пробиотическому воздействию на организм человека (Farnworth, 2005). Потребление кефира во всем мире значительно выросло, что связано не только с его уникальными вкусовыми качествами, но также с большим содержанием биологически активных соединений, таких как пептиды и витамины (Farnworth, 2005; Azizi et al., 2021). Кефир является одним из самых любимых функциональных молочных продуктов. Считается, что он возник в горах Северного Кавказа, Тибета и Монголии, и на протяжении веков его производили кустарно, а в настоящее время кефир производится промышленно в различных странах мира, включая Россию (Farnworth, 2005; Wszolek et al., 2006; González-Orozco et al., 2022).

Традиционным кисломолочным напитком смешанного брожения также является кумыс, изготавливаемый из кобыльего молока и закваски, в которую входят молочнокислые, уксуснокислые бактерии и дрожжи (Холдина и соавт., 2021). Благодаря содержанию большого количества витаминов,

минеральных элементов и полиненасыщенных жирных кислот кумыс обладает лечебными свойствами и применяется в традиционной медицине (Jastrzębska et al., 2017). Родиной кумыса является Центральная Азия, он производится в Китае, Монголии, Казахстане, Киргизии и в ряде регионов России (Бурятия, Калмыкия, Башкирия, Татарстан) (Холдина и соавт., 2021). Показано, что бактериальный и дрожжевой состав кумыса зависит от региона изготовления (Guo et al., 2019). Недавно были проведены исследования бактериальной микрофлоры различных аутентичных кисломолочных продуктов России (Kochetkova et al., 2022). Однако дрожжевая микрофлора при этом не изучалась.

Целью настоящего исследования является изучение дрожжевой микрофлоры разных молочных продуктов, реализуемых сегодня в России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микробиологические методы. Молочные продукты, из которых проводилось выделение дрожжей, и место их изготовления представлены в табл. 1. Продукты покупали в супермаркетах, на рынке и в специализированных магазинах в Москве и Московской области в 2022 (сентябрь–ноябрь) и 2023 (февраль–март) годах. Стерильным инструментом отбирали пробу молочного продукта и помещали ее в колбу с жидкой средой УР (г/л): глюкоза (“РеаХим”, Россия) – 20; дрожжевой экстракт (“Difco”, США) – 10; пептон – 20 (“Difco”). Выращивали при температуре 28°C в течение 2 сут.

После культивирования биомассу рассеивали истощающимся штрихом на агаризованную YPD-среду с добавлением антибиотика хлорамфеникола и субстрата X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид). Антибиотик добавляли в виде 3% спиртового раствора в количестве 0.5 мл на 100 мл среды. Состав агаризованной YPD-среды такой же как УР-среды, но с добавлением 2%-ного бакто-агара (“Difco”, США). Среду разливали в количестве 30 мл на одну чашку Петри. После застывания среды на чашку добавляли 200 мкл раствора X-gal с концентрацией 7 мг/мл в ДМФА (диметилформамид) и растирали стерильным шпателем до полного впитывания. Культивировали 2 сут при температуре 28°C. Отбор штаммов дрожжей проводили по морфологии колоний и клеток.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). ДНК выделяли согласно протоколу, разработанному Løoke et al. (2011). Амплификацию 5.8S-ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2, проводили при помощи следующей пары праймеров: ITS1 (5'-TCCGTAAGGTGAACCTGCGG-3')

и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTTGATATTGC-3') (White et al., 1990). Для амплификации домена D1/D2 26S рДНК использовали праймеры NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG-3'), NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 mM MgCl₂, 0.05 mM каждого дНТФ, 30 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы *Taq*-полимеразы ("Helicon", Россия), 20–200 нг ДНК. Режим проведения ПЦР: начальная денатурация при 94°C – 5 мин; затем 35 циклов по следующей схеме: денатурация при 94°C – 45 с, отжиг праймеров при 52°C – 30 с, элонгация при 72°C – 120 с; конечная элонгация при 72°C – 10 мин. Продукты амплификации электрофоретически разделяли в 1% агарозном геле при 50–55 В в 0.5×ТВЕ буфере (45 mM Трис, 10 mM ЭДТА, 45 mM борная кислота; pH 8.0) в течение 1–1.5 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали препарат 1 kb DNA Ladder ("Fermentas", Литва).

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) амплифицированных ITS-фрагментов проводили с помощью эндонуклеаз рестрикции *Hae*III, *Hind*III, *Hinf*I, *Bsr*DI ("Fermentas", Литва). В качестве контроля использовали видовые тестерные штаммы. Рестрикцию проводили при температуре 37°C в течение 12–16 ч. Разделение полученных фрагментов проводили в 1.5–2% агарозном геле при 50–55 В в 0.5×ТВЕ буфере в течение 2.5–3 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, а затем промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). Размеры фрагментов определяли при помощи маркера молекулярных весов 100 bp DNA Ladder ("Fermentas", Литва).

Секвенирование. Видовую принадлежность дрожжей определяли при помощи секвенирования домена D1/D2 26S рДНК. Нуклеотидные последовательности домена D1/D2 определяли по двум цепям с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе "Applied Biosystems 3730" (США). Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями проводили с помощью программы BLAST в базе данных GenBank. Полученные в данной работе нуклеотидные последовательности заложены в GenBank под регистрационными номерами: PP690503–PP690508, PP691122–PP691129 и PP692094–PP692103.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дрожжи выделяли из молочных продуктов, произведенных из различных видов молока (коровьего, козьего, кобыльего, овечьего) в разных

регионах России, в Белоруссии, Киргизии и Турции (таблица).

Всего было изучено 86 молочных продуктов и 4 закваски; 60 продуктов и все закваски произведены в России. Дрожжевую микрофлору не удалось выделить из 28 продуктов молочнокислого брожения, для изготовления которых традиционно используется бактериальная закваска: варенец, каймак, катык, йогурт, курут, масло сливочное и кисломолочное, простокваша, ряженка, творог, сметана, мацони. Однако из 12 продуктов молочнокислого брожения дрожжи были выделены (таблица). В некоторых кисломолочных продуктах смешанного брожения дрожжи не были обнаружены: в трех образцах кефира (Минск, Белоруссия и г. Коломна, Московская обл.), а также в одной закваске для кефира и одной для айрана (Челябинская область).

Принимая во внимание, что усваивающие и не усваивающие лактозу дрожжи не различаются по морфологии колоний, сначала мы подобрали селективную среду для их четкой дифференциации. Для этого были использованы две питательные селективные среды: минимальная среда с лактозой и YPD-среда с добавлением субстрата X-gal, который расщепляется ферментом β-галактозидазой с образованием 5,5'-дибромо-4,4'-дихлоро-индиго, окрашивающего колонии дрожжей в синий или голубой цвет. Более четкие результаты были получены при использовании селективной среды с X-gal, поэтому в дальнейшем именно на ней проводили отбор штаммов (рис. 1).

Видовая идентификация дрожжей. Первичную идентификацию дрожжей проводили по типу колоний, морфологии и размерам клеток. У некоторых штаммов также присутствовала мицелиальная форма. Всего из изученных молочных продуктов было выделено 193 штамма дрожжей, 55 из которых были способны утилизировать лактозу. Видовую принадлежность выделенных дрожжей определяли с помощью рестрикционного (ПДРФ) анализа ПЦР-амплифицированного 5.8-ITS-фрагмента рДНК, включающего внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2 и ген 5.8S рРНК. Следует отметить, что ITS1/ITS2-участок является одним из основных молекулярных маркеров (баркодов) для видовой идентификации аскомицетных дрожжей, а в GenBank имеется обширная база дрожжевых ITS-последовательностей (Vu et al., 2016). Известно, что длина 5.8-ITS фрагмента одинакова у видов одного рода, тогда как его последовательность варьирует у разных видов (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Поэтому с помощью рестрикционного анализа ПЦР-амплифицированных 5.8-ITS фрагментов можно проводить видовую идентификацию штаммов дрожжей.

Лактозуусваивающие дрожжи разделились на три группы по размерам 5.8-ITS-фрагмента: 740, 650 и 425 п.н. (рисунок не приводится). Первые два

Таблица. Видовой состав дрожжевой микрофлоры различных молочных продуктов

Молочный продукт и место его изготовления	Видовой состав	
Продукты смешанного брожения		
Коровье молоко		
Айран	Кабардино-Балкария, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Айран	Ростов-на-Дону, Россия	<i>Pichia fermentans</i>
Айран	Калужская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Айран фермерский	Тульская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i>
Айран турецкий	Московская обл., Россия	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia fermentans</i>
Айран турецкий	Рязанская обл., Россия	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Айран турецкий	Московская обл., Россия	<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Candida intermedia</i>
Аралаш	Киргизия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Бакай Курут	Киргизия	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Candida parapsilosis</i>
Кефир	Брест, Белоруссия	<i>Maudiozyma turicensis</i>
Кефир	Минск, Белоруссия	<i>Maudiozyma turicensis</i>
Кефир	Белгородская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Кефир	Владимирская обл., Россия	<i>Pichia fermentans</i>
Кефир	Воронеж, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Monosporozyma unispora</i>
Кефир	Воронежская обл., Россия	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida zeylanoides</i>
Кефир	Кабардино-Балкария, Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Кефир	Костромская обл., Россия	<i>Pichia fermentans</i>
Кефир	Краснодарский край, Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Кефир	Липецкая обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i>
Кефир	Пензенская обл., Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Monosporozyma unispora</i>
Кефир, обогащенный лактулозой	Пенза, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Geotrichum candidum</i>
Кефир термостатный	Московская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Pichia fermentans</i>
Кефир термостатный	Марий Эл, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Кефир	Калининградская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i>
Кефир фермерский	Тульская обл., Россия	<i>Pichia cactophila</i> , <i>Pichia fermentans</i>
Кефирная закваска	Москва, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Курунга	Улан-Удэ, Бурятия, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Тан	Киргизия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Candida boidinii</i>
Тан	Свердловская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>
Тан домашний	Рязанская обл., Россия	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Чалап	Бишкек, Киргизия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Козье молоко		
Кефир	Адыгея, Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Кефир	Владимирская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i>
Кобылье молоко		
Кумыс	Тверская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i>
Кумыс татарский фермерский	Тульская обл., Россия	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida tropicalis</i>

Окончание таблицы

Молочный продукт и место его изготовления		Видовой состав
Кумыс	Башкортостан, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia deserticola</i>
Кумыс	Марий Эл, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia manshurica</i> , <i>Pichia fermentans</i>
Кумысная закваска	Челябинская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>
Продукты молочнокислого брожения		
Коровье молоко		
Ацидофилин	Калужская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Мацони	Тверская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia cactophila</i>
Ряженка	Минск, Белоруссия	<i>Geotrichum candidum</i>
Ряженка	Нальчик, Кабардино-Балкария, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Творог 4%	Тульская обл., Россия	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia fermentans</i>
Творог 9%	Пензенская обл., Россия	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Творог 9%	Борисов, Белоруссия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
Творог 1%	Брест, Белоруссия	<i>Magnusiomyces suaveolens</i>
Творог 1%	Минск, Белоруссия	<i>Geotrichum galactomycesetum</i> , <i>Pichia cactophila</i>
Козье молоко		
Йогурт 4.5%	Удмуртия, Россия	<i>Geotrichum galactomycesetum</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Pichia inconspicua</i>
Творог 2%	Белгородская обл., Россия	<i>Pichia fermentans</i>
Творог 4%	Марий Эл, Россия	<i>Pichia cactophila</i> , <i>Candida parapsilosis</i>
Сыры		
Сыр овечье-козий рассольный	Турция	<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Pichia membranifaciens</i>
Сыр рассольный	Турция	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Сыр фета рассольный	Воронежская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i>
Сыр адыгейский	Адыгея, Россия	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Candida zeylanoides</i>
Сыр камамбер	Московская обл., Россия	<i>Geotrichum galactomycesetum</i>
Сыр винный фермерский	Тульская обл., Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
Сыр качокавалло фермерский	Тульская обл., Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i>

размера характерны, соответственно, для дрожжей рода *Kluyveromyces* и вида *Debaryomyces hansenii*. С помощью эндонуклеазы *Hind*III можно дифференцировать виды *Kluyveromyces marxianus* и *K. lactis*, тогда как дрожжи *Debaryomyces hansenii* имеют видоспецифичные *Hinf*I и *Hae*III паттерны (Esteve-Zarzoso et al., 1999; Наумова и соавт., 2012).

На основании ПДРФ-анализа среди штаммов первой группы были идентифицированы два вида: *Kluyveromyces marxianus* (36 штаммов) и *K. lactis* (6 штаммов). Все 11 штаммов второй группы были отнесены к виду *Debaryomyces hansenii*. Видовая принадлежность указанных штаммов была

подтверждена с помощью секвенирования домена D1/D2 26S рДНК у 5–6 представителей каждой группы.

Два штамма, размер 5.8-ITS-фрагмента которых составил 425 п.н., были отнесены к виду *Candida intermedia* на основании секвенирования домена D1/D2 26S рДНК.

Неспособные утилизировать лактозу дрожжи значительно отличались по размерам 5.8-ITS-фрагментов (рис. 2).

Большую группу составили штаммы с характерным для дрожжей рода *Saccharomyces* размером ITS-фрагмента: 850 п.н. Все 25 штаммов имели



Рис. 1. Дифференциация усваивающих и не усваивающих лактозу дрожжей на селективной среде YPD с добавлением антибиотика хлорамфеникола и субстрата X-gal.

характерный для вида *S. cerevisiae* *Hae*III-паттерн с четырьмя фрагментами размером 320, 230, 170 и 130 п.н. (Серпова и соавт., 2011). Секвенирование домена D1/D2 26S рДНК подтвердило их принадлежность к виду *S. cerevisiae*.

Многочисленную группу также составили штаммы с размером ITS-фрагмента около 775 п.н., что характерно для дрожжей *Monosporozyma unispora* (син. *Kazachstania unispora*). Двадцать четыре штамма имели *Hae*III-паттерн, характерный для вида *M. unispora*, тогда как два штамма отличались по рестрикционному профилю. Секвенирование

домена D1/D2 26S рДНК показало, что последние два штамма относятся к виду *Maudiozyma turicensis* (син. *Kazachstania turicensis*).

На основании ПДРФ-анализа и последующего секвенирования домена D1/D2 26S рДНК среди выделенных дрожжей было идентифицировано семь видов рода *Pichia*: *P. cactophila*, *P. deserticola*, *P. fermentans*, *P. inconspicua*, *P. kudriavzevii*, *P. membranifaciens* и *P. manshurica*. Большинство штаммов (29) были отнесены к виду *P. fermentans*, тогда как остальные пять видов были представлены единичными изолятами.

Из различных молочных продуктов были также выделены диморфные дрожжи *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum* (син. *Galactomyces candidus*) и *Geotrichum galactomyces* (син. *Galactomyces geotrichum*). Недавно систематика дрожжей рода *Galactomyces* была изменена с учетом нового международного кодекса номенклатуры водорослей, грибов и растений (Шэньчжэньский кодекс, Китай, 2017), на котором был принят принцип “один гриб – одно название” (Zhu et al., 2024). Принимая во внимание, что анаморфа *Geotrichum* была описана раньше телеморфы *Galactomyces*, авторами было выбрано название рода *Geotrichum*. В этой же работе была проведена таксономическая ревизия рода *Magnusiomyces*, в который были перенесены дрожжи *Saprochaete suaveolens* под видовым названием *Magnusiomyces suaveolens* (Zhu et al., 2024).

Кроме того, среди выделенных нами дрожжей были идентифицированы единичные штаммы *Clavispora lusitaniae*, *Magnusiomyces suaveolens* и *Candida*: *C. zeylanoides*, *C. parapsilosis*, *C. boidinii*, *C. tropicalis*. Помимо аскомицетовых дрожжей, был идентифицирован один вид базидиомицетовых дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa*.

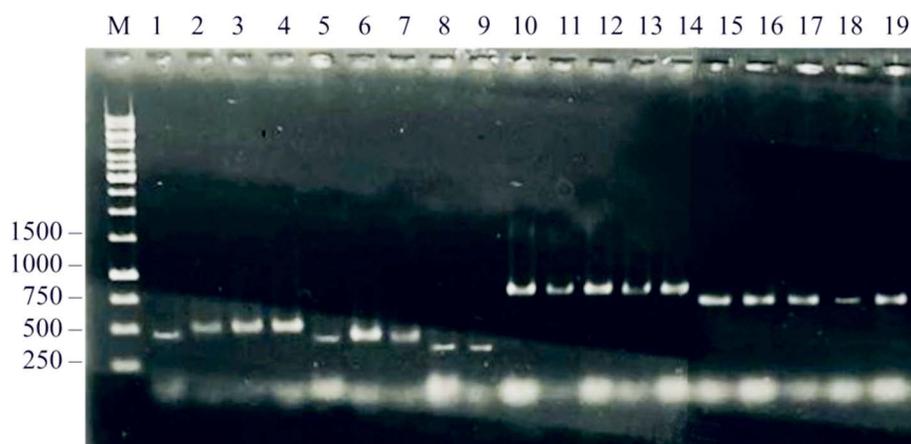


Рис. 2. Размер амплифицированных 5.8S-ITS-фрагментов рДНК штаммов дрожжей, не усваивающих лактозу: 1 – *P. manshurica*; 2 – *P. kudriavzevii*; 3, 4 – *Candida parapsilosis*; 5, 7 – *P. fermentans*; 6 – *Candida boidinii*; 8, 9 – *Yarrowia lipolytica*; 10–14 – *Saccharomyces cerevisiae*; 15–19 – *Monosporozyma unispora*. М – маркер молекулярных весов (п.н.) 1 kb DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

Дрожжевая микрофлора молочных продуктов смешанного брожения. Дрожжи были обнаружены в 19 образцах кефира и в одной кефирной закваске (таблица). При этом видовой состав существенно различался у разных производителей.

Доминирующими видами в кефире из коровьего молока были *Monosporozyma unispora*, *Kluuveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia fermentans*. Дрожжевая микрофлора образцов кефира, произведенных в Белоруссии, была представлена только одним видом *Maudiozyma turicensis*, который не был обнаружен ни в одном из изученных российских образцов. Кроме того, образец кефира, произведенный в Воронежской области, содержал *Geotrichum candidum*, *Candida zeylanoides* и *Candida parapsilosis*, а из фермерского кефира, произведенного в Тульской области, были выделены *Pichia cactophila* и *Pichia fermentans*. Микрофлора кефира из козьего молока была представлена дрожжами *Monosporozyma unispora* и *Debaryomyces hansenii*, которые также часто выделялись из образцов, произведенных из коровьего молока (таблица).

Дрожжевая микрофлора национального бурятского кисломолочного напитка курунга, который рассматривают как кумыс, приготовленный из коровьего молока, была представлена пятью видами, включая лактозосбраживающие дрожжи *Kluuveromyces marxianus* и не усваивающие лактозу виды *Saccharomyces cerevisiae*, *Monosporozyma unispora*, *Pichia fermentans*, *Pichia membranifaciens*.

Дрожжи были обнаружены во всех изученных образцах айрана и тана. Однако их видовой состав различался. Наиболее часто в обоих кисломолочных продуктах встречались ферментирующие лактозу дрожжи *Kluuveromyces marxianus*. Родственный вид *K. lactis* был выделен только из айрана турецкого, произведенного в Московской области (таблица). В двух образцах айрана (Московская и Рязанская обл.) и одном образце тана (Рязанская обл.) присутствовали дрожжи *Yarrowia lipolytica*, которые оказались единственными представителями дрожжевой микрофлоры в рязанских продуктах (таблица). В изготовленном в Московской области айране также обнаружены сбраживающие лактозу дрожжи *Candida intermedia*. Дрожжевая микрофлора киргизских национальных кисломолочных продуктов (аралаш и чалап) представлена дрожжами *Kluuveromyces marxianus* и *Saccharomyces cerevisiae*. В кисломолочном продукте Бакай Курут (Киргизия) были обнаружены только базидиомицетные дрожжи *Rhodotorula mucilaginosa*. Обычно эти дрожжи выделяются из не полностью выдержанных кисломолочных продуктов и зачастую вызывают их порчу (Garnier et al., 2017).

Дрожжевой состав микрофлоры кумыса, национального напитка из кобыльего молока, различался в зависимости от места его производства (таблица). Наименьшим видовым разнообразием

характеризовались образцы из Центральной России (Тверская и Тульская обл.). В то же время дрожжевая микрофлора кумыса и кумысной закваски из более восточных регионов России (Башкортостан, Марий Эл, Челябинская обл.) отличалась большим разнообразием и была представлена дрожжами *Kluuveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* и четырьмя видами рода *Pichia* – *P. fermentans*, *P. kudriavzevii*, *P. deserticola*, *P. manshurica*. Последние два вида были обнаружены нами только в образцах кумыса и отсутствовали в остальных кисломолочных продуктах.

Мы сравнили видовой состав дрожжей изученных кисломолочных продуктов смешанного брожения (рис. 3).

В кисломолочных напитках с высоким содержанием углекислого газа (кефир, кумыс и тан), независимо от использованного для их изготовления вида молока, преобладали дрожжи *Monosporozyma unispora*, *Kluuveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia fermentans* (рис. 3). Несмотря на то, что в айране доминирующими видами также были *Kluuveromyces marxianus* и *Pichia fermentans*, ни в одном из изученных образцов не были обнаружены дрожжи *Monosporozyma unispora*.

В то же время, присутствовали два вида лактозуусваивающих дрожжей (*K. lactis* и *Candida intermedia*), не обнаруженные в других кисломолочных напитках смешанного брожения (рис. 3). Следует отметить, что достаточно часто встречающийся в кефире вид усваивающих лактозу дрожжей *Debaryomyces hansenii* не был обнаружен ни в одном из изученных национальных напитков (тан, айран, кумыс, курунга и др.). Дрожжи *Yarrowia lipolytica* обнаружены только в тане и айране, преимущественно в образцах с более высокой жирностью (айран турецкий и тан домашний).

Дрожжевая микрофлора продуктов молочнокислого брожения. Дрожжи удалось выделить только из мацони (Тверская обл.), двух образцов ряженки, ацидофилина из Калужской области и одного образца йогурта, произведенного из цельного козьего молока в Удмуртии (таблица). Были идентифицированы следующие виды дрожжей: *Clavispora lusitanae*, *Kluuveromyces marxianus*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum galactomycesetum*, *Pichia cactophila* и *Pichia inconspicua*.

Дрожжи были обнаружены в семи образцах творога с разной массовой долей жира (от 1 до 9%) и изготовленных как из коровьего, так и из козьего молока (таблица). Обладающие высокой липолитической активностью дрожжи *Yarrowia lipolytica* присутствовали только в твороге с массовой долей жира 9%. В белорусском образце 9%-ной жирности также обнаружены лактозосбраживающие дрожжи *Kluuveromyces marxianus*. Дрожжевая микрофлора изученных образцов творога с массовой долей жира от 1 до 4% представлена пятью видами: *Geotrichum*

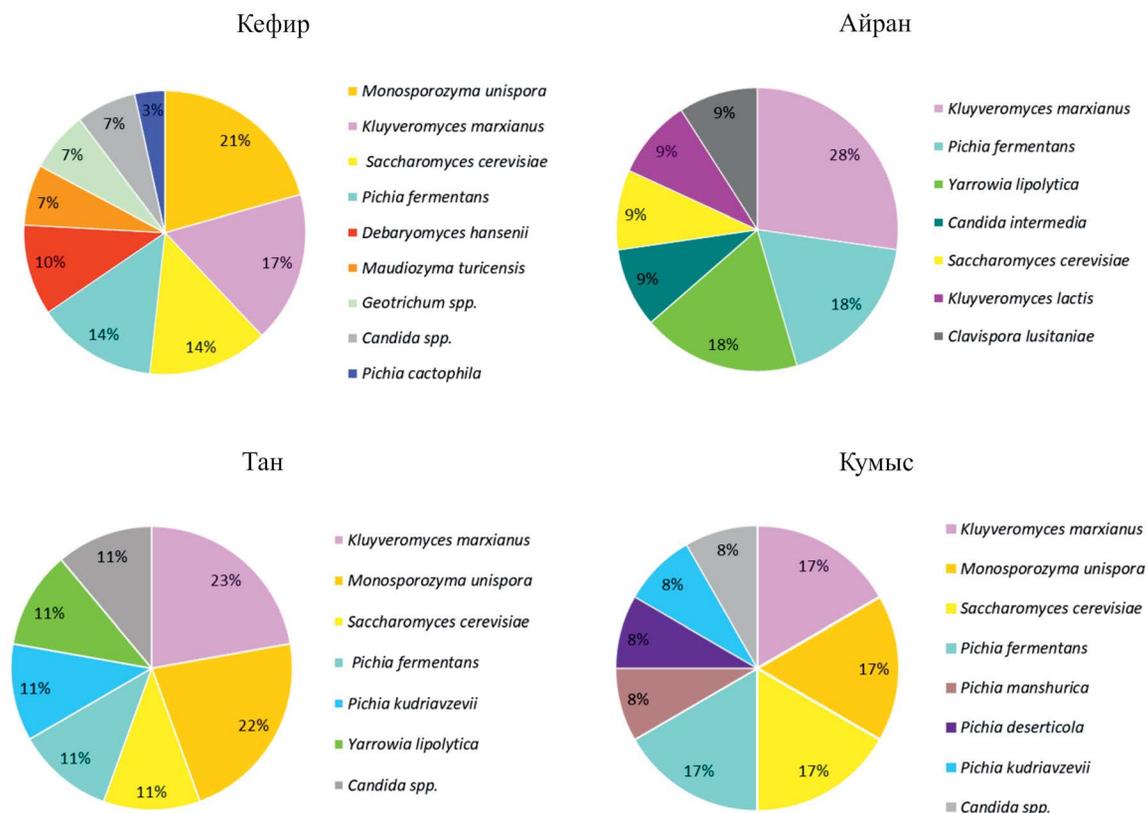


Рис. 3. Сравнительный анализ дрожжевой микрофлоры кисломолочных продуктов смешанного брожения.

galactomycesetum, *Kluyveromyces lactis*, *Magnusiomyces suaveolens*, *Pichia fermentans* и *Pichia cactophila*. Наличие дрожжеподобных грибов рода *Geotrichum* в образцах творога, по-видимому, связано с достаточно высокой протеолитической и липолитической активностью этих дрожжей (Grygier et al., 2017).

Дрожжевая микрофлора сыра. Из 14 изученных образцов дрожжи удалось выделить только из мягких и рассольных сыров, а также из двух полутвердых фермерских сыров (таблица). В целом, микрофлора исследуемых сыров характеризуется преобладанием трех видов дрожжей: *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* и *Kluyveromyces lactis*. Следует отметить, что дрожжи *Debaryomyces hansenii* присутствовали только в фермерских сырах, тогда как в других образцах они отсутствовали. *Yarrowia lipolytica* была обнаружена только в двух рассольных турецких сырах с высоким содержанием жира (25.5 г/100 г), тогда как из рассольного сыра более низкой жирности (16 г/100 г) эти дрожжи не выделялись. Кроме того, турецкий рассольный сыр был изготовлен с добавлением овечьего молока, которое характеризуется более высоким содержанием жира по сравнению с молоком других млекопитающих (Malacarne et al., 2002; Оноприйко и соавт., 2011).

Сыр камамбер, из которого были выделены только дрожжи рода *Geotrichum*, также имеет высокое

содержание жира (23 г/100 г). Важное значение этих дрожжей при производстве сыра заключается в том, что в процессе протеолиза молочного белка казеина они способствуют снижению горечи за счет гидролиза горьких пептидов (Wyder et al., 1999). Дрожжи рода *Pichia* были обнаружены только в двух рассольных сырах (таблица), однако в разных видах сыра присутствовали различные виды этого рода: *P. fermentans* в фете, а *P. membranifaciens* в турецком рассольном сыре. Лактозоусваивающие дрожжи *Kluyveromyces lactis* удалось обнаружить в двух видах сыра, винном и адыгейском, тогда как родственный вид *K. marxianus* был выделен из рассольного сыра фета.

Как в сыре, так и в твороге обнаружены два вида *Kluyveromyces* (*K. lactis* и *K. marxianus*), дрожжи *Yarrowia lipolytica*, *Pichia fermentans* и *Geotrichum galactomycesetum* (рис. 4).

В то же время, видовой состав дрожжевой микрофлоры этих продуктов существенно различался. Дрожжи *Pichia membranifaciens* присутствовали только в сыре, тогда как в твороге обнаружен другой вид этого рода – *P. cactophila* (рис. 4). В образцах творога также отсутствовали лактозоусваивающие дрожжи *Debaryomyces hansenii*. Эти дрожжи имеют большое значение для процесса созревания сыров, так как в процессе своей жизнедеятельности повышают

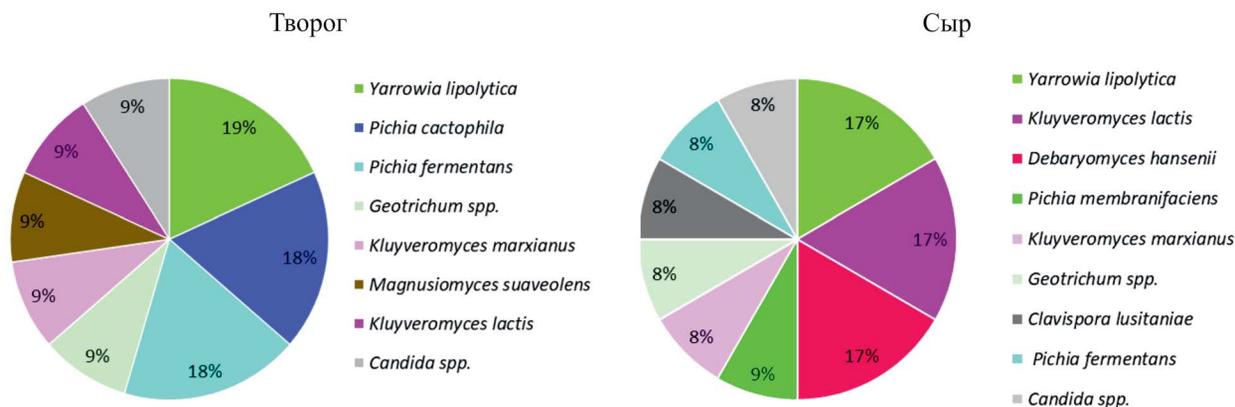


Рис. 4. Сравнительный анализ дрожжевой микрофлоры творога и сыра.

pH среды и, тем самым, способствуют росту молочнокислых бактерий (Fleet, 1990). Следует отметить, что все обнаруженные нами дрожжи находили в соответствующих сырах ранее (Bintsis, 2021).

В отличие от исследованных нами напитков смешанного брожения, в сырах, как и в твороге, отсутствовали виды *Saccharomyces cerevisiae* и *Monosporozyma unispora*, которые активно выделяют углекислый газ в ходе спиртового брожения (рис. 3 и 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о значительном видовом разнообразии дрожжей, присутствующих в различных молочных продуктах, реализуемых в России. При этом дрожжи не были обнаружены в трех образцах кефира, а также в некоторых заквасках для кефира (и айрана). Поскольку это продукты смешанного брожения, то отсутствие в них дрожжей, которые играют ключевую роль в формировании вкуса, аромата и образуют ряд биологически активных веществ, не может не сказаться на их качестве. Именно дрожжи, которые образуют небольшое количество спирта и углекислый газ, придают кисломолочным напиткам определенную остроту. Кроме того, дрожжи препятствуют быстрому их закислению, поскольку частично усваивают молочную кислоту, в которую превращают лактозу молочнокислые бактерии. Интересно отметить, что отсутствие дрожжей было установлено при микробиологическом исследовании двух промышленных образцов кефира в Греции, тогда как ампликон-метагеномный анализ ITS-участка рДНК свидетельствовал об их наличии. Вероятно, это было связано с ПЦР-амплификацией фрагментов рДНК нежизнеспособных клеток (Kazou et al., 2021).

С другой стороны, дрожжи были обнаружены в некоторых изученных нами продуктах

молочнокислого брожения, для изготовления которых традиционно используются закваски на основе молочнокислых бактерий. По-видимому, это нельзя отнести к нарушению технологии их изготовления, поскольку дрожжи не только могут придавать дополнительный вкус и аромат, привлекая покупателей, но и улучшать полезные свойства молочных продуктов.

Дрожжевая микрофлора изученных молочных продуктов представлена как усваивающими лактозу (*Kluyveromyces*, *Debaryomyces* и *Candida*), так и негативными по этому признаку дрожжами *Saccharomyces*, *Maudiozyma*, *Monosporozyma*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Geotrichum*, *Clavispora*, *Magnusiomyces*, *Candida* и *Rhodotorula*. В различных молочных продуктах обнаружено семь видов рода *Pichia*: *P. fermentans*, *P. inconspicua*, *P. kudriavzevii*, *P. cactophila*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica* и *P. deserticola*. Последние два вида характерны только для кумыса, в изготовлении которого используется кобылье молоко. Наиболее часто встречающимся видом рода *Pichia* были дрожжи *P. fermentans*.

В ряде исследованных продуктов были обнаружены дрожжи *Candida*. Как известно, эти микроорганизмы являются симбионтами человека и животных, но некоторые штаммы и при определенных условиях (например, при избыточном размножении), у ослабленных лиц с пониженным иммунитетом могут вызывать тяжелые и угрожающие жизни заболевания (Levenson et al., 1991; Ruan et al., 2010). Следует отметить, что в микробных сообществах сыров с благородной плесенью (сыры с белой плесенью, голубые сыры) обнаруживается целый ряд представителей *Candida* (Desmasures, 2014). В частности, там присутствует *Candida zeylanoides*, обнаруженный нами в одном из образцов кефира и в адыгейском сыре, и *Candida intermedia*, присутствующий в одном из образцов айрана турецкого (Levenson et al., 1991; Ruan et al., 2010).

Сбраживающие лактозу дрожжи рода *Kluyveromyces* были выделены как из национальных напитков (айран, тан, кумыс, мацони и др.), так и из традиционных продуктов (кефир, ацидофилин, ряженка, сыр, творог). Наиболее часто встречались дрожжи *K. marxianus*, которые были выделены из большинства изученных молочных продуктов, тогда как родственный вид *K. lactis* обнаружен только в четырех продуктах: айран турецкий, творог, сыр адыгейский и сыр винный. По-видимому, преобладание дрожжей *K. marxianus* связано с их физиологическими особенностями (термо- и осмоотолерантность) и, как следствие, с большей приспособленностью к промышленным условиям ферментации (например, пастеризации).

В кисломолочных продуктах смешанного брожения преобладающими видами были также дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *Monosporozyma unispora*, которые полностью отсутствовали в продуктах молочнокислого брожения и сырах. Дрожжи *Monosporozyma unispora* не обнаружены во всех изученных образцах айрана. Способные расщеплять жиры дрожжи *Yarrowia lipolytica* присутствовали, в основном, в молочных продуктах повышенной жирности: творог, сыр, айран и тан.

Исследование микрофлоры молочных продуктов с применением различных молекулярных методов, включая метагеномный анализ, в последние годы проводилось многими исследователями в разных странах мира. Особенно большое внимание уделялось изучению микробиоты кефирных зерен и кефира (Marsh et al., 2013; Gut et al., 2019; Wang et al., 2020; Pikkari et al., 2021). Следует отметить, что дрожжи *Monosporozyma unispora*, *Kluyveromyces marxianus* и *Saccharomyces cerevisiae* преобладали повсеместно, хотя их соотношение варьировало в зависимости от географического происхождения кисломолочного продукта (Wang et al., 2020). Считается, что даже небольшое изменение микробиоты в кефирных зернах может привести к значительным изменениям физико-химических, сенсорных и питательных свойств кефирных продуктов. Интересно отметить, что метагеномный анализ впервые показал наличие в кефирных зернах дрожжей *Naumovozyma dairensis*, а также анаэробных бактерий, в частности, *Bifidobacterium* sp. (Pikkari et al., 2021).

Полученные нами результаты и литературные данные указывают на то, что видовой состав дрожевой микрофлоры в значительной степени зависит от конкретного молочного продукта, вида молока и места производства.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бачинская-Райченко А.А. Микроорганизмы кумысной закваски “катык” и кумыса // Тр. СПб. об-ва естествоисп. 1911. Т. XLII. С. 417.
- Бачинская А.А. Микроорганизмы кумыса // Русский врач. 1913. № 13. С. 1.
- Бачинская А.А., Юницкая Ф.А. Микроорганизмы донского кислого молока // Журн. микробиологии. 1916. Т. III. С. 23.
- Богданов В.М. Исследование кубанской простокваши // Тр. Волог. мол.-хоз. ин-та. 1930. № 86.
- Войткевич А.Ф., Халдина М.Ф., Садокова И.П. О выработке кефира на чистых культурах // Микробиология. 1936. Т. V. № 1. С. 116.
- Дин Ф., Красильникова А.А., Леонтьева М.Р., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Анализ кефирных зерен из разных регионов планеты с применением высокопроизводительного секвенирования // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2022. Т. 77. С. 266–272.
- Козырева И.И., Кабисов Р.Г., Цугкиев Б.Г. Свойства микроорганизмов, выделенных из кефирных грибков // Молочная промышленность. 2009. № 3. С. 60–61.
- Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей. М.: Изд-во АН СССР, 1954. 427с.
- Наумова Е.С., Наумов Г.И., Никитина Т.Н., Садыкова А.Ж., Кондратьева В.И. Молекулярно-генетическая и физиологическая дифференциация дрожжей *Kluyveromyces lactis* и *Kluyveromyces marxianus*: анализ штаммов из Всероссийской коллекции микроорганизмов (VKM) // Микробиология. 2012. Т. 81. С. 236–236.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Nikitina T.N., Sadykova A.h., Kondratieva V.I. Molecular genetic and physiological differentiation of *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*: analysis of strains from the All-Russian collection of microorganisms (VKM) // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 216–223.
- Николаева Е.М. Микроорганизмы кефира // Изв. СПб. ботанич. сада. 1907. Т. VII. № 4.
- Оноприйко А.В., Оноприйко В.А., Маслий Е.А. Молочная лестница // Пищевая промышленность. 2011. № 3. С. 8–9.

- Саруханян Ф.Г., Ерзинкян Л.А. Микрофлора и приготовление мацуна на чистых культурах // Молочн. пром-сть СССР. 1936. № 8. С. 31.
- Серпова Е.В., Кишковская С.А., Мартыненко Н.Н., Намумова Е.С. Молекулярно-генетическая идентификация винных дрожжей Крыма // Биотехнология. 2011. № 6. С. 47–54.
- Скородумова А.Н. Дрожжи молока и молочных продуктов и их производственное значение. М.: Пищевая промышленность, 1969. 117 с.
- Старыгина Л., Халдина М. Изучение микрофлоры кефира с целью приготовления его на чистых культурах // Микробиология. 1934. Т. III. № 1. С. 88.
- Холодина А.М., Лайкова А., Сережкин И. Кумыс: микробный состав и особенности ферментации // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 6. С. 58–73.
- Azizi N.F., Kumar M.R., Yeap S.K., Abdullah J.O., Khalid M., Omar A.R., Osman M.A., Mortadza S.A.S., Alitheen N.B. Kefir and its biological activities // Foods. 2021. V. 10. Art. 1210.
- Bintsis T. Yeasts in different types of cheese // AIMS Microbiol. 2021. V. 7. P. 447–470.
- Charlton S., Ramsøe A., Collins M., Craig O.E., Fischer R., Alexander M., Speller C.F. New insights into Neolithic milk consumption through proteomic analysis of dental calculus // Archaeol. Anthropol. Sci. 2019. V. 11. P. 6183–6196.
- Desmaures N. Mold-ripened varieties // Encyclopedia of food microbiology. 2nd ed. / Eds. Batt C.A., Tortello M.R. London: Academic Press, 2014. V. 2. P. 409–416.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 329–337.
- Farnworth E. Kefir – a complex probiotic // Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods. 2005. V. 2. P. 1–17.
- Fleet G.H. Yeasts in dairy products // J. Appl. Bacteriol. 1990. V. 68. P. 199–211.
- Fröhlich-Wyder M.T. Yeasts in dairy products // Yeasts in food / Eds. Boekhout T., Robert V. Woodhead Publishing, 2003. P. 209–237.
- Fröhlich-Wyder M.T., Arias-Roth E., Jakob E. Cheese yeasts // Yeast. 2019. V. 36. P. 129–141.
- Garnier L., Valence F., Mounier J. Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: an update // Microorganisms. 2017. V. 5. Art. 42.
- González-Orozco B.D., García-Cano I., Jiménez-Flores R., Álvarez V.B. Invited review: milk kefir microbiota – direct and indirect antimicrobial effects // J. Dairy Sci. 2022. V. 105. P. 3703–3715.
- Grygier A., Myszka K., Rudzińska M. *Galactomyces geotrichum* moulds from dairy products with high biotechnological potential // Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 2017. V. 16. P. 5–16.
- Guo L., Ya M., Guo Y.S., Xu W.L., Li C.D., Sun J.P., Zhu J.J., Qian J.P. Study of bacterial and fungal community structures in traditional koumiss from Inner Mongolia // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. P. 1972–1984.
- Gut A.M., Vasiljevic T., Yeager T., Donkor O.N. Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties // J. Funct. Foods. 2019. V. 58. P. 56–66.
- Jastrzebska E., Wadas E., Daszkiewicz T., Pietrzak-Fiečko R. Nutritional value and health-promoting properties of mare's milk – a review // Czech. J. Anim. Sci. 2017. V. 62. P. 511–518.
- Ilkkan Ö.K., Bağdat E.Ş. Comparison of bacterial and fungal biodiversity of Turkish kefir grains with high-throughput metagenomic analysis // LWT – Food Sci. Technol. 2021. V. 152. Art. 112375.
- Kazou M., Grafakou A., Tsakalidou E., Georgalaki M. Zooming Into the microbiota of home-made and industrial kefir produced in Greece using classical microbiological and amplicon-based metagenomics analyses // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 621069.
- Kochetkova T.V., Grabarnik I.P., Klyukina A.A., Zayulina K.S., Gavirova L.A., Shcherbakova P.A., Kachmazov G.S., Shestakov A.I., Kublanov I.V. Microbial communities of artisanal fermented milk products from Russia // Microorganisms. 2022. V. 10. P. 21–40.
- Levenson D., Pfaller M.A., Smith M.A., Hollis R., Gerarden T., Tucci C.B., Isenberg H.D. *Candida zeylanoides*: another opportunistic yeast // J. Clin. Microbiol. 1991. V. 29. P. 1689–1692.
- Lõoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications // Biotechniques. 2011. V. 50. P. 325–328.
- Malacarne M., Martuzzi F., Summer A., Mariani P. Protein and fat composition of mare's milk: Some nutritional remarks with reference to human and cow's milk // Int. Dairy J. 2002. V. 12. P. 869–877.
- Marsh A.J., O'Sullivan O., Hill C., Ross R.P., Cotter P.D. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources // PLoS One. 2013. V. 8. Art. e69371.
- Nejati F., Junne S., Neubauer P. A big world in small grain: a review of natural milk kefir starters // Microorganisms. 2020. V. 8. Art. 192.
- Ruan S.Y., Chien J.Y., Hou Y.C., Hsueh P.R. Catheter-related fungemia caused by *Candida intermedia* // Int. J. Infect. Dis. 2010. V. 14. P. 147–149.
- Vu D., Groenewald M., Szöke S., Cardinali G., Eberhardt U., Stielow B., de Vries M., Verkleij G.J.M., Crous P.W., Boekhout T., Robert V. DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation // Stud. Mycol. 2016. V. 85. P. 91–105.
- Wang H., Wang C., Guo M. Autogenic successions of bacteria and fungi in kefir grains from different origins when sub-cultured in goat milk // Food Res. Int. 2020. V. 138. Art. 109784.
- White T.J., Bruns T., Lee E., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. N.Y.: Academic Press, 1990. P. 315–322.

- Wilkin S. The mystery of early milk consumption in Europe // *Nature*. 2022. V. 608. P. 268–269.
- Wszolek M., Kupiec-Teahan B., Skov Guldager H., Tamime A. Y. Production of kefir, koumiss and other related products // *Fermented Milks* / Ed. Tamime A. NJ: Blackwell Science Ltd, 2006. P. 174–216.
- Wyder M. T., Bachmann H. P., Puhani Z. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in foil wrapped Raclette cheese // *LWT – Food Sci. Technol.* 1999. V. 32. P. 333–343.
- Zhu H. Y., Shang Y. J., Wei X. Y., Groenewald M., Robert V., Zhang R. P., Lie A. H., Han P. J., Ji F., Li J. N., Liu X. Z., Bai F. Y. Taxonomic revision of *Geotrichum* and *Magnusiomyces*, with the descriptions of five new *Geotrichum* species from China // *Mycology*. 2024. P. 1–24. <https://doi.org/10.1080/21501203.2023.2294945>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Yeast Microflora of Dairy Products Sold in Russia

A. Yu. Tuaeва¹, A. M. Ponomareva^{1,2}, V. A. Livshits¹, E. S. Naumova^{1,*}

¹ *Kurchatov Institute National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182, Russia*

² *Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125047, Russia*

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Abstract. Using restriction analysis of the 5.8S-ITS rDNA fragment and sequencing of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the yeast microflora of various dairy products sold in Russia was studied. Most of the fermented milk products studied were dominated by lactose-utilizing yeasts *Kluyveromyces* and *Debaryomyces*, as well as lactose-negative yeasts *Saccharomyces*, *Monosporozyma*, *Pichia*, *Geotrichum* and *Yarrowia*. The yeast *Kluyveromyces marxianus* was present in most of the fermented milk products studied, while the related species *K. lactis* was found only in some samples of ayran, curds and cheese. The dominance of *K. marxianus* is apparently associated with their physiological characteristics (thermo- and osmotolerance), which provide these yeasts with better adaptation to industrial fermentation conditions. The dominant species in mixed-fermentation dairy products, *Saccharomyces cerevisiae* and *Monosporozyma unispora*, were completely absent in cheeses and lactic acid fermentation products. In general, the species composition of yeasts largely depended on the fermented milk product, the type of milk and the specific manufacturer.

Keywords: yeast microflora, dairy products sold in Russia, dominant species *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Monosporozyma unispora*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia fermentans*