

# ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДЕТЕКТИРУЕМОСТИ ДРОЖЖЕЙ В ЗАКВАСКАХ ПРЯМОГО ВНЕСЕНИЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КЕФИРНЫХ НАПИТКОВ\*

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

**Дарья Дмитриевна Коваль**, младший научный сотрудник  
**Екатерина Германовна Лазарева**, канд. техн. наук, научный сотрудник  
**Виктор Александрович Ратайчук**, аспирант  
**Алексей Владимирович Хан**, канд. техн. наук, научный сотрудник  
**Екатерина Денисовна Баженова**, младший научный сотрудник  
Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, г. Москва

Для производства кефирных напитков применяются закваски прямого внесения, однако наличие и жизнеспособность дрожжевого компонента, входящего в их состав и определяющего характерные органолептические свойства продукта, могут варьироваться. Дрожжи обеспечивают характерные процессы смешанного брожения и формирование соответствующих органолептических свойств, однако нормативные требования к их составу в заквасках прямого внесения детализированы недостаточно, а методы контроля ограничиваются культуральными подходами. В связи с этим оценка жизнеспособности и молекулярной выявляемости дрожжей представляется актуальной задачей. Целью работы являлась оценка наличия, жизнеспособности и молекулярной детектируемости дрожжевого компонента в коммерческих заквасках прямого внесения, применяемых при производстве кефирных напитков, с целью выявления возможных расхождений между заявленным и фактическим составом заквасок и оценки достаточности существующих методов контроля. Объектами исследования послужили пять образцов коммерчески доступных лиофилизированных заквасок. Количество дрожжей определяли методом посева на агар Сабуро с хлорамфениколом с последующим подсчетом колониеобразующих единиц. Для молекулярной детекции выделяли ДНК и проводили амплификацию ITS-региона рибосомальной ДНК с использованием праймеров ITS1F/ITS2R. Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в агарозном геле. Жизнеспособные дрожжи выявлены в трех из пяти образцов ( $2,8 \times 10^5$  –  $6,2 \times 10^8$  КОЕ/г), в двух образцах рост отсутствовал. При этом в одном из них методом ПЦР было обнаружено наличие дрожжевой ДНК, что может указывать на присутствие как нежизнеспособных, так и клеток с VBNC-статусом (viable but non-culturable), не выявляемых культуральным методом. Полученные результаты свидетельствуют о существенных различиях в численности дрожжей в коммерческих заквасках прямого внесения и подчеркивают ограниченность применения культуральных методов. Совместное использование микробиологических и молекулярных подходов позволяет более полно оценивать состояние заквасочной микробиоты.

**Ключевые слова:** закваски прямого внесения, кефирные напитки, дрожжи, ITS, ПЦР, жизнеспособность, контроль качества

**Для цитирования:** Оценка жизнеспособности и молекулярной детектируемости дрожжей в заквасках прямого внесения для производства кефирных напитков / Д. Д. Коваль, Е. Г. Лазарева, В. А. Ратайчук [и др.] // Молочная промышленность. 2026. № 5. С. 42–48. <https://doi.org/10.21603/1019-8946-2026-5-101>

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно аналитическим данным зарубежных маркетинговых агентств, на мировом потребительском рынке наблюдается устойчивый рост сегмента кисломолочных напитков, объединяемых в рыночных исследованиях термином «kefir market». По различным оценкам, объем глобального рынка кефира и кефирных продуктов в 2023–2024 гг. составлял 1,26–2,16 млрд долл. США, а к 2030–2033 гг. прогнозируется его увеличение до 1,69–3,68 млрд долл. США<sup>1,2,3</sup>.

В отличие от международной практики, в которой кефир и кефирные напитки, как правило, рассматриваются в рамках единой продуктовой категории, в Российской Федерации на нормативном уровне проводится разграничение между кефиром, произведенным с помощью закваски на кефирных грибах, и кефирными напитками, вырабатываемыми с использованием многокомпонентных заквасок прямого внесения, что обусловлено принципиальными различиями в микробном составе, технологии производства и формировании потребительских

\*Публикация подготовлена в рамках государственного задания FNSS-2025-0002.

<sup>1</sup>Grand View Research. Kefir Market Size, Share & Trends Analysis Report [Электронный ресурс]. URL: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/kefir-market> (дата обращения: 24.02.2026).

<sup>2</sup>MarkNtel Advisors. Kefir Market Growth Report [Электронный ресурс]. URL: <https://www.marknteladvisors.com/press-release/kefir-market-growth> (дата обращения: 24.02.2026).

<sup>3</sup>IMARC Group. Kefir Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth [Электронный ресурс]. URL: <https://www.imarcgroup.com/kefir-market> (дата обращения: 24.02.2026).

характеристик данных продуктов [1, 2]. Кефир традиционно рассматривается как продукт смешанного брожения, осуществляемого микробным консорциумом кефирных грибков, включающим молочно-кислые бактерии и дрожжи [3]. При этом в разделе основных понятий ТР ТС 033/2013 отсутствует самостоятельное определение «кефирного продукта». В то же время в статье 4 ТР ТС 033/2013, регламентирующей требования к наименованию продукции, предусмотрено, что кисломолочный продукт, произведенный по технологии кефира с использованием закваски, приготовленной на чистых культурах молочнокислых микроорганизмов и одного или нескольких видов дрожжей, входящих в состав микрофлоры кефирных грибков, должен обозначаться как «кефирный продукт». Количественные требования к содержанию дрожжей установлены только для готового кефира (не менее  $1 \times 10^4$  КОЕ/г на конец срока годности), тогда как состав и численность микроорганизмов в заквасках прямого внесения и в кефирных грибах нормативно не регламентируются. Помимо этого, регламент не устанавливает критериев подтверждения принадлежности выявляемых дрожжей к микрофлоре кефирных грибков, что затрудняет объективную оценку соответствия продукции установленным требованиям.

Отсутствие или снижение численности жизнеспособных клеток дрожжей приводит к нарушению процессов смешанного брожения, характерных для технологии производства кефира и кефирных напитков. В таких условиях в готовом продукте существенно снижается образование этанола, диоксида углерода и летучих ароматических соединений, формирующих специфический вкус, аромат и слабо выраженную газацию кефирных напитков. В результате продукция утрачивает характерные органолептические признаки кефира и кефирных напитков и по своим свойствам приближается к другим видам кисломолочных напитков [4].

Дрожжи играют ключевую роль в формировании вкусоароматического профиля и газообразования кефирной продукции, а их недостаток способен приводить к упрощению сенсорных характеристик [5–7]. Вместе с тем показано, что технологические операции, связанные с замораживанием и хранением заквасочных культур, могут приводить к существенному снижению жизнеспособности дрожжей и молочнокислых бактерий, причем степень этих изменений зависит от состава культуры и применяемых защитных сред [8].

Оценка дрожжевого компонента заквасок традиционно основывается на культуральных методах, позволяющих учитывать только жизнеспособные и культивируемые клетки. Однако такие методы не обеспечивают информации о таксономической принадлежности выявляемых дрожжей и их соответствии микрофлоре кефирных грибков. Молекулярно-генетические подходы, в свою очередь, позволяют детектировать дрожжевую ДНК независимо от культивируемости микроорганизмов и могут использоваться как дополнительный инструмент подтверждения присутствия дрожжевого компонента [9]. В связи с этим представляется целесообразным совместное применение культуральных и молекулярно-генетических методов для более полной и объективной характеристики заквасок прямого внесения, а именно – дифференциации отсутствия дрожжей от снижения их жизнеспособности [10]. В настоящий момент сведения о фактическом состоянии дрожжевого компонента в промышленных заквасках данного типа остаются крайне недостаточными.

**Целью работы** являлась оценка наличия, жизнеспособности и молекулярной детектируемости дрожжевого компонента в коммерческих заквасках прямого внесения, применяемых при производстве кефирных напитков, с целью выявления возможных расхождений между заявленным и фактическим составом заквасок и оценки достаточности существующих методов контроля.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено в лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ», г. Москва).

**Описание исследуемых образцов.** Объектами исследования являлись закваски прямого внесения, представлявшие собой сухой порошок, приобретенные у различных коммерческих производителей (табл. 1). Хранение заквасок осуществлялось при температуре  $4 \pm 2$  °С. В качестве положительного контроля использовались лиофилизированные кефирные грибки из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности.

**Подготовка проб.** Для проведения микробиологического и молекулярно-генетического анализа из каждой исследуемой закваски отбирали по три навески ( $n = 3$ ).

Таблица 1. Характеристика заквасок прямого внесения

| Номер образца | Место производства         | Заявленный состав                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1             | Россия, г. Санкт-Петербург | Лактоза, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                                                                                                                                                                                                                    |
| 2             | Италия                     | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , кефирные дрожжи                                                                                            |
| 3             | Россия, г. Королев         | Кефирные грибки, живые лиофилизированные штаммы лактобактерий: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophiles</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> subsp. <i>marxianus</i> , мальтодекстрин |
| 4             | Россия, г. Углич           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Acetobacter aceti</i>                                                                           |
| 5             | Россия, г. Краснодар       | Кефирные грибки, <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , лактоза                                                                                                                                                                                       |

Для микробиологического анализа навески массой 1 г взвешивали на аналитических весах Vibra HTR-220CE (Shinko Denshi Co., Ltd., Япония) и в асептических условиях переносили в 9,0 мл 0,9 % стерильного физиологического раствора («Солофарм», Россия). Полученные суспензии тщательно гомогенизировали до однородного состояния, получая разведение  $10^{-1}$ . Далее готовили серию последовательных десятикратных разведений до  $10^{-8}$ . Для посева использовали разведения от  $10^{-2}$  до  $10^{-8}$ .

Для молекулярно-генетического анализа отбирали навески заквасок массой 100 мг, которые переносили в стерильные микропробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл и использовали для последующей экстракции ДНК.

#### Определение количества дрожжей.

Количественную оценку дрожжей в заквасках прямого внесения проводили методом поверхностного посева на среду Сабуро с хлорамфениколом (Биоконтроль, Россия). Питательную среду готовили в соответствии с инструкцией производителя с добавлением сухого бактериологического агара (Биоконтроль, Россия) до конечной концентрации 1,5 % (масс/об). Стерилизацию среды осуществляли в автоклаве ГПа-10-ПЗ (Касимовский Приборный Завод, Россия) при температуре 121 °C и давлении 1 атм в течение 15 мин.

Посевы выполняли путем равномерного распределения 0,1 мл соответствующего разведения по поверхности агара. Чашки инкубировали в термостате ТС-1/80 СПУ (Смоленское СКТБ, Россия) при температуре  $25 \pm 1$  °C в течение 5 суток.

Определение количества дрожжей проводили в соответствии с ГОСТ 33566-2015 «Молоко и молочная продукция. Определение дрожжей и плесневых грибов». Предварительный учет колоний осуществляли на третьи сутки инкубации, окончательный – на пятые сутки. Подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили на чашках с числом колоний от 30 до 300. Результаты выражали в виде количества колониеобразующих единиц на грамм образца (КОЕ/г) в экспоненциальной записи с учетом коэффициента разведения.

**Выделение ДНК.** Экстракция ДНК из 100 мг навески образцов заквасок прямого внесения производилась с помощью набора «MetaGen» (Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

#### ПЦР-амплификация ITS-региона дрожжевой ДНК.

Амплификацию внутреннего транскрибируемого спейсерного участка рибосомальной ДНК грибов (ITS-региона) проводили методом ПЦР с использованием универсальных праймеров ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) и ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC), применяемых для анализа дрожжевого компонента кефирных консорциумов [9], при температуре отжига 50 °C. ПЦР-скрининг проводили в 25 мкл реакционной смеси, состоявшей из 5 мкл 5×Screen Mix (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл 10 мкМ праймера ITS1F, 1 мкл 10 мкМ праймера ITS2R, 2 мкл образца ДНК и 16 мкл деионизированной воды (ЗАО «Евроген», Россия). Амплификацию проводили на приборе MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием следующей программы: первичная денатурация при 94 °C в течение 10 мин; далее 35 циклов следующего вида: денатурация при 94 °C в течение 30 с; отжиг праймеров при

температуре 50 °С в течение 1 мин; элонгация цепей при 72 °С в течение 1 мин 30 с; финальная элонгация цепей при 72 °С в течение 10 мин. Теоретически ожидаемая длина получаемых ампликонов ITS-региона составляла примерно 410 п. о. в зависимости от видовой принадлежности дрожжей. Все ПЦР-реакции проводили в трех технических повторностях.

**Гель-электрофорез.** Анализ результатов ПЦР проводили путем разделения ампликонов в 2 % геле агарозы I (VWR International LLC, США), окрашенном раствором бромистого этидия, при напряжении электрического поля 7 В/см геля. В качестве маркера длин фрагментов ДНК был использован «100+ bp DNA Ladder» (ЗАО «Евроген», Россия). Результаты гель-электрофореза визуализировали с помощью системы гель-документирования Vilber E-Box-CX5.TS (Vilber, Франция), на трансиллюминаторе Vilber SuperBright (Vilber, Франция) с длиной волны 312 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Культуральная оценка численности дрожжей.** На рисунке 1 приведены репрезентативные результаты посева заквасок, отражающие различия наличия дрожжевого компонента в исследуемых образцах.

По результатам посевов на селективной среде для дрожжей установлены существенные различия в численности дрожжей между исследованными коммерческими заквасками прямого внесения. Количественная оценка жизнеспособных дрожжей ( $n = 3$ ) представлена в таблице 2.

**Таблица 2. Значения количества дрожжей в коммерческих заквасках прямого внесения**

| Номер образца | Количество дрожжей, КОЕ/г | Коэффициент вариации (CV), % |
|---------------|---------------------------|------------------------------|
| 1             | –                         | –                            |
| 2             | $1,2 \times 10^6$         | 7,7                          |
| 3             | $2,8 \times 10^5$         | 1,9                          |
| 4             | $6,2 \times 10^8$         | 0,5                          |
| 5             | –                         | –                            |

Согласно полученным данным, рост дрожжей на среде Сабуро наблюдался в образцах № 2–4 (табл. 2). Наибольшая численность дрожжей зафиксирована в образце № 4 ( $6,2 \times 10^8$  КОЕ/г). В образцах № 2 и № 3 наблюдались сопоставимые значения численности дрожжевых культур ( $1,2 \times 10^6$  и  $2,8 \times 10^5$  КОЕ/г соответственно). Для образцов № 2–4 коэффициент вариации (CV) не превышал 10 %. В образцах № 1 и № 5 рост дрожжей на среде Сабуро не наблюдался даже после 5 суток инкубации.

**Результаты ПЦР-детекции дрожжевой ДНК.** ПЦР-амплификация ITS-региона была выполнена для всех исследуемых образцов в трех технических повторностях. Результаты анализа продуктов амплификации представлены на электрофореграмме (рис. 2).

В положительном контроле (кефирные грибки) обнаружены два ПЦР-продукта различной длины, соответствующих ожидаемому диапазону размеров ITS-региона дрожжей (около 300–400 п. о.) [9]. В заквасках № 2–5 также выявляются два ампли-

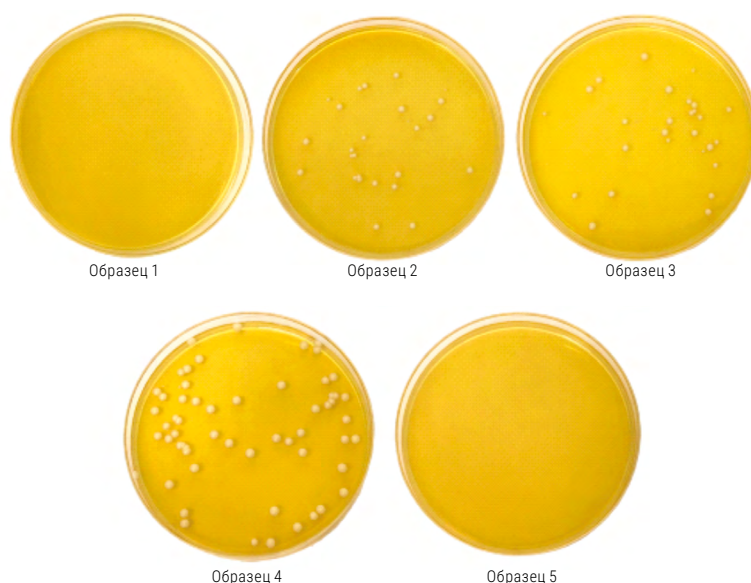
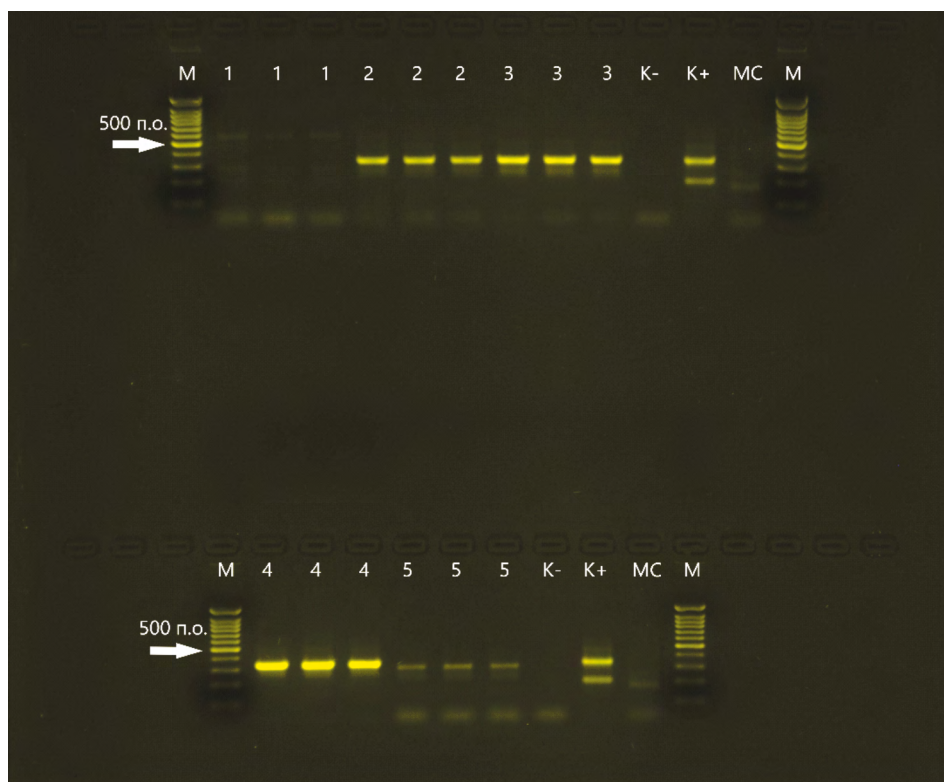


**Рисунок 1. Типовые результаты посева заквасок прямого внесения для приготовления кефирных напитков на селективной среде**



Примечание: М – маркер M100; 1–5 – исследуемые образцы; К<sup>-</sup> – вода; К<sup>+</sup> – кефирные грибки; МС – сырое молоко (контроль отсутствия амплификации геномной ДНК *Bos taurus*).

**Рисунок 2. Электрофореграмма ITS-ПЦР исследуемых образцов.**

кона, однако их визуализация отличается: в образцах определяется одна более интенсивная полоса и дополнительный менее выраженный сигнал меньшей интенсивности. Выявление данных ампликонов свидетельствует о наличии дрожжевой ДНК в указанных образцах. В образце № 1 амплификация фрагментов ожидаемой длины не выявлена, что соответствует отсутствию роста дрожжевой культуры на питательной среде. В образце № 5, несмотря на отсутствие жизнеспособных дрожжей по результатам посева, на электрофореграмме визуализируется слабая, но воспроизводимая полоса ампликона ожидаемой длины, что указывает на присутствие дрожжевой ДНК в исследуемом материале. В ряде дорожек (образцы № 1, № 2, № 3, № 5, положительный и отрицательный контроль, а также сырое молоко) визуализируются низкомолекулярные сигналы (менее 100 п. о.). С учетом их меньшей длины по сравнению с ожидаемым размером ITS-ампликонов дрожжей наиболее вероятно, что данные сигналы обусловлены образованием неспецифических продуктов амплификации, включая артефакты ПЦР и димеры праймеров.

Результаты проведенного исследования показали существенные различия в дрожжевом составе коммерческих заквасок прямого внесения, предназна-

ченных для выработки кефирных напитков. Рост дрожжей зафиксирован в трех образцах (№ 2–4), тогда как в образцах № 1 и № 5 он не был выявлен. При этом в образцах № 1 и № 5, согласно заявленному составу, должно присутствовать дрожжевое сообщество: в образце № 1 заявлено присутствие *Saccharomyces cerevisiae*, а в образце № 5 – дрожжей, входящих в состав кефирных грибов (табл. 1). Отсутствие жизнеспособных дрожжей в образце № 1 в сочетании с отсутствием амплификации целевых фрагментов ДНК может указывать на то, что дрожжевой компонент фактически отсутствовал в составе закваски, и, вероятно, отражает несоответствие состава закваски характеристикам, заявленным производителем. Дрожжевой компонент образца № 4, напротив, соответствует требованиям ТР ТС 033/2013, однако не отражен в заявленном производителем составе, поскольку наличие кефирных дрожжей в нем не указано.

В образце № 5 при отсутствии роста на селективной среде были обнаружены ПЦР-продукты ITS-региона ожидаемой длины, однако интенсивность соответствующих полос была значительно ниже по сравнению с образцами № 2–4 и положительным контролем (К<sup>+</sup>). Это может указывать на при-

сутствие дрожжевых клеток в нежизнеспособном или инактивированном состоянии. Такое состояние может быть связано с нарушением температурного режима хранения или транспортировки, а также с нарушением технологических параметров лиофилизации. Можно было бы предположить, что используемая среда Сабуро не подходит для культивирования дрожжевых микроорганизмов, входящих в состав закваски № 5, однако выявление ампликона ITS-региона ожидаемой длины свидетельствует о присутствии в образце дрожжевой ДНК. Это делает более вероятным предположение о снижении жизнеспособности клеток, а не о непригодности питательной среды.

В положительном контрольном образце (кефирные грибки) выявлены два ампликона ITS-региона различной длины, что, вероятнее всего, указывает на присутствие нескольких генетически различающихся дрожжевых форм, например, представителей разных видов или родов, что согласуется с данными о многокомпонентном дрожжевом составе кефирных грибков [11–15]. В дорожке, соответствующей контролю сырого молока, помимо низкомолекулярного сигнала, вероятно связанного с образованием неспецифических продуктов амплификации, визуализируется полоса в диапазоне размеров, соответствующем ожидаемой длине ITS-ампликонов дрожжей. Наличие данного сигнала может быть обусловлено присутствием в образце следовых количеств дрожжевой ДНК, потенциально происходящей из микробиоты сырого молока. Специфичность используемых праймеров ITS1F/ITS2R дополнительно оценивалась *in silico* с использованием платформы UCSC Genome Browser. Проведенный анализ не выявил потенциальной амплификации фрагментов геномной ДНК животных, включая *Bos taurus*, что свидетельствует о специфичности праймеров в отношении грибной ДНК. В совокупности это позволяет рассматривать выявленные ампликоны как соответствующие ITS-региону дрожжевой ДНК.

В настоящее время отсутствуют унифицированные валидированные тест-системы, ориентированные на детекцию дрожжевого компонента, характерного для кефирной микробиоты. Это затрудняет объективную оценку подлинности и качества как кефира, так и кефирных напитков, производимых с использованием заквасок прямого внесения. В частности, для подтверждения соответствия продукции требованиям нормативной документации необходимо установление факта использования

кефирных грибков при производстве кефира или присутствия дрожжевого компонента, характерного для кефирной микробиоты, в составе заквасок прямого внесения. При этом традиционные культуральные методы позволяют выявлять только жизнеспособные и культивируемые микроорганизмы и не обеспечивают возможности идентификации специфического для кефира дрожжевого компонента, что ограничивает их применение для решения данной задачи. В этой связи разработка подходов, направленных на выявление специфических для кефирной микробиоты дрожжевых микроорганизмов, представляется перспективным направлением совершенствования методов контроля. Одним из возможных решений может быть создание молекулярно-генетических тест-систем, ориентированных на детекцию дрожжевых маркеров, ассоциированных с кефирной микробиотой.

## ВЫВОДЫ

В результате работы с использованием культуральных и молекулярно-генетических методов проведена комплексная оценка дрожжевого компонента пяти коммерческих заквасок прямого внесения для производства кефирных напитков. Установлено, что три из пяти исследованных образцов содержали жизнеспособные дрожжи в концентрациях, характерных для кефирных заквасок. При этом в двух образцах жизнеспособные клетки дрожжей методом посева на плотные питательные среды обнаружены не были. Тем не менее проведенный *in vitro* молекулярный анализ на основе технологии ПЦР выявил наличие дрожжевой ДНК в одном из исследованных образцов с отсутствовавшим ростом колоний, что свидетельствует о присутствии в закваске нежизнеспособных, поврежденных или VBNC (*viable but non-culturable*) дрожжевых клеток, не детектируемых культуральным методом.

Полученные результаты демонстрируют высокую вариабельность дрожжевого состава заквасок, представленных на рынке. Выявленное несоответствие между результатами посевов и ПЦР-анализа подчеркивает ограниченность рутинных микробиологических методов и обосновывает необходимость внедрения в практику контроля качества молекулярно-генетических методов для более полной оценки состояния заквасочной микробиоты. При этом действующая нормативно-правовая база не содержит детализированных требований к дрожжевому составу заквасок прямого

внесения и регламентированных методов его контроля, что затрудняет объективную оценку их качества и соответствия заявленным характеристикам.

Перспективы дальнейших исследований связаны с детальной идентификацией дрожжевого ком-

понента с использованием молекулярно-генетических методов, а также с изучением влияния выявленных различий в составе заквасок прямого внесения на формирование органолептических и физико-химических характеристик кефирных напитков в процессе ферментации. ■

Поступила в редакцию: 13.04.2026

Принята в печать: 15.09.2026

## YEAST VIABILITY AND MOLECULAR DETECTABILITY IN DIRECT-VAT-SET STARTER CULTURES USED FOR KEFIR PRODUCTION

Daria D. Koval, Ekaterina G. Lazareva, Victor A. Rataychuk, Alexey V. Khan, Ekaterina D. Bazhenova

All-Russian Dairy Research Institute, Moscow

### ORIGINAL ARTICLE

Kefir beverages require direct-vat-set starter cultures, and their sensory properties depend directly on the yeast. Yeasts provide mixed fermentation and develop the corresponding sensory characteristics. However, regulatory requirements for direct-vat-set starters remain insufficiently detailed, and control methods are mostly limited to culture-based approaches. Therefore, assessing yeast viability and molecular detectability is a relevant research task. This study compared five commercial lyophilized starter cultures. Yeast counts were determined by plating on Sabouraud agar supplemented with chloramphenicol, followed by counting the number of colony-forming units. Molecular detection involved a DNA analysis with the ribosomal DNA ITS region amplified using ITS1F/ITS2R primers. The amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Viable yeasts appeared in three of the five samples ( $2.8 \times 10^5$  –  $6.2 \times 10^8$  CFU/g). The remaining two samples showed no growth, yet one of them was found to contain yeast DNA detected by PCR. Probably, these non-viable cells or cells in a VBNC (viable but non-culturable) state could not be detected by culture-based methods. The results confirmed the variability in the yeast component of commercial direct-vat-set starter cultures but demonstrated the insufficiency of culture-based methods. The combined use of microbiological and molecular approaches provided a more comprehensive assessment of the starter microbiota.

**Keywords:** direct-vat-set starter cultures, kefir, yeasts, ITS, PCR, viability, quality control

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бегунова, А. В. Характеристика и функциональные свойства лактобацилл, выделенных из кефирных грибков / А. В. Бегунова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57, № 4. С. 362–373. <https://doi.org/10.31857/S0555109921040036>; <https://elibrary.ru/cnprrf>
2. Харитонов, В. Д. Какой продукт следует называть кефиром / В. Д. Харитонов [и др.] // Молочная промышленность. 2010. № 4. С. 57–58. <https://elibrary.ru/mhunph>
3. González-Orozco, B. D. Invited review: Milk kefir microbiota—Direct and indirect antimicrobial effects / B. D. González-Orozco [et al.] // Journal of Dairy Science. 2022. Vol. 105(5). P. 3703–3715. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21382>
4. Семенихина, В. Ф. Биотехнология кисломолочных продуктов и препаратов с пробиотическими свойствами / В. Ф. Семенихина [и др.] // Молочная промышленность. 2016. № 7. С. 57–58. <https://elibrary.ru/wayuzn>
5. Yerlikaya, O. Impact of yeast types on quality characteristics and storage stability of industrial kefir / O. Yerlikaya, A. Akpinar, D. Saygili // Food Science & Nutrition. 2025. Vol. 13(5). Art. no. e70238. <https://doi.org/10.1002/fsn.3.70238>
6. Lopitz-Otsoa, F. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities / F. Lopitz-Otsoa [et al.] // Revista Iberoamericana de Micología. 2006. Vol. 23(2). P. 67–74. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(06\)70016-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(06)70016-X)
7. Abajo Justel, M. Production of kefir and kefir-like beverages: Fundamental aspects, advances, and future challenges / M. Abajo Justel, E. Balvis Outeiriño, N. Pérez Guerra // Processes. 2026. Vol. 14(1). Art. no. 73. <https://doi.org/10.3390/pr14010073>
8. O'Brien, K. V. Short communication: The effects of frozen storage on the survival of probiotic microorganisms found in traditionally and commercially manufactured kefir / K. V. O'Brien [et al.] // Journal of Dairy Science. 2016. Vol. 99(9). P. 7043–7048. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10284>
9. Marsh, A. J. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources / A. J. Marsh [et al.] // PLoS ONE. 2013. Vol. 8(7). Art. no. e69371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069371>
10. McGovern, C. J. Evaluation of kefir grain microbiota, grain viability, and bioactivity from fermenting dairy processing by-products / C. J. McGovern, B. D. González-Orozco, R. Jiménez-Flores // Journal of Dairy Science. 2024. Vol. 107(7). P. 4259–4276. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24364>
11. Garofalo, C. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions / C. Garofalo [et al.] // Food Microbiology. 2015. Vol. 49. P. 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.017>
12. de Oliveira Leite, A. M. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage / A. M. de Oliveira Leite [et al.] // Brazilian Journal of Microbiology. 2013. Vol. 44(2). P. 341–349. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200001>
13. Bourrie, B. C. T. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir / B. C. T. Bourrie, B. P. Willing, P. D. Cotter // Frontiers in Microbiology. 2016. Vol. 7. Art. no. 647. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00647>
14. Motoshima, H. Identification of dominant species common to kefir grains from 7 origins for kefir grain reconstruction / H. Motoshima, I. Fujioka, K. Uchida // Journal of Dairy Science. 2025. Vol. 108(8). P. 8222–8236. <https://doi.org/10.3168/jds.2025-26399>
15. Alraddadi, F. A. J. Evaluation of the microbial communities in kefir grains and kefir over time / F. A. J. Alraddadi, T. Ross, S. M. Powell // International Dairy Journal. 2023. Vol. 136. Art. no. 105490. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105490>