

Molekularna identifikacija kvasaca iz svježeg mlijeka i tradicionalno proizvedenog svježeg sira



M. Zadravec, V. Jaki Tkalec, S. Furmeg, M. Kiš, M. Mitak i T. Mikuš*

Sažetak

Kvasci su česti zagađivači mliječnih proizvoda, međutim, koriste se i kao starter kulture za poboljšavanje svojstava finalnog proizvoda. Njihova prisutnost u povećanom broju može prouzročiti nepoželjne promjene mliječnih proizvoda, kao što su neugodan miris, okus i izgled. Klasična identifikacija kvasaca na temelju morfoloških i biokemijskih svojstava spora je i nepouzdana. Cilj rada bio je identificirati kvasce iz 30 uzoraka mlijeka i svježeg sira te ustvrditi pripadaju li izolirani kvasci u poželjne ili nepoželjne vrste, odnosno predstavljaju li potencijalni rizik po zdravlje ljudi. Izolirani kvasci identificirani su sekvenciranjem D1/D2 regije gena 28 S rRNK. Dobivenim sekvencama ustvrđeno je da izolirani kvasci pripadaju vrstama: *Kluyveromyces marxianus*, *Candida tropicalis*,

Trichosporon coremiiforme, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon ovoides*, *Pichia kudriavzevii*, *Issatchenkia orientalis*, koje se smatraju kvascima zagađenja te *Debaryomyces hansenii* vrsti koja se može koristiti i kao starter kultura. S obzirom da kvasci nisu termorezistentni mikroorganizmi, trebali bi biti uklonjeni tijekom pasterizacije, no u tradicionalnom načinu proizvodnje sira mlijeko se termički ne obrađuje, stoga je povećan rizik od pojavnosti kvasaca u finalnom proizvodu. Izolirane se vrste vrlo često nalaze i u okolišu i/ili na ljudima, odnosno životinjama. Stoga se nameće zaključak kako se glavnina kontaminacije kvascima događa kao posljedica neadekvatne higijenske prakse.

Ključne riječi: svježe mlijeko, svježi sir, kvasci, molekularna identifikacija

Uvod

Kvasci i gljivice su sveprisutni u prirodi te ih se vrlo često može pronaći u različitim namirnicama kao što su

žitarice, povrće, voće, meso i mlijeko. S obzirom na raznolikost njihovih izvorišta, kvarenje hrane gljivicama i kvascima

Dr. sc. Manuela ZADRAVEC, dr. med. vet., znanstvena suradnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Vesna JAKI TKALEC, dr. med. vet., znanstvena suradnica, Sanja FURMEG, dipl. sanit. ing., stručna suradnica, Maja KIŠ, mag. ing. bioproc., mag. ing. agr., Veterinarski zavod Križevci, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Mario MITAK, dr. med. vet., znanstveni savjetnik u trajnom zvanju, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Tomislav MIKUŠ*, dr. med. vet., viši asistent, (dopisni autor, e-mail: tmikus@vef.hr), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

dovodi do ozbiljnih ekonomskih gubitaka za proizvođače hrane te se procjenjuje kako danas između 5 % i 10 % svjetske proizvodnje hrane propadne zbog kontaminacije gljivicama. Povijesno se dugo vremena, osim što su mijenjali svojstva hrane, nisu smatrali osobito opasnim po ljudsko zdravlje. Tek su se posljednjih nekoliko desetljeća mikotoksini koje produciraju određene vrste gljivica počeli sustavno pratiti i smatrati prijetnjom po zdravlje životinja i ljudi (Filtenborg, i sur., 1996., Pitt i Hocking, 2009., Garnier i sur., 2017.).

Mlijeko i mliječni proizvodi predstavljaju jednu od temeljnih namirnica za sve dobne skupine ljudi. Biokemijski je mlijeko sastavljeno od bjelančevina, masti i šećera što ga čini iznimno hranjivim, a dodatne tvari u vidu vitamina i minerala koje također pronalazimo u njemu, imaju znatan utjecaj na rast i razvoj ljudskih kostiju i zuba (Prentice, 2014.). Osim navedenog, redovita konzumacija mlijeka i mliječnih proizvoda pozitivno djeluje na razvoj mišićne mase, prevenciju kardiovaskularnih bolesti i raka debelog crijeva (Kubicová i sur., 2019.). Iako su zbog svog sastava mlijeko i mliječni proizvodi preporučeni dio svakog idealnog obroka, iz istog razloga spadaju u lako kvarljive namirnice pa stoga čak i danas u Europskoj uniji predstavljaju jedan od glavnih izvora bolesti prenošenih hranom (EFSA i ECDC, 2018.). Važno je ipak istaknuti kako su fermentirani mliječni proizvodi općenito manje osjetljivi na gljivično kvašenje, od primjerice voća ili povrća. Razlozi tome su svakako proizvodnja i skladištenje u hladnom lancu, ali i činjenica kako se u pravilu proizvode od termički obrađenog mlijeka. Nadalje, postupkom fermentacije dolazi do razvoja konkurentskih mikroorganizama i posljedičnog snižavanja pH što nepovoljno utječe na rast i razvoj kvasaca i gljivica.

Unatoč navedenom, znatan broj vrsta gljivica i kvasaca može preživjeti i rasti u mliječnim proizvodima. Primarni načini

zagađenja nepoželjnim sojevima kvasaca su loša higijena mužnje te neadekvatni načini u procesu proizvodnje i/ili pohrane fermentiranih proizvoda bilo kada u proizvodnom lancu - od farme do završnog proizvoda. Tada takvi, nepoželjni kvasci u povećanom broju mogu prouzročiti promjene u kemijskom sastavu proizvoda koje se reflektiraju i na njegova senzorna svojstva. Najčešće promjene koje možemo primijetiti kod zagađenja nepoželjnim kvascima su promjene u boji, okusu, mirisu i konzistenciji mliječnih proizvoda, a i u fizičkim promjenama na ambalaži u vidu napuhavanja ambalažnog pakiranja (Jakobsen i Narvhus, 1996., Lopadic i sur., 2006.). Ovaj zapanjujući kapacitet prilagodbe kvasaca u izazovnim uvjetima rasta može se objasniti njihovom sposobnošću da koriste brojne supstrate, uključujući ugljikohidrate, organske kiseline, proteine i lipide koji su prisutni u mlijeku i proizvodima od mlijeka. Štoviše, gljivice i kvasci koje pronalazimo kao kontaminante u mliječnim proizvodima često su su acidotolerantne, kserotolerantne i/ili psihrotolerantne pa čak do određene razine mogu tolerirati i kemijske konzervanse koji se ponekad dodaju kako bi produljili rok trajanja proizvoda. (Huis in't Veld, 1996., Desmaures, 2014., Prado i sur., 2015.) Zbog istih se svojstava kvasci često upotrebljavaju i kao starter kulture u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda. Kao sastavnice starter kultura, a u kombinaciji s bakterijama, utječu na bio-sintezu poželjnih aromatičnih komponenti i pridonose senzornim kvalitetama raznih mliječnih napitaka i sireva (Lopadic i sur., 2006.).

Kako bismo bili u mogućnosti kontrolirati izvore kontaminacije mliječnih proizvoda kvascima, potrebno ih je identificirati brzo i pouzdano. Nažalost, klasična identifikacija kvasaca na temelju morfoloških i biokemijskih svojstava pokazala se sporom, teškom i nepouzdanom pa je

stoga potrebno raditi na razvoju novih, modernih i pouzdanih metoda za izolaciju i identifikaciju kvasaca iz fermentiranih mliječnih proizvoda. Cilj ovog rada bio je sekvenciranjem regije 28S rRNK gena identificirati kvasce u nasumično odabranih 30 uzoraka mlijeka i svježeg sira te detektirati potencijalne izvore onečišćenja.

Materijali i metode

Tijekom 2018. godine uzorkovano je 15 uzoraka svježeg kravljeg mlijeka i 15 uzoraka svježeg kravljeg sira prikupljenih s područja Koprivničko-križevačke županije te analizirano na prisustvo kvasaca koristeći ISO/FDIS 21527-1 metodu. Uzorci svježeg sira homogenizirani su (10 g sira + 90 mL puferirane peptonske vode (PPV) te slijedno deseterostruko razrijeđeni s PPV-om. Uzorci mlijeka su homogenizirani i deseterostruko razrijeđeni PPV-om. Tako pripremljeni uzorci nacijski su u volumenu od 0,1 mL (u duplikatu) na ploče Dichloran Rose Bengal Chloranphenicol Agara (DRBC) te inkubirani na 25 ± 1 °C kroz 5 dana. Porast kvasaca očitavao se treći i peti dan. Nakon inicijalnog, primarnog porasta pojedinačnih kolonija kvasaca, morfološki različite kolonije precijepljene su na Malt Extract Agar (MEA) kao bi se dobile njihove čiste kulture. Nakon inkubacije na MEA od 3 dana na 25 ± 1 °C iz svake je kultura kvasaca izolirana DNK (komercijalnim kitom NucleoSpinMicrobial DNK, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača. Lančanom reakcijom polimerazom (PCR) umnožena je D1/D2 regija 28S rRNK gena početnicama N1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') i N2 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3').

PCR mješavina volumena 25 μ L sadržavala je: 12,5 μ L 2x PCR buffer (HotStarTaq Plus MasterMix Kit, Qiagen, Germany), 2,5 μ L 10 x Coral Load, 0,4 μ M of svake početnice, vode za molekularne

reakcije i 1 μ L izolirane DNK. PCR reakcija se odvijala prema temperaturnom protokolu - početna denaturacija na 95 °C kroz 5 min, nakon koje je slijedilo 40 ciklusa: 94 °C kroz 30 s, 56 °C kroz 30 s, 72 °C kroz 60 s te završno produljenje na 72 °C kroz 10 min. Dobiveni produkti provjereni su elektroforezom na 1,5 % agarozu gelu i vizualizirani UV transiluminatorom. PCR produkti adekvatne veličine prije slanja na sekvenciranje u MacroGen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) pročišćeni su ExoSAP-IT PCR clean up reagensom (Affymetrix, California, SAD). Dobivene sekvence uređene su LasergeneSeqManPro DNASTAR 13 (Madison, Wisconsin, SAD) računalnim programom, a dobivene sekvence uspoređene su sa sekvencama u GeneBank koristeći BLAST algoritme (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Rezultati

U prezentiranom istraživanju iz uzoraka mlijeka i svježeg kravljeg sira izolirano je i identificirano sekvenciranjem

Tabela 1. Izolirane i identificirane vrste kvasaca iz svježeg mlijeka i sira

Vrsta kvasca	Svježe mlijeko	Svježi sir
<i>Candida alimentaria</i>		+
<i>Candida curvata</i>		+
<i>Candida lusitanae</i>		+
<i>Candida tropicalis</i>	+	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	+
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	+
<i>Trichosporon aquatile</i>		+
<i>Trichosporon asahii</i>	+	
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	+	
<i>Trichosporon ovoides</i>	+	

D1/D2 regije gena 28 S rRNK 12 vrsta kvasaca. Po četiri vrste kvasaca izolirane su samo iz svježeg sira (većina *Candida* spp.), odnosno svježeg mlijeka (većina *Trichosporon* spp), dok su preostale četiri vrste kvasaca (*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa* i *Pichia kudriavzevii*) izolirane iz obje vrste uzoraka (Tabela 1). Sve izolirane i identificirane vrste kvasaca karakteristične su za proizvode i većina ih se smatra zagađivačima, dok su *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii*, *Debaryomyces hansenii* vrste koje se mogu koristiti i kao sastavnice nekih starter kultura.

Rasprava

Mlijeko i mliječni proizvodi mogu se kontaminirati kvascima tijekom cijelog procesa proizvodnje, stoga ne čudi raznolikost vrsta koje su izolirane u ovom istraživanju. Dobiveni rezultati u skladu su s dosadašnjim istraživanjima koja pokazuju da su kvasci vrste *Candida* jedni od najčešćih vrsta kvasaca koji kontaminiraju svježe mlijeko i nezrele sireve (Lavoie i sur., 2012., Buehler i sur., 2017.). Nadalje, važno je uzeti u obzir

činjenicu da su kvasci vrste *Candida* široko rasprostranjeni u okolišu, zraku i čest su uzročnik mastitisa (dos Santos i Marin, 2005., Torkar i Vengušt, 2008.). Tako Garnier i sur. (2017.) navode čak 24 različite vrste Kandidate kao zagađivače mlijeka i mliječnih proizvoda među kojima je i *Candida tropicalis*, izolirana iz svježeg mlijeka. Ostale vrste *Candida* spp kvasaca izolirane su iz uzoraka svježeg, tradicionalno proizvedenog sira. Iako se zbog svoje termolabilnosti, većina kvasaca iz vrste *Candida* eliminira prilikom pasterizacije pa predstavlja minimalan rizik po ljudsko zdravlje, tradicionalan način proizvodnje svježeg sira podrazumijeva fermentaciju mlijeka bez prethodne pasterizacije što pojašnjava njihovu pojavnost.

Nadalje, izolati kvasaca vrste *Trichosporon* identificirani su u uzorcima svježeg mlijeka, no za razliku od Kandidate, *Trichosporon* vrste vežu se uz razvoj patoloških stanja, kako životinja tako i ljudi. U goveda infekcije s *Thichosporon* vrstama povezane su uz mastitise, a u ljudi najčešće s gastrointestinalnim, respiratornim i kožnim bolestima (González i sur. 2001., Colombo i sur., 2011.). Stoga izolacija i identifikacija ovih vrsta kvasaca iz uzoraka svježeg mlijeka ne iznenađuje, ali ukazuje na nisku razinu higijene mužnje, bilo da se radi o neadekvatnoj dezinfekciji vimena ili lošim higijenskim navikama osoblja. Prisutnost kvasaca vrste *Thichosporon* može se ukloniti jednostavnim postupcima poput pasterizacije i fermentacije mlijeka koja dovodi do nižeg pH (Colombo i sur., 2011.) što je potvrđeno i u ovom istraživanju, obzirom da je u samo jednom uzorku sira pronađena vrsta *Trichosporon aquatile*. U prilog našim rezultatima govore i prethodno provedena istraživanja u kojima je potvrđeno i prisustvo *Trihosporon* vrsta u svježem mlijeku, a samo sporadično u svježem siru (Carbo i sur., 2001., Lopadic i sur., 2006., Lavoie i sur., 2012., Garnier i sur., 2017.).



Slika 1. Čiste kulture kvasaca izoliranih iz prikupljenih uzoraka

Preostale četiri vrste kvasaca otkrivene u ovom istraživanju - *Debaryomyces hansenii*, *Cluyveromyces marxianus*, *Pichia kudrivzevii* i *Rhodotorula mucilaginosa* izolirane su i iz svježeg mlijeka i svježeg sira. Alvarez-Martin i sur. (2007.) i Garnier i sur. (2017.) navode da je rod *Rhodotorula* najčešće izolirana kvasnica s nezrelih sireva i mlijeka. Prerastanje ovog roda po površini sireva karakterističan je po svojoj ružičastoj boji (Daly i sur., 2012.), a vrsta izolirana u ovom istraživanju - *R. mucilaginosa* poznati je uzročnik infekcija i imunodeficientnih životinja i ljudi (Wirth i Goldani, 2012.) te može predstavljati javnozdravstveni problem. *Pichia* vrste svojstvene su svježem mlijeku i svježem siru (Lavoie i sur., 2012., Buehler i sur., 2017.), s time da *P. kudrivzevii*, koja je izolirana i u ovom istraživanju, preživljava procese fermentacije u tradicionalnoj proizvodnji sira i može utjecati na sam proces zrenja (Lavoie i sur., 2012.). *D. hansenii* je najčešće izolirana vrsta kvasaca iz mlijeka i svježeg sira (Vasdinyei i Deák, 2003., Lavoie i sur., 2012., Buehler i sur., 2017.), što je u skladu s njezinim sposobnostima rasta u ekstremnim uvjetima kao što su: visoke koncentracije soli, niske temperature i nizak pH te mogućnost metaboliziranja mliječne i limunske kiseline. Osim toga, *D. hansenii* izolirana je i s pribora za obradu mlijeka i sira te ruku radnika u mljekarama (Buehler i sur., 2017.). Uz sve navedeno, *D. hansenii* zbog mogućnosti proteolitičke i lipolitičke razgradnje te mogućeg povoljnog utjecaja na okus sira ima potencijal kao starter kultura (Lopadic i sur., 2006., Gori i sur., 2012.). Kao i *D. hansenii*, *K. marxianus* vrsta je kvasaca koja se učestalo izolira iz svježeg mlijeka i sira (Panelli i sur., 2013.). Objе navedene vrste otporne su na procese pasterizacije, stoga je teško ustvrditi točno u kojem trenutku tijekom proizvodnje dolazi do kontaminacije (Garnier i sur., 2017.).

Zaključak

U pretraženim uzorcima mlijeka i svježeg sira izolirano je i identificirano 12 vrsta kvasaca od kojih su većina u literaturi prepoznata kao zagađivači. Pretpostavljeni izvori kontaminacije kvascima koji su identificirani ponajprije su loša higijenska praksa s obzirom da većina dokazanih vrsta uobičajeno raste u okolišu i/ili na ljudima, odnosno životinjama. Također, od identificiranih 12 vrsta kvasaca neke predstavljaju umjeren rizik po zdravlje ljudi i životinja (*Trichisporon* spp. i *R. mucilaginosa*), neke nizak (*Candida* spp.), dok ostatak identificiranih vrsta kvasaca ne predstavljaju javnozdravstveni rizik.

Literatura

1. ALVAREZ-MARTIN, P., A. B. FLÓREZ, T. M. LÓPEZ-DÍAZ and B. MAYO (2007): Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. Int. Dairy J. 17, 961-967.
2. BUEHLER, A. J., R. L. EVANOWSK, N. H. MARTIN, K. J. BOOR and M. WIEDMANN (2017): Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. J. Dairy Sci. 100, 8814-8825.
3. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2018): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA J. 16, pp. 262. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
4. CARBO, M. R., R. LANCIOTTI, M. ALBENZIO and M. SINIGAGLIA (2001): Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. Int. J. Food Microbiol. 69, 147-152.
5. COLOMBO, A. L., A. C. B. PADOVAN and G. M. CHAVES (2011): Current knowledge of *Trichosporon* spp and trichosporonosis. Clin. Microbiol. Rev. 24, 682-700.
6. DALY, D. F. M., P. L. H. MCSWEENEY and J. J. SHEEHAN (2012): Pink discolouration defect in commercial cheese: a review. Dairy Sci. Technol. 92, 439-453.
7. DESMASURES, N. (2014): Food-mold-ripened varieties. In: Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd ed.; Batt, C. A., Ed.; Elsevier Inc.: Atlanta, GA, USA, pp. 409-415.
8. DOS SANTOS, R. C. and J. M. MARIN (2005): Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. Mycopathologia 159, 251-253.
9. FILTENBORG, O., J. C. FRISVAD and U. THRANE (1996): Moulds in food spoilage. Int. J. Food Microbiol. 33, 85-102.

10. GARNIER, L., F. VALENCE and J. MOUNIER (2017): Diversity and control of spoilage an dairy products: An update. *Microorganisms* 5, 42. doi: 10.3390/microorganisms5030042
11. GONZÁLEZ, R. N., D. J. WILSON and S. A. SICKLES (2001): Outbreaks of clinical mastitis caused by *Trichosporon beigelii* in dairy herds. *Sci. Rep.* 218, 238-242.
12. GORI, K., L. M. SØRENSEN, M. A. PETERSEN, L. JESPERSEN and N. ARNEBORG (2012): *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. *Microbiology Open* 1, 161-168.
13. HUIS IN'T VELD, J. H. J. (1996): Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 1-18.
14. JAKOBSEN, M. and J. NARVHUS (1996): Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy J.* 60, 755-768.
15. LOPADIC, K., S. ZELGER, L. K. BÁNSZKY, F. ELISKASES-LECHNER and H. PRILLINEGR (2006): Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.* 23, 341-350.
16. LAVOÏE, K., M. TOUCHETTE, D. ST-GELAIS and S. LABRIE (2012): Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci. Technol.* 92, 455-468.
17. KUBICOVÁ, L., K. PREDANOCYOVÁ and Z. KÁDEKOVÁ (2019): The importance of milk and dairy products consumption as a part of rational nutrition. *Potr. S. J. F. Sci.*, 13, 234-243. <https://doi.org/10.5219/1050>
18. PANELLI, S., E. BRAMBATI, C. BONACINA and M. FELIGINI (2013): Diversity of fungal flora in raw milk from the Italian Alps in relation to pasture altitude. *SpringerPlus* 2, 405. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-405>
19. PITT, J. I. and A. D. HOCKING (2009): *Fungi and Food Spoilage*, 3rd ed.; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, pp. 1-2.
20. PRADO, M. R., L. M. BLANDÓN, L. P. S. VANDENBERGHE, C. RODRIGUES, G. R. CASTRO, V. THOMAS-SOCCOL and C. R. SOCCOL (2015): Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities and related products. *Front. Microbiol.* 6, 1177.
21. PRENTICE, A. M. (2014): Dairy products in global public health. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 1212S-1216S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.073437>
22. TORCAR, K. G. and A. VENGUŠT (2008): The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M 1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Contr.* 19, 570-577.
23. WIRTH, F. and L. Z. GOLDONI (2012): Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 465717. <https://doi.org/10.1155/2012/465717>

Molecular identification of yeast from raw milk and traditionally produced cottage cheese

Manuela ZADRAVEC, DVM, PhD, Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Vesna JAKI TKALEC, DVM, PhD, Scientific Associate, Sanja FURMEG, BSc. Sanit, Expert Associate, Maja KIŠ, mag. ing. bioproc., mag. ing. agr., Veterinary Institute Križevci, Croatian Veterinary Institute, Križevci, Croatia; Mario MITAK, DVM, PhD, Scientific Advisor in Tenure, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Tomislav MIKUŠ, DVM, PhD, Senior Assistant, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Yeasts are a common contaminant of dairy products, but they can also be used as a starter culture to improve the characteristics of the final product. Their presence in an increased number causes undesirable changes in dairy products, such as an unpleasant appearance, acrid smell and foul taste. The classical identification of yeasts based on morphological and biochemical properties is slow and unreliable. The aim of this study was to identify isolated yeasts from 30 dairy products, and to determine if they belong to desired or undesirable species. Isolated yeasts were identified by sequencing the D1/D2 domain of the gene 28S rRNA. The obtained sequences determined that the isolated yeasts belong to the species: *Kluyveromyces marxianus*, *Candida tropicalis*, *Trichosporon coremiiforme*,

Rhodotorula mucilaginosa, *Trichosporon ovoides*, *Pichia kudriavzevii*, *Issatchenkia orientalis*, which are considered contaminants, and *Debaryomyces hansenii*, a species that can be used as a starter culture. Since yeasts are not thermoresistant microorganisms, they should be removed during pasteurization. However, milk is not heat-treated in traditional cheese-making production, thus increasing the risk of yeast in the final product. These isolated species are very often found in the environment and/or on humans and animals therefore, it can be concluded that the majority of yeast contamination occurs as a result of inadequate hygiene.

Key words: *milk; cottage cheese; dairy; yeasts; molecular identification*