

УДК 575.852:577.152.3

ОСОБЕННОСТИ ДРОЖЖЕВОЙ МИКРОФЛОРЫ АУТЕНТИЧНЫХ ОСЕТИНСКИХ СЫРОВ

© 2024 г. А. Ю. Туаева¹, Г. С. Качмазов², Е. С. Наумова¹, *

¹ФГБУ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”

“Курчатовский Комплекс НБИКС- Природоподобных Технологий”, Москва, 123182 Россия

²ФГБОУ ВО Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова, Владикавказ, 362025 Россия

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 31.10.2023 г.

После доработки 05.11.2023 г.

Принята к публикации 26.01.2024 г.

Впервые изучена дрожжевая микрофлора рассольных осетинских сыров, изготовленных из сырого молока небольшими фермерскими хозяйствами в разных регионах Северной и Южной Осетии. Было идентифицировано 17 видов дрожжей, относящихся к 10 родам. Показано, что состав дрожжевой микрофлоры осетинских сыров зависит от места изготовления, микрофлоры сырого молока и закваски, а также от вида молока. В большинстве изученных осетинских сыров преобладали утилизирующие лактозу виды *Kluyveromyces lactis* и *Debaryomyces hansenii*, а также не усваивающие лактозу дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* и *P. fermentans*. Состав микрофлоры кустарных осетинских сыров более разнообразен, чем коммерческих сыров, при производстве которых используется пастеризованное молоко.

Ключевые слова: осетинский сыр, сырое молоко, закваска, дрожжевая микрофлора, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.56304/S0234275824010125

Осетинский сыр, относящийся к рассольным полутвердым сырам, является национальным продуктом Республики Северная Осетия-Алания, а в последние годы становится все более популярным и среди потребителей других регионов России, главным образом для изготовления знаменитых осетинских пирогов. Производящийся небольшими фермерскими хозяйствами и хранящийся в рассоле с начальной концентрацией соли 18–20%, [1] осетинский сыр имеет ярко выраженные региональные особенности. Его вкус и качество в значительной степени зависят от природно-климатических условий, кормовой базы, породных особенностей дойного поголовья, санитарных условий и культуры производства частных производителей. Наибольшей аутентичностью отличаются осетинские сыры, произведенные в личных подсобных хозяйствах в горных и предгорных районах республики Северная Осетия-Алания. Это связано с еще сохранившейся традицией производства, особенностями разнотравья альпийских пастбищ, генетическими особенностями горного скота и специфической микрофлорой горных территорий. Традиционно сыр в Северной Осетии изготавливают из сырого молока с добавлением закваски, которую готовят из высушенного говяжьего желудка. Микрофлора исходного сырья оказывает боль-

шое влияние на процесс созревания, а также на физико-химические и органолептические характеристики конечного продукта [2]. В созревании различных типов сыров важную роль играют молочнокислые бактерии [3]. Однако, метаболическое влияние дрожжей на сам процесс и качество конечного продукта, в том числе кустарного приготовления, долгое время недооценивали [4]. Показано, что популяции дрожжей оказывают существенное влияние на вкусовые качества и текстуру сыров, особенно ремесленных, в процессе их производства и созревания [3, 5]. В последние годы проводятся исследования бактериальной микрофлоры различных аутентичных кисломолочных продуктов Северного Кавказа, в том числе осетинского сыра [6, 7]. При этом, дрожжевая микрофлора не изучалась.

Цель работы – изучение разнообразия дрожжевой микрофлоры аутентичных осетинских сыров Северной и Южной Осетии. Для сравнения были использованы коммерческие продукты различных производителей России, Белоруссии, Казахстана и Турции, которые покупались в супермаркетах г. Москвы.

Образцы разной степени зрелости были отобраны в разных фермерских хозяйствах и частных до-

мовладениях Северной и Южной Осетии в 2020, 2021 и 2022 годах в осенний, весенний и летний сезоны. Отбор образцов производили стерильными инструментами и доставляли в лабораторию при температуре 4°C. Для выделения дрожжей отбирали пробу сыра и помещали в колбу с жидкой YP средой (г/л: глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 10, пептон – 20). Культивировали в течение двух суток при температуре 25°C, затем рассеивали петлей на агаризованной селективной полной среде с добавлением антибиотика хлорамфеникола и субстрата X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид). Состав полной YPD-среды такой же, как жидкой YP среды, только с добавлением 2% бакто-агара. Отбор штаммов проводили по культуральным характеристикам колоний. Колонии утилизирующих лактозу дрожжей окрашивались в голубой или сине-зеленый цвет.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли на ДНК-амплификаторе Bio-Rad (США). ДНК выделяли согласно протоколу, разработанному Lboke et al. [8]. Амплификацию домена D1/D2 26S рДНК проводили при помощи следующей пары праймеров: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG-3'), NL4 (5'-GGTCGCTGTTTCAAGACGG-3'). Режим проведения ПЦР описан ранее [9]. Полученные фрагменты элюировали из агарозного геля при помощи набора для выделения Cleanup Mini ("Евроген", Москва) согласно инструкции фирмы производителя. Полученные нуклеотидные последовательности определяли по двум цепям с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 (США). Поиск сходства с известными нуклеотидными последовательностями домена D1/D2 проводили с помощью программы BLAST в базе данных GenBank.

Всего было исследовано 47 образцов сыра, 34 из которых представлены осетинскими сырами различной степени зрелости, произведенными в разных регионах Северной Осетии и в Дзауском районе Южной Осетии (табл. 1). Во всех осетинских образцах дрожжи присутствовали. Выделить дрожжевую микрофлору не удалось только из шести коммерческих сыров: творожный (Тулская обл.), курт (Казахстан), рассольный (Турция), фетакса (Белгородская обл.), Адыгейский (республика Адыгея) и коровий (Турция).

Родовую и видовую принадлежность дрожжей определяли при помощи секвенирования домена D1/D2 рДНК. Из осетинских сыров было выделено 107 штаммов дрожжей, которые по результатам идентификации, были отнесены к 10 родам и 17 видам. Практически во всех образцах осетинского сыра присутствовали лактозуутилизирующие дрожжи *Kluyveromyces* и *Debaryomyces hansenii*, а также не утилизирующие лактозу дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, различные виды *Pichia* и *Candi-*

da. В отдельных образцах присутствовали виды *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia membranifaciens*, *Candida intermedia*, *Kazachstania unispora*, *Clavispora lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Debaryomyces subglobosus*, *Galactomyces geotrichum*, *Yarrowia lipolytica* (табл. 1).

В горных районах республики Северная Осетия были отобраны образцы из семи ущелий, в которых традиционно производится осетинский сыр. Наибольшее видовое разнообразие дрожжей выявлено в сырах из Мамисонского и Сонгутидонского ущелий, а наименьшее из Карцинского и Даргавского. В сырах из всех семи ущелий были обнаружены сбраживающие лактозу дрожжи *Kluyveromyces lactis*, а родственный вид *K. marxianus* присутствовал только в одном образце, произведенном в Трусовском ущелье. Напротив, дрожжи *K. marxianus* обнаружены в большинстве образцов из предгорных территорий и отсутствовали только в сырах, произведенных в Промышленном районе Северной Осетии и Дзауском районе Южной Осетии (табл. 1). В сырах из горных районов доминирующими видами оказались *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, и *K. marxianus*. Однако, полностью отсутствовали следующие виды: *Torulaspora delbrueckii*, *Clavispora lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Yarrowia lipolytica*, *Galactomyces geotrichum*, *Candida inconspicua*. Дрожжи *Kazachstania unispora* присутствовали только в горных образцах (табл. 1). Практически все сыры, произведенные в изученных ущельях и предгорных территориях, обладали уникальной дрожжевой микрофлорой.

Видовой состав дрожжей изменялся также в процессе созревания сыров. Зрелые и молодые осетинские сыры отличаются по ряду показателей: продолжительность созревания, соленость, содержание жира и другим (табл. 2).

Дрожжи *Kluyveromyces lactis* присутствовали как в свежих сырах (малосоленые сыры, 2–3 дня созревания), так и в зрелых (сильносоленые сыры – более 1 года в рассоле). Напротив, дрожжи *Kluyveromyces marxianus* удалось выделить только из слабо- и среднесоленых сыров (табл. 1). Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* встречались в среднесоленых образцах (не более 3 мес в рассоле), в то время как галотолерантный вид *Debaryomyces hansenii*, присутствует в основном, в сильносоленых и выдерживает концентрацию соли до 24% [10].

Сравнение дрожжевой микрофлоры кустарных осетинских и коммерческих сыров представлено на рис. 1.

Из коммерческих сыров было выделено девять видов, относящихся к семи родам: *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Clavispora lusitaniae*, *Galactomyces geotrichum*, *Pichia membranifaciens* (табл. 1). Большинство указанных видов присутствуют также в

Таблица 1. Дрожжевая микрофлора осетинских и коммерческих сыров, места и продолжительность их созревания
Table 1. Yeast microflora of Ossetian and commercial cheeses, places and duration of their ripening

Место изготовления	Сроки созревания сыра или тип сыра	Видовой состав
1	2	3
Горные территории		
Куртатинское ущелье	7 дней	<i>Kluyveromyces lactis</i>
	10 дней	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	15 дней	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia fermentans</i>
	3 мес	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Карцинское ущелье	5 дней	<i>Kluyveromyces lactis</i>
	30 дней	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Мамисонское ущелье	2 дня	<i>Candida zeylanoides</i> , <i>Kazachstania unispora</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia membranifaciens</i>
	9 мес	<i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Debaryomyces subglobosus</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
Сонгутидонское ущелье	4 мес	<i>Pichia kudriavzevii</i>
	6 мес.	<i>Candida zeylanoides</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
	6 мес. (закопанная бочка)	<i>Candida zeylanoides</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
	1 год (закопанная бочка) ^b	<i>Kazachstania unispora</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
	1 год (не закопанная бочка) ^b	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>
Даргавское ущелье	6 мес.	<i>Kluyveromyces lactis</i>
	1.5 года	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Трусовское ущелье	9 дней	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
	1.5 мес.	<i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
	6 мес.	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Дигорское ущелье	3 дня	<i>Pichia kudriavzevii</i>
	10 дней	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
Предгорные территории		
Пригородный район	2 дня	<i>Candida parapsilosis</i>
	4 дня	<i>Clavispora lusitaniae</i>
	7 дней	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
	15 дней	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	17 дней	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i>
	1 мес. (козий)	<i>Pichia kudriavzevii</i>
	3 мес.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
	1 год	<i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>

Таблица 1. Окончание

Место изготовления	Сроки созревания сыра или тип сыра	Видовой состав
1	2	3
Иристонский район	2 мес. (овечий)	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Galactomyces geotrichum</i> , <i>Candida inconspicua</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Debaryomyces subglobosus</i>
Ардонский район	6 мес.	<i>Pichia fermentans</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i>
Промышленный район	20 дней	<i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i>
Дзауский район ^a	9 дней	<i>Candida zeylanoides</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
	1 мес.	<i>Debaryomyces hansenii</i>
	8 мес.	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Коммерческие сыры		
Адыгея, Россия	Сыр Адыгейский	<i>Candida zeylanoides</i>
Турция	Сыр рассольный	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Тульская обл.	Сыр винный, фермерский	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
Московская обл.,	Сыр камамбер	<i>Galactomyces geotrichum</i>
Тульская обл.,	Сыр качокавалло, фермерский	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Воронежская обл.	Сыр фета	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Clavisporea lusitaniae</i>
Турция	Сыр овечьё-козий	<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Pichia membranifaciens</i>
Беларусь, Брест	Сыр белая фета	—
Белгородская обл.	Сыр фетакса	—
Тульская обл.	Сыр творожный, козий	—
Казахстан	Сыр курт	—
Турция	Сыр рассольный	—

Примечание. ^a Южная Осетия, ^b Сыры из одной партии.
 Note. ^a South Ossetia, ^b Cheeses from the same batch.

Таблица 2. Характеристики, определяющие качество зрелого и свежего осетинского сыра (по ГОСТ Р 53421–2009)
 Table 2. Characteristics that determine the quality of mature and fresh Ossetian cheese (according to GOST Р 53421–2009)

Показатели качества	Зрелый	Свежий
Массовая доля жира в пересчете на сухое вещество, %	(45.0 ± 1.6)	(45.04 ± 1.6)
Массовая доля жира, %	22.05	20.7
Массовая доля влаги не более, %	51.0	54.0
Массовая доля влаги в обезжиренном веществе, %	65.4	68.1
Массовая доля поваренной соли, %	До 7.0	1.0–3.0
Продолжительность созревания, сут.	Более 30	5

кустарных осетинских сырах, но в другом соотношении (рис. 1). В целом, состав микрофлоры последних более разнообразен (рис. 1). При традиционной технологии изготовления осетинского сыра применяют сырое молоко и тем самым сохраняется его исходный микробиологический со-

став. Кроме того, используется “дикая” закваска (сычуг), из которой микроорганизмы естественным путем попадают в сыр в процессе его производства. Промышленные сыры готовятся из пастеризованного молока с внесением коммерческой закваски. В коммерческих сырах полностью

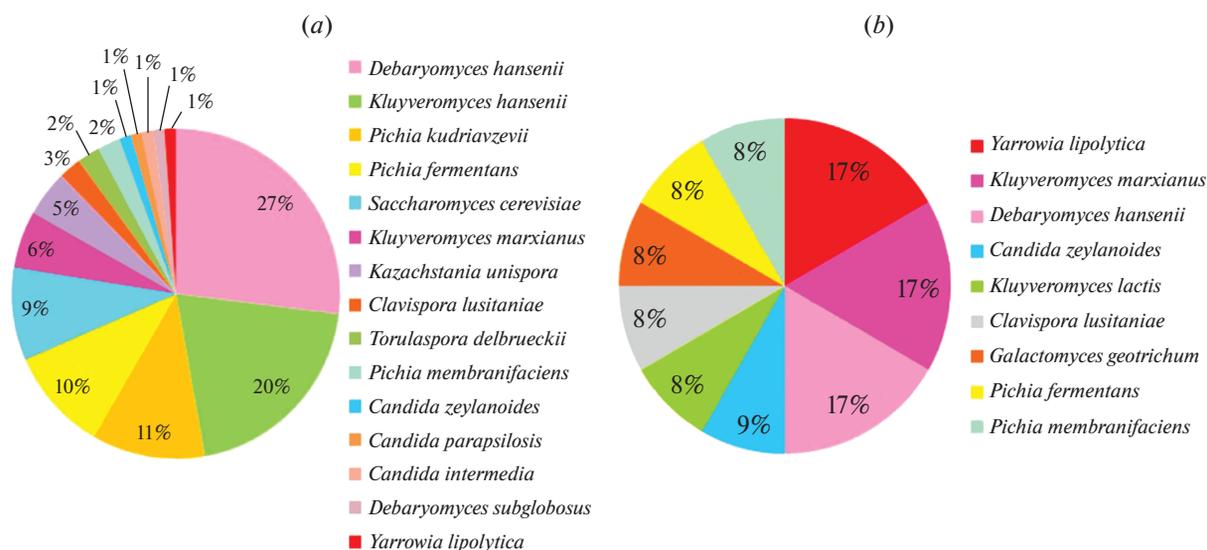


Рис. 1. Сравнительный анализ дрожжевой микрофлоры кустарных осетинских (а) и коммерческих (б) сыров.
Fig. 1. Comparative analysis of the yeast microflora of artisanal Ossetian (a) and commercial (b) cheeses.

отсутствовали дрожжи *S. cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Debaromyces subglobosus*, *Kazachstania unispora* и *Torulasporea delbrueckii*. В тоже время, дрожжеподобные грибы *Galactomyces geotrichum* обнаружены только в коммерческих сырах (табл. 1). В кустарных осетинских сырах доминирующим видом был *Kluyveromyces lactis*, тогда как в сырах массового производства преобладал другой вид этого рода: *K. marxianus*. В отличие от *K. lactis*, дрожжи *K. marxianus* являются термоустойчивыми и способны расти при высокой температуре: 45°C и выше [11]. Поэтому, вид *Kluyveromyces marxianus* более жизнеспособен в технологическом процессе при пастеризации. Дрожжи *K. lactis* также доминировали во французском кустарном полутвердом сыре Салерс, изготовленном из сырого коровьего молока [12]. Дрожжи *Debaromyces hansenii* были доминирующими как в кустарных осетинских, так и коммерческих сырах (рис. 1). В последних также доминировали дрожжи *Yarrowia lipolytica*, которые были обнаружены в трех сырах с высоким содержанием жиров, преимущественно, изготовленных из овечьего молока. Содержание жира в овечьем молоке составляет 6.2%, тогда как в коровьем всего 3.5% [13]. Дрожжи *Y. lipolytica* обладают сильной липолитической и протеолитической активностями и часто встречаются в продуктах с высоким содержанием жира и/или белка [14]. Интересно отметить, что вид *Y. lipolytica* выделен только из одного образца осетинского сыра, произведенного из овечьего молока в Иристонском районе Северной Осетии (табл. 1).

Таким образом, на состав дрожжевой микрофлоры осетинских сыров оказывают влияние несколько факторов: место изготовления, микрофлора сырого молока и закваски, вид молока. Ку-

старный сыр, изготовленный из сырого молока, созревает иначе и приобретает более интенсивный вкус, чем сыр, изготовленный из пастеризованного молока [2]. В отличие от коммерческих сыров, производство и созревание фермерских сыров, включая осетинский, осуществляется более сложным микробным сообществом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Тематического плана НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горелик О.В., Федосеева Н.А., Кныш И.В. Технология производства и качество сычужных сыров из молока коров разных пород. *Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета*, 2019, 57(4), 86–92. <https://doi.org/10.24411/2078-1318-2019-14086>
2. Montel M.C., Buchin S., Mallet A., Delbes-Paus C., Vuitton D.A., Desmasures N., Berthier F. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.*, 2014, 177, 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
3. Bintsis T. Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiol.*, 2021, 7(4), 447–470. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2021027>
4. Fröhlich-Wyder M.T., Arias-Roth E., Jakob E. Cheese yeasts. *Yeast.*, 2019, 36(3), 129–141. <https://doi.org/10.1002/yea.3368>
5. Zheng X., Shi X., Wang B. A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Front Microbiol.*, 2021, 12, 703284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703284>

6. 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, 10(11), 21–40. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112140>
7. 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., Elcheninov A.G. The bacterial microbiota of artisanal cheeses from the Northern Caucasus. *Fermentation*, 2023, 9, 719. <https://doi.org/10.3390/fermentation9080719>
8. Lõoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 2011, 50(5), 325–328.
9. Боровкова А.Н., Михайлова Ю.В., Наумова Е.С. Молекулярно-генетические особенности биологических видов дрожжей рода *Saccharomyces*. *Микробиология*, 2020, 89(4), 390–399. <https://doi.org/10.1134/S0026261720040037>
10. Lépingle A., Casaregola S., Neuvéglise C., Bon E., Nguyen H., Artiguenave F., Wincker P., Gaillardin C. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. *FEBS Lett.*, 2000, 487(1), 82–86. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02285-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02285-7)
11. Ai Y., Luo T., Yu Y., Zhou J., Lu H. Down regulation of ammonium uptake improves the growth and tolerance of *Kluyveromyces marxianus* at high temperature. *Microbiologyopen*. 2022.
12. Callon C., Delbès C., Duthoit F., Montel M.C. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2006, 29(2), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.008>
13. Оноприйко А.В., Оноприйко В.А., Маслий Е.А. Молочная лестница. *Пищевая промышленность*, 2011, 3, 8–9.
14. Nicaud J.-M. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 2012, 29(10), 409–418. <https://doi.org/10.1002/yea.2921>

Peculiarities of the Yeast Microflora of Authentic Ossetia Cheeses

A. Yu. Tuueva^a, G. S. Kachmazov^b, and E. S. Naumova^{a, #}

^aKurchatov Complex NBIKS, Kurchatov Institute National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

^bNorth Ossetian State University after K.L. Khetagurov, Vladikavkaz, 362025 Russia

[#]e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Abstract—Yeast microflora of brined Ossetia cheeses made from raw milk by small farms in various regions of North and South Ossetia has been studied, for the first time. A total of 17 yeast species belonging to 10 genera were identified. It is shown that the composition of the yeast microflora of Ossetia cheeses depends on the place of production, the microflora of raw milk and starter culture, as well as on the type of milk. Most of the studied Ossetian cheeses were dominated by lactose-utilizing yeasts *Kluyveromyces lactis* and *Debaryomyces hansenii*, as well as by lactose-negative yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* and *P. fermentans*. The composition of the microflora of artisanal Ossetia cheeses is more diverse than that of commercial cheeses produced from pasteurized milk.

Keywords: Ossetia cheeses, starter culture, yeast microflora, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*