

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

*Дин Фань*

**Дин Фань**

**Морфология, физиология и микробиом кефирных зёрен**

**разного происхождения**

1.5.11. Микробиология (биологические науки)

1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

Доктор биологических наук, профессор

Нетрусов А.И.

Доктор биологических наук, доцент

Стоянова Л.Г.

Москва 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Исторические сведения об использовании кефирных зерен.....	13
1.2. Характеристика кефира.....	16
1.3. Кефирные зерна: состав и структура .....	18
1.4. Кефиран – экзополисахарид кефирных грибков.....	19
1.5. Микробиота кефирных зёрен.....	21
1.5.1. Бактериальный состав кефирных зёрен.....	23
1.5.2. Дрожжевой состав кефирных зёрен.....	27
1.6. Дифференциация и идентификация микробиома кефирных зерен.....	33
1.7. Взаимодействие между микроорганизмами кефирных зёрен.....	40
1.8. Производство и сохранение кефирных зёрен.....	48
1.9. Пробиотические показатели кефира.....	55
1.10. Заключение.....	60
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	62
2.1. Объекты и методы исследования.....	62
2.2. Нарращивание биомассы кефирных зёрен.....	63
2.3. Определение антимикробного спектра действия кефиров на основе кефирных зёрён из разных территориальных зон .....	64
2.4. Микроскопическое изучение микробиоты кефирного зерна.....	66
2.5. Электронно-микроскопическое изучение кефирных зёрен.....	67

2.6. Культивирование кефирных зерен в лабораторных аэробных и анаэробных условиях.....	68
2.7. Выделение чистых культур из микробиоты кефирных зерен из разных территориальных зон.....	70
2.8. Определение гидрофобности культур, выделенных из кефирных зерен.....	72
2.9. Определение способности к образованию биопленок культур, выделенных из кефирных зерен.....	73
2.10. Высокопроизводительное секвенирование микробиоты кефирных зёрен.....	74
2.10.1. Высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК с бактериальными праймерами.....	74
2.10.2. Высокопроизводительное секвенирование дрожжей.....	76
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	78
3.1. Морфологические характеристики кефирных зёрен.....	78
3.2. Динамика роста кефирных зерен.....	84
3.3. Антимикробный спектр действия кефиrow на основе кефирных зёрен из разных территориальных зон.....	86
3.4. Выделение чистых культур молочнокислых бактерий.....	88
3.5. Молекулярная идентификация выделенных чистых культур микроорганизмов.....	91
3.6. Сравнение ростовых характеристик выделенных молочнокислых бактерий.....	93

3.7. Определение степени гидрофобности поверхностей выделенных культур молочнокислых бактерий.....	96
3.8. Определение способность к образованию биопленок поверхностей выделенных культур молочнокислых бактерий.....	97
3.9. Определение способности выделенных культур дрожжей к образованию биопленок.....	99
3.10. Высокопроизводительное секвенирование кефирных зерен.....	103
3.11. Обсуждение результатов.....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	121
ВЫВОДЫ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	126

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы и степень ее разработанности.** Кефирные зерна (КЗ) - это закваска, используемая для производства кефирного напитка, получаемого путем сбраживания цельного или обезжиренного коровьего молока. Эти зерна содержат сложное симбиотическое сообщество молочнокислых бактерий (МКБ) и дрожжей, заключенных в матрице полисахаридов и белков. Многочисленные комбинации этих микроорганизмов на уровне видов приводят к получению домашних кефиров с уникальными характеристиками. Кефир отличается от других кисломолочных продуктов тем, что не является результатом метаболической активности одного или родственных видов микроорганизмов, а производится с использованием сложного, естественно сложившегося микробного сообщества, называемого кефирными зёрнами.

На протяжении веков кефиру приписывались многие полезные свойства, его даже употребляли в качестве натурального лекарства (Amorim, 2019). Микроорганизмы, присутствующие в кефире, обладают пробиотическим потенциалом, демонстрируют высокую устойчивость к низкому рН и солям желчи в желудочно-кишечном тракте и способны прилипать к кишечной слизи (Garrote, 2010). Кроме того, микробиота, присутствующая в кефире, может продуцировать антагонистические вещества, такие как органические и жирные кислоты, бактериоцины, а также препятствовать прилипанию патогенных бактерий в слизистой оболочке кишечника, потенциально способствуя улучшению здоровья кишечника, благодаря наличию

экзополисахаридов (кефираны). Кефир вызывает интерес в научном сообществе благодаря своим полезным свойствам, способности улучшать пищеварение, толерантности к лактозе, антибактериальному, гипохолестеринемическому эффекту, контролю уровня глюкозы в плазме, антигипертензивному и противовоспалительному эффектам, антиоксидантной, антиканцерогенной и антиаллергенной активностям (Boyoglu-Barnum et al., 2019).

КЗ содержат широкий спектр микробных видов. Различные сообщения свидетельствуют о том, что микробные составы КЗ зерна сильно зависят от происхождения зерна, местных условий культивирования, процессов хранения и переработки (Miao et al., 2016). Микроорганизмы, присутствующие в кефире, обладают потенциалом пробиотиков. Основными продуктами ферментации кефира являются молочная кислота, этанол и  $\text{CO}_2$ , которые придают этому напитку кислотность и низкое содержание алкоголя. Также могут быть найдены второстепенные компоненты, в том числе диацетил, ацетальдегид и аминокислоты, влияющие на вкусовую композицию.

В настоящее время увеличился спрос на кефир во многих регионах мира (Farag et al., 2020). В научных лабораториях возрос интерес к изучению свойств кефира, КЗ и кефирана для разработки новых важных функциональных продуктов, биологически активных добавок и лекарственных средств. Хотя изучение КЗ ведут уже в течение длительного времени (Lopitz-Otsoa et al., 2006), до сих пор остаются без ответа много вопросов, касающихся микробного состава, трофических взаимоотношений

компонентов и биотехнологического потенциала сообществ КЗ. Точный микробный состав КЗ до сих пор остается спорным, поскольку микробиом КЗ зависит от условий культивирования и территориального происхождения.

Благодаря постоянному развитию современных молекулярных технологий, таких как высокопроизводительные технологии секвенирования, становится возможным более глубокий анализ сложного микробного сообщества КЗ.

**Цель и задачи работы.** Целью работы является изучение морфологии, физиологии и микробиом кефирных зёрен из разных территориальных зон.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучение морфологии кефирных зерен из разных регионов, установление пространственного расположения микроорганизмов в их структуре.
2. Биотехнологические показатели кефиrow, приготовленных на кефирных зернах из разных территориальных зон: время культивирования, накопление биомассы в динамике ферментации, антимикробный спектр действия.
3. Определение доминирующего состава бактерий и дрожжей в микробиоме кефирных зёрен из разных регионов.
4. Выделение и идентификация лактобацилл и дрожжей из микробиомов, изучение их морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов.

5. Изучение адгезионной способности выделенных микроорганизмов как пробиотического показателя для создания эффективных функциональных продуктов и пробиотиков.
6. Сравнение свойств исследованных кефирных зерен и выявление наиболее эффективных заквасок.

**Объектом исследования** являлись КЗ домашних хозяйств из разных регионов исторического происхождения: Москвы, Осетии и Китая (провинция Тибет). Предметом исследования являлись морфологии, физиологии и микробиом КЗ из разных территориальных зон.

**При исследовании** использовали разнообразные масштабируемые микробиологические способы, позволяющие сравнить морфологию, физиологию и особенности культивирования кефирных зёрен из разных территориальных зон, проведен метагеномный анализ микробных сообществ.

**Научная новизна работы.** Впервые с помощью высокопроизводительного секвенирования генома показано филогенетическое разнообразие микроорганизмов в микробиоме кефирных зёрен из разных территориальных зон их исторического происхождения (Кавказ, Тибет и Россия), установлены их отличия по бактериальному и дрожжевому составу.

В лабораторных условиях изучены биотехнологические характеристики кефиrow, приготовленных на кефирных зернах из разных регионов: скорость увеличения биомассы закваски в процессе ферментации молока,

антимикробный спектр воздействия на разные таксономические группы микроорганизмов - потенциальных возбудителей заболеваний, гидрофобность и способность к образованию биопленок.

**Практическая значимость.** Изучение культуральных свойств выделенных и идентифицированных штаммов таких, как способность к аэробному и анаэробному росту, и скорость роста позволили определить длительность фаз роста: лаг-фазы, экспоненциальной фазы, стационарной фазы, фазы отмирания, что необходимо для отработки биотехнологического процесса производства кефира.

Разработаны условия получения кефирных зёрен в стадии самого роста, что может служить рекомендацией при разработке биотехнологии производства кефира на их основе.

С использованием современного высокопроизводительного секвенирования переменных участков генов 16S рРНК проанализированы и сравнены микробиомы кефирных зёрен, отобранные из трёх различных регионов. Полученные данные помогут в стандартизации кефирных заквасок и продуктов функционального питания по целевому назначению и созданию стабильного консорциума кефирных зерен.

Выделены чистые культуры МКБ и дрожжей из кефирных зерен, изучена их адгезионная способность к формированию биоплёнки, что повышает пробиотические характеристики этих культур для создания новых препаратов.

**Методология и методы исследования.** Автором выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, планирование

и проведение экспериментальной и теоретической частей работы с использованием современных методов микробиологии, молекулярной биологии и биотехнологии. Полученные результаты были проанализированы, систематизированы и изложены в тексте работы, сформулированы выводы и практические рекомендации.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Установлены морфологические показатели КЗ, полученных из России, Осетии и Китая (район Тибета). С помощью электронно-микроскопических исследований установлено пространственное расположение микроорганизмов в структуре КЗ.

2. Высокопроизводительное секвенирование переменных участков генов 16S рРНК бактерий и ITS1-областей дрожжей КЗ позволило установить биологическое разнообразие молочнокислых бактерий и дрожжей, их населяющих. Показано, что основными представителями сложного сообщества КЗ являются молочнокислые бактерии, включающие лактобациллы, лактококки и лейконостоки в разных соотношениях. В образцах из Осетии были также обнаружены бактерии рода *Enterococcus*, в образцах из Тибета - уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*, что определяет их отличительные свойства и биотехнологические характеристики.

3. Способность исследованных КЗ формировать биоплёнки и обладать гидрофобными поверхностями соответствует требованиям, предъявляемым к пробиотическим культурам.

4. Проведенные эксперименты показали, что искомые свойства могут в значительной степени варьировать от штамма к штамму даже внутри одного вида. Поэтому для поиска и сравнения пробиотических свойств необходимо проверять все штаммы, выделяемые из КЗ.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные положения работы и результаты исследований представлены на международных и всероссийских конференциях: Всероссийской конференции с международным участием "Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии" (Москва, 2019); Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов 2021" (Москва, 2021); Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов 2022" (Москва, 2022). Восьмая научно-практическая Школа-конференция «Аллергология и клиническая иммунология», Сочи, Россия, 2-8 октября 2022; «International Conference Scientific research of the SCO countries synergy and integration» (КНР, Пекин, 9 марта, 2022); Международным участием «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарной экспертизы и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции», Москва, Россия, 6-7 апреля 2023.

**Личный вклад автора** заключается в самостоятельном выполнении экспериментальных исследований, представленных в работе, анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке полученных результатов, подготовке публикаций и научных докладов. и написания диссертации.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, экспериментальной части и обсуждения результатов, выводов, заключения, списка использованной литературы. Работа изложена на 139 страницах, содержит 20 рисунков и 12 таблиц. Список литературы включает 103 источника, в том числе 87 иностранных.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 4 научные работы, среди них 4 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность за ценные советы, неоценимую помощь и всестороннюю поддержку при выполнении работы научным руководителям — профессору доктору биологических наук Александру Ивановичу Нетрусову и доктору биологических наук Лидии Григорьевне Стояновой.

Автор благодарит сотрудника лаборатории физиологии и биохимии микробов биологического факультета МГУ Алёну Игоревну Климко, доцента биологического факультета Хучжоуского педагогического университета (Китай) Юа Лана за методическую помощь, критические замечания и поддержку.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Исторические сведения об использовании кефирных зерен

Эволюционно сложившиеся микробные сообщества являются естественной формой существования микроорганизмов в природе. Микробные сообщества, как правило, ограничены плёнкой или другой структурированной системой и характеризуются стабильностью и высокими показателями метаболической активности. Консолидация микроорганизмов в сообщества, обеспечение взаимной стимуляции их роста, химической коммуникации путем воздействия сигнальных метаболитов и биостимуляторов приводит к совершенствованию кооперации клеток с комплексной моделью роста, к стабильности сообществ, способности оказывать сопротивление действию техногенных факторов. Сообщества микроорганизмов имеют широкое применение в практической деятельности человека, например, при утилизации отходов промышленных производств и отходов агропромышленного комплекса (метаногенные сообщества, активный ил биологической очистки сточных вод, при компостировании, силосовании, биоремедиации загрязнённых экосистем и др.), а также в составе пищевых продуктов, пищевых добавок, продуктов, обладающих пробиотическими свойствами, для поддержания нормального биоценоза человека, гомеостаза организма, защиты от давления техногенных экологических факторов (Андроханов, Курачев, 2010). Кефирные зерна (КЗ) как раз являются яркими представителями такой морфологически оформленной и стабильно функционирующей ассоциативной культуры. КЗ применяются человеком уже

более тысячелетия для получения напитка, обладающего существенными биологическими преимуществами – кефира. Внимание микробиологов, как отечественных, так и зарубежных, давно обращено на кефирные зерна, как ассоциативную культуру, несмотря на это, закономерности их функционирования и образования структуры остаются малоизученными.

Кефир берет свое начало на Кавказе, в тибетских или монгольских горах, где до 2000 года до нашей эры кефирное зерно традиционно передавалось из поколения в поколение среди племен, считаясь источником семейного богатства, а сам процесс приготовления кефира держали в строгом секрете. Название кефир происходит от турецкого "Kefir", что означает "благополучие" или "жить хорошо" из-за общего чувства здоровья и благополучия, возникающего у тех, кто его потребляет (Farnworth et al., 2008). Жители отдельных поселений Северного Кавказа, считают, что они получили кефирное зерно от Пророка Мухаммеда, путешествовавшего по их землям около 1400 лет назад. Люди стали именовать зерном Пророка Мохаммеда, а сам напиток - напитком Пророка (Кароматов, Шодиева, 2018).

Идея оздоровления организма и предупреждения старения человека с помощью добавления в рацион кисломолочных продуктов впервые была представлена великим русским микробиологом И.И. Мечниковым. Наблюдения, за жизнью и питанием горцев Балканских стран и Кавказа, помогли ему в 1907 году высказать предположение, что долголетие местного населения во многом связано с ежедневным употреблением сквашенного молока и предложить теорию старения людей. Согласно этой теории,

гнилостные бактерии, обитающие в кишечнике, разлагают белки с образованием ядовитых продуктов – фенолов, индола, скатола и др. Эти вещества медленно отравляют организм, постоянно поступая в кровь, и являются причиной преждевременного старения. Борьбу с нежелательной микробиотой И.И. Мечников предложил осуществлять с помощью полезных молочнокислых бактерий, способных приживаться в организме человека.

Повсеместное распространение кефирных зерен, как в России, так и в других регионах, произошло много лет назад. В этом плане кефирные зерна имеют большое сходство. Однако, при более детальном изучении, оказывается, что микробный состав кефирных зерен из разных регионов может отличаться, что и обуславливает различия во вкусовых качествах кефира. Физико-химические условия и технологии производства уникальны в каждом отдельно взятом регионе, следовательно, селекционно были отобраны наиболее устойчивые к конкретным сложившимся условиям виды симбионты кефирного зерна.

В связи с этим, сравнительный анализ микробного состава сообщества кефирных зерен, заквасок, кефирного напитка и изучение свойств изолированных чистых культур бактерий и дрожжей необходимы, чтобы выяснить роль разных групп микроорганизмов в формировании заквасок и готового продукта (кефирного напитка). Знание о том, какие виды микроорганизмов переходят из кефирного зерна в закваску, а затем в готовый продукт, необходимо для установления регламентов микробиологического

состава конечного продукта. На данном этапе исследования точный микробный состав кефирных зерен не определен.

Производство кефирных зерен сталкивается с более чем одной проблемой из-за уникальной и разнообразной микробиоты кефирного зерна, типа молока, времени инкубации и условий хранения (Bourrie et al., 2016). Сенсорные, физико-химические свойства и качество кефирных продуктов препятствовали массовому производству кефира в промышленных масштабах (Lopitz-Otsoa et al., 2006). Такие ограничения могут быть обусловлены разнообразием микроорганизмов и их взаимодействием, которые влияют на качество конечного продукта. Необходимы дополнительные исследования для улучшения и стандартизации производства на промышленном уровне (Machado et al., 2013).

## **1.2. Характеристика кефира**

Кефир – кисломолочный продукт, полученный в результате комбинированного молочнокислого и спиртового сбраживания лактозы в молоке. Кефир получают путем посева “кефирных зерен”, имеющих относительно стабильный и специфический баланс бактерий и дрожжей, в молоко, которое также представляет собой источник биологически активных соединений. Однако отмечено, что усвояемость молока организмом человека составляет 32%, а кисломолочные напитки, например, кефир усваиваются полностью. Кефир- хороший вариант для людей с непереносимостью лактозы, тех, кто не может переварить значительное количество лактозы, которая

является преобладающим сахаром в молоке (Rea et al., 1996). Содержание лактозы в кефире снижается, в то время как содержание  $\beta$ -галактозидазы увеличивается в результате ферментации (Ottles and Cagindi, 2003). Характеристика кефира как продукта включает основные показатели: кислотность продукта (рН 4.6), содержание спирта (0.5 – 2 %), органолептические показатели - кислый вкус и дрожжевой аромат. Также могут быть найдены и второстепенные компоненты, в том числе диацетил, ацетальдегид и аминокислоты, влияющие на вкусовую композицию (Градова и др. 2012). Рекомендуемые стандарты качества кефира: содержание белка - не менее 2,8 %, жира - менее 10% и не менее 0,6% молочной кислоты (ГОСТ 31454-2012). Химический состав кефира отражает его пищевую ценность. Многочисленные виды бактерий, содержащиеся в кефире, обладают высоким пробиотическим потенциалом, включая ингибирующее действие на патогенные и гнилостные микробы, устойчивость к стрессовым условиям ЖКТ (низкому рН и солям желчи), адгезивные свойства, что является следствием синтеза экзополисахаридов, по своей структуре аналогичных экзополисахариду кефирану (Еникеев, 2011; Градова и др., 2014). Сильнейший антисептик, содержащийся в этом напитке, — это молочная кислота. Несмотря на пробиотическую природу самого кефира, его можно дополнять культурами микроорганизмов, чтобы обеспечить достаточное ежедневное потребление пробиотиков по целевому назначению (Farag et al., 2020). Для производства кефира используют закваски, представляющие собой естественно сложившиеся микробные сообщества, называемые кефирными зернами. В

соответствии с современными требованиями нормативно-технической документации (ГОСТ 31454-2012). продукт может называться кефиром, если он произведен с использованием закваски, приготовленной на кефирных зернах без добавления других чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей, при этом содержание молочнокислых бактерий в готовом продукте в конце срока годности должно составлять не менее  $10^7$  КОЕ в 1 г продукта, а дрожжей - не менее  $10^4$  КОЕ в 1 г продукта. После последовательного брожения зерна кефира могут распадаться на зерна нового поколения, которые имеют те же характеристики, что и старые. (Gao et al., 2012).

### **1.3. Кефирные зерна: состав и структура**

Микробиологический состав кефирного зерна весьма сложен. Согласно современным представлениям, микробный состав кефирных зерен представлен главным образом дрожжами, молочнокислыми (МКБ) и уксуснокислыми бактериями (УКБ) нескольких групп (Leite et al., 2013). Кефирные зерна эластичные, слизистые, по виду похожи на цветную капусту. Их можно описать как студенистые белые или слегка желтые массы с эластичной консистенцией и размером от 0.3 до 3.5 см в диаметре (рис. 1). Изучение кефирных зерен под микроскопом показало, что поверхности зерен кефира были гладкими, бугристыми и имели желатиновое матричное вещество, которое покрывало скопления клеток сверху в виде тонкой полисахаридной пленки.

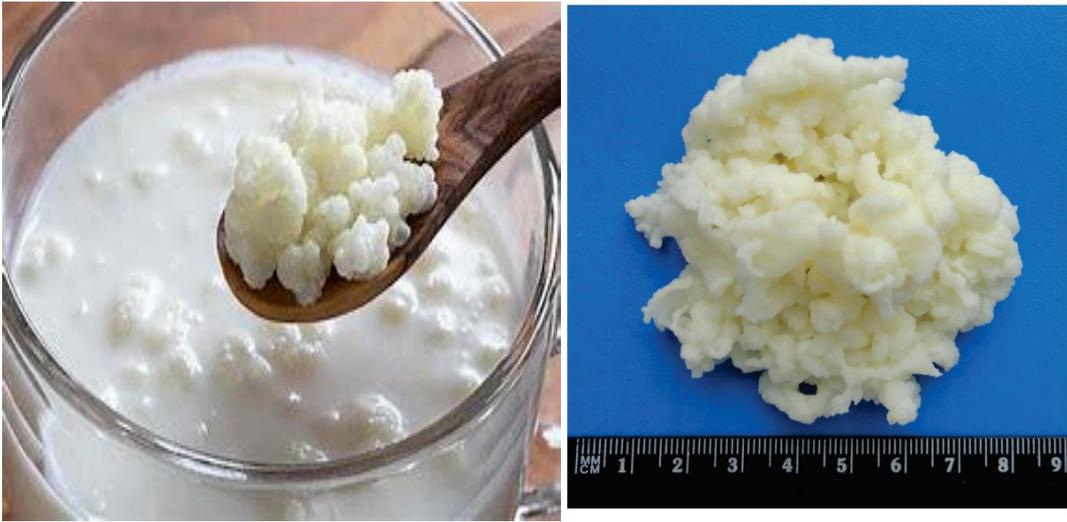


Рисунок 1. Кефирное зерно (Leitte et al., 2013)

#### 1.4. Кефиран – экзополисахарид кефирных грибков

Кефир может выступать в качестве матрицы для эффективной доставки пробиотических микроорганизмов в различные виды продуктов. В кефирных зернах и кефире основным полисахаридом является кефиран, который представляет собой гетерополисахарид, состоящий из равных пропорций глюкозы и галактозы и вырабатываемый в основном *Lactobacillus kefiranofaciens* (Зайшек и др., 2011). Кефиран имеет разветвленное строение (рис. 2) и состоит из примерно равных остатков D-глюкозы и D-галактозы (Medrano et al., 2008). Кефиран обладает противомикробным и ранозаживляющим свойствами, способностью снижать кровяное давление и уровень холестерина в сыворотке крови. Кроме того, установлен противоопухолевый его эффект и способность к повышению защитного иммунитета (Chen et al., 2015). Кефиран в концентрациях 5.9–14.3 г/л способен образовывать криогели, способные плавиться при 37°C, что может найти применение при разработке пищевых продуктов (Зайшек и др., 2013). Причем

при добавлении сахарозы или фруктозы в разных концентрациях к растворам кефирана можно изменять вязкость полученных гелей (Римада и Абрахам, 2006) Он способен образовывать гели с интересными вязкоупругими свойствами при низких температурах, что также может быть использовано для ферментации (Zavala et al., 2015). Кроме того, кефиран улучшает реологические свойства химически подкисленных гелей из обезжиренного молока, увеличивая их кажущуюся вязкость (Градова и др., 2012; Zamberi, et al., 2015).

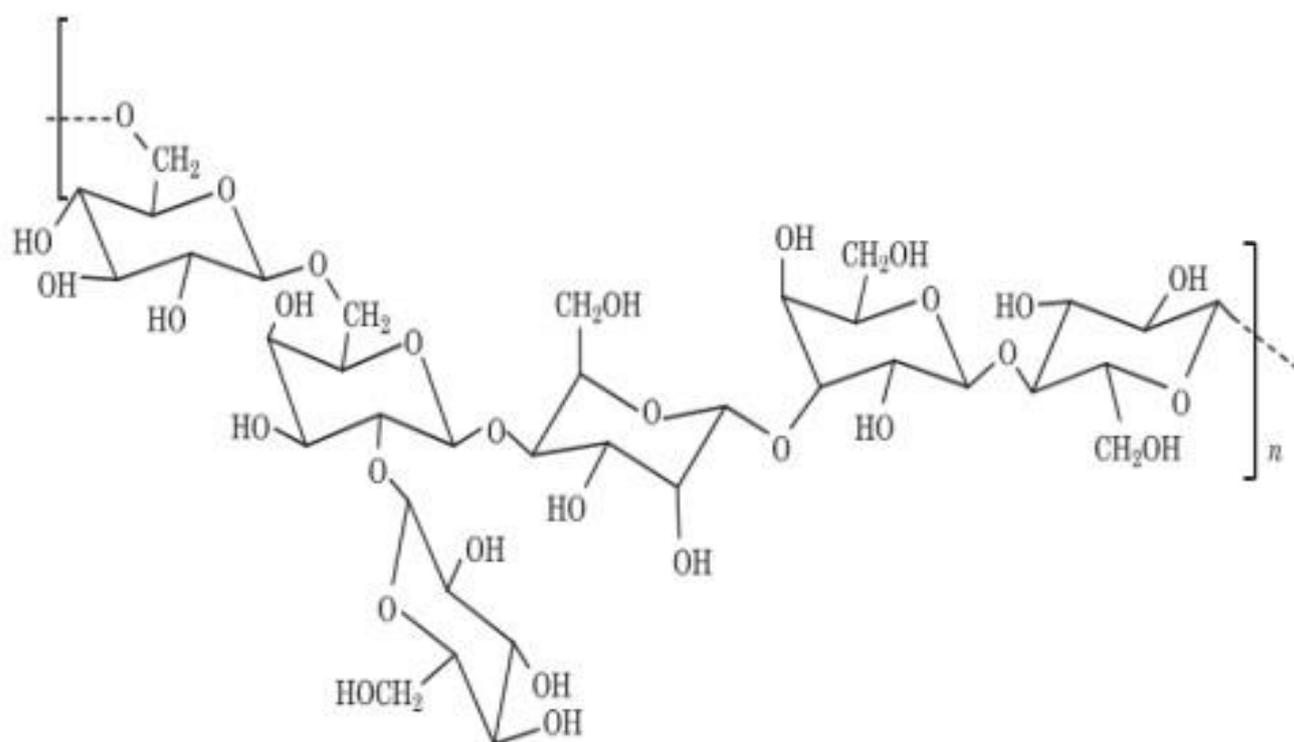


Рисунок 2. Структурная формула кефирана

## 1.5. Микробиота кефирных зёрен

Микробиота кефирных зерен представлена кокками и короткими или длинными палочками, которые находятся в тесном соседстве с дрожжевыми клетками вытянутой формы. Короткие палочки, предположительно *Lactobacillus kefir*, расположены ближе к поверхности стромы, а длинные и изогнутые тонкие палочки, такие как *Lactobacillus kefiranofaciens* по всему объему матрикса и концентрация их увеличивается к центру. Кокки преимущественно располагаются на поверхности дрожжевых клеток, в то время как палочки находятся в пространстве между дрожжевыми клетками. Дрожжи наиболее прочно связаны со стромой кефирных зерен, они концентрируются как в центре зерна, так и на поверхности. Плотность расположения микробных клеток во внутренней части кефирных зерен ниже, чем на поверхности (Wang et al., 2012). Количество микроорганизмов на поверхности и внутри зерен зависит от их отношения к кислороду, а также связано с различиями значений рН. Внутри зерен очень низкое значение рН, которое ингибирует рост лактококков. В связи со слабой адгезирующей способностью лактококков *L.lactis*, многие исследователи при использовании электронной микроскопии не обнаруживали их присутствие в составе кефирных зерен, не смотря на то, что *L.lactis* определяли как один из доминирующих видов в тех же зернах при использовании других методов выделения (Cheirsilp et al., 2003; Jianzhong et al., 2009).

Точный микробный состав кефирных зерен до сих пор остается спорным. В кефирах на основе зерна было обнаружено до 50 различных видов бактерий

и дрожжей, которые были выделены из кефиров разных мест производства (Pogačić et al., 2013). Наиболее распространенными бактериальными родами в зернах кефира из молока являются МКБ, на долю которых приходится около 37-90% микробной популяции (Yüksekdağ et al., 2004; Miguel et al., 2010; Zanirati et al., 2015), но также имеются уксусные бактерии, и дрожжи (Witthuhn et al., 2005; Yang et al., 2007; Mayo et al., 2012; Gao et al., 2013). Необходимо отметить, что до 60 % всего микробного состава кефира составляют мезофильные молочнокислые стрептококки, из которых можно выделить кислотообразователи – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ранее *Streptococcus lactis*), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* и ароматобразующие виды – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*, и др. Ароматобразующие молочнокислые бактерии обогащают молочные продукты ароматическими веществами (эфир, диацетил) и большим количеством летучих кислот (уксусная и пропионовая) (Pakhomov et al., 2010). В готовом продукте их количество доходит до  $10^9$  КОЕ в 1 см<sup>3</sup>. При этом при более высокой температуре (40-45°C, максимальная 46-50°C) лучше развиваются и сбраживают лактозу термофильные стрептококки (*Streptococcus thermophilus*). Их клетки образуют цепочки разной длины (Лаптев и др., 2009). Различные сообщения свидетельствуют (Prado et al., 2015; Kotova et al., 2016) о том, что микробный состав кефирного зерна сильно зависит от происхождения зерна, местных условий культивирования.

### 1.5.1. Бактериальный состав кефирных зёрен

Кефирные зерна содержат широкий спектр микробных видов. Различные сообщения свидетельствуют о том, что бактериальный состав кефирного зерна сильно зависит от происхождения зерна, местных условий культивирования (табл.1) . Из молочнокислых бактерий преобладающими видами являются лактобациллы, такие как *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. plantarum* и *L. kefiranofaciens*, составляющие лишь 20% от общего количества МКБ (Gao et al., 2012; Wang et al., 2012; Zamberi et al., 2015), но встречаются мезофильные гомоферментативные лактококки *Lactococcus* spp. (Magalhaes et al., 2011; Garofalo et al., 2015), термофилы *Streptococcus thermophilus* (Simova et al., 2002; Kok-Tas et al., 2012; Guzel-Seydium, 2005), виды гетероферментативных лактобацилл и лейконостоков *Leuconostoc* spp. - стрептококков, продуцирующих молочную и уксусную кислоты, углекислый газ, этиловый спирт, декстран и ароматические вещества - ацетоин и диацетил (Diosma et al., 2014; Walsh et al., 2016). Китайскими исследователями (Yang et al., 2007; Jianzhong et al., 2009; Gao et al., 2012) выделены уксуснокислые бактерии, например, *Acetobacter fabarum*, а *Acetobacter pasteurianus* выделен из кефиров, выработанных в странах Европы, например, Франции, Бельгии, Италии, Швейцарии (Korsak et al., 2012; Garofalo et al., 2015). Уксуснокислые бактерии, выделенные из молочных продуктов, относятся к роду *Acetobacter*, являются подвижными грамотрицательными палочками, которые располагаются поодиночке, попарно, цепочками. У некоторых штаммов могут присутствовать инволюционные формы: сферические,

изогнутые, нитевидные и т.д. Спор и капсул не образуют. Они окисляют спирт до уксусной кислоты в аэробных условиях (так называемое уксуснокислородное неполное окисление), некоторые штаммы могут окислять ацетат и лактат до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O, лактозу не гидролизуют (Montaghi et al., 1997). В составе микробиоты кефиров производства китайских и турецких фирм обнаружены энтерококки *E. durans*. Многочисленная группа молочнокислых бактерий рода *Enterococcus*, включающая *E. durans*, ранее относилась к стрептококкам серологической группы D и E, они колонизируют кишечник человека в первые недели его жизни и являются незаменимой культурой, участвующей в процессах переработки пищи (Yang et al., 2007).

Таблица 1.

**Бактериальный состав кефирных зерен, выделенный из кефиров разных производителей**

Бактериальный компонент	Источник - страна	Ссылка
<i>Lactobacillus: L. kefir</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. parakefir</i> ; <i>Lactococcus</i> : <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ; <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>	Аргентина	Garrote et al., 2001 Londero et al., 2012 Hamet et al., 2013 Diosma et al., 2014
<i>Lactobacillus: L. brevis</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. casei</i> ssp. <i>pseudoplantarum</i> ;	Болгария	Simova et al., 2002

<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Lactis</i>		
<i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. plantarum</i> ; <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactococcus</i> sp.	Южная Африка	Witthuhn et al., 2004 Witthuhn et al., 2005
<i>Lactococcus</i> : <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactococcus</i> : <i>L. lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> : <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i> ; <i>Streptococcus thermophilus</i>	Турция	Yüksekdağ et al., 2004 Guzel-Seydim et al., 2005 Kesmen и Kacmaz, 2011 Kok-Tas et al., 2012 Nalbantoglu et al., 2014
<i>Lactobacillus</i> : <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. parakefir</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp.	Россия	Mainville et al., 2006 Kotova et al., 2016

<p><i>Enterococcus durans</i>,  <i>Lactococcus lactis</i> ssp.  <i>cremoris</i>,  <i>Leuconostoc</i>  <i>pseudomesenteroides</i>,  <i>Leuconostoc</i>  <i>paramesenteroides</i>,  <i>Lactobacillus brevis</i>,  <i>L. acidophilus</i>,  <i>L. kefiranofaciens</i>,  <i>Leuconostoc mesenteroides</i>,  <i>Lactobacillus</i> sp, <i>L. kefiri</i>,  <i>L. casei</i>,  <i>L. plantarum</i>, <i>L. helveticus</i>;  <i>Leuconostoc lactis</i>,  <i>Lactococcus</i> sp., <i>L. lactis</i>,  <i>Acetobacter fabarum</i>,  <i>Bacillus subtilis</i></p>	<p>Китай</p>	<p>Yang et al., 2007  Jianzhong et al., 2009  Gao et al., 2012  Gao et al., 2013</p>
<p><i>Lactobacillus kefiri</i>, <i>L.</i>  <i>kefiranofaciens</i>, <i>Leuconostoc</i>  <i>mesenteroides</i>,  <i>Lactococcus. lactis</i>,  <i>Lactobacillus paracasei</i>,  <i>L. helveticus</i>, <i>Gluconobacter</i>  <i>japonicus</i>,  <i>Lactobacillus: L. uvarum</i>, <i>L.</i>  <i>satsumensis</i>, <i>L. amylovorus</i>,  <i>L. buchneri</i>, <i>L. crispatus</i>, <i>L.</i>  <i>parakefiri</i>;</p>	<p>Бразилия</p>	<p>Miguel et al., 2010  Leite et al., 2012  Zanirati et al., 2015  Magalhães et al.,2011_</p>

<i>L. kefiranofaciens</i> ssp. <i>kefiranofaciens</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> ssp. <i>kefirgranum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>L.</i> <i>casei</i> ; <i>Leuconostoc</i> sp.,		
<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>L.</i> <i>kefiranofaciens</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> .	Италия	Garofalo et al., 2015
<i>Lactobacillus</i> : <i>L. kefiri</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> и <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Бельгия	Korsak et al., 2015
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>L. kefiri</i>	Малайзия	Zamperi et al., 2016
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Acetobacter pasteurianus</i>	Франция, Ирландия и Англия	Walsh et al., 2016

### 1.5.2. Дрожжевой состав кефирных зёрен

В состав кефирного зерна входят различные виды сбраживающих и не сбраживающих лактозу, спорообразующих и неспорообразующих дрожжей (по разным данным от 4 до 30 разных видов), среди которых наиболее часто упоминаются *Kluuveromyces marxianus*, *Candida kefir*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Torulospora delbrueckii*, *Pichia fermentans*

и синонимы названий этих видов (табл. 2). Особенность, которая отличает кефир от других кисломолочных продуктов, заключается в том, что в зернах кефира содержится много дрожжей (Tamang et al., 2016). Дрожжи признаны играющими ключевую роль в приготовлении ферментированных молочных продуктов, где они обеспечивают необходимые питательные вещества для роста молочнокислых бактерий, такие как аминокислоты и витамины, изменяют pH, выделяют этанол и производят CO<sub>2</sub>. Дрожжи в кефире изучены менее хорошо, чем бактерии, хотя дрожжи в зернах явно обеспечивают среду, благоприятную для роста бактерий кефира, производя метаболиты, которые способствуют аромату и вкусу (Farnworth, 2005). Более 23 различных видов дрожжей были выделены из зерен кефира и из ферментированных напитков различного происхождения. Однако преобладающими видами являются *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kefyr*, *Kluveromyces marxianus* ssp. *Marxianus*, выделенные из кефиров, производимых в Турции, Аргентине и странах с жарким климатом. (Fleet, 1990; Assadi, 2000; Loretan et al., 2003; Witthuhn et al., 2005; Kok-Tas et al., 2012; Diosma et al., 2014). *Kluveromyces marxianus* - это аэробные дрожжи, способные к респиро-ферментативному метаболизму, который заключается в одновременном генерировании энергии как за счет дыхания через цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), циклическая последовательность метаболических реакций у аэробных организмов (эу и прокариот), промежуточный этап между гликолизом и электрон-транспортной системой, так и за счет ферментации этанола.

При подборе оптимальной температуры для созревания продуктов необходимо обращать внимание на температурный оптимум развития дрожжей (20 – 30°C), входящих в состав кефирного зерна. МКБ расщепляют лактозу до простых сахаров, усваиваемых дрожжами. В свою очередь, дрожжи синтезируют витамины группы В. Концентрация дрожжей на грамм кефирного зерна достигает  $10^7 - 10^8$  КОЕ (Garrote et al., 2010).

Практически в любом кисломолочном продукте, приготовленном с использованием естественных заквасок, присутствуют дрожжи. Несмотря на их широкое распространение, кефирные дрожжи изучены меньше, чем кефирные бактерии, развитие дрожжей происходит во много раз медленнее деления молочнокислых бактерий (МКБ), исходя из этого, их концентрация в продуктах гораздо меньше, чем МКБ, как следствие, обнаружение дрожжей происходит реже. Классические методы исследования микробного состава путем посева на твердые среды отмытых и ресуспендированных фрагментов исследуемых кефирных зерен показали, что количество дрожжей в ассоциированном сообществе каждого зерна почти в 10 раз меньше количества бактерий (Градова и др., 2012).

Таблица 2.

## Дрожжевой состав микробиоты кефиров из разных стран

Дрожжи	Источник – страна	Ссылка
<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Kluveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Issatchenkia occidentalis</i>	Аргентина	Garrote et al., 1997; Garrote et al., 1998; Garrote et al., 2001; Diosma et al., 2014;
<i>Candida inconspicua</i> , <i>Candida maris</i> , <i>Kluveromyces marxianus</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	Болгария	Simova et al., 2002
<i>Candida kefir</i> , <i>Saccharomyces fragilis</i> , <i>Saccharomyces lactis</i>	Иран	Motaghi et al., 1997;
<i>Kazachstania aerobia</i> , <i>Lachancea meyersii</i>	Бразилия	Magalhaes et al., 2011
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Torulasporea delbrus</i> , <i>Torulasporea delbrueckii</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Zygosaccharomyces sp.</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida holmii</i> , <i>Candida kefir</i> , <i>Candida lambica</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Cryptococcus humicolus</i>	Южная Африка	Loretan et al., 2003; Witthuhn et al., 2004; Witthuhn et al., 2005;

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Geotrichum candidum</i>		
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Турция	Kok-Tas et al., 2012
<i>Brettanomyces anomalus</i> <i>Candida holmii</i> , <i>Candida kefyri</i> <i>Candida lambica</i> , <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida tenuis</i> , <i>Candida valida</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Issatchenkia occidentalis</i> <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces delbrueckii</i> <i>Saccharomyces exiguus</i> <i>Saccharomyces unisporus</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Швейцария	Fröhlich- Wyder, 2003 Fleet, 1990
<i>Brettanomyces anomalus</i> <i>Candida friedrichii</i> , <i>Candida holmii</i> <i>Candida inconspicua</i> , <i>Candida kefyri</i> <i>Candida lambica</i> , <i>Candida maris</i> <i>Candida tenuis</i> , <i>Candida valida</i>	Канада	Farnworth, 2005

<p><i>Candida tannotelerans</i></p> <p><i>Issatchenkia occidentalis</i></p> <p><i>Kluyveromyces marxianus</i></p> <p><i>Pichia fermentans</i></p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p> <p><i>Saccharomyces dairensis</i></p> <p><i>Saccharomyces delbrueckii</i></p> <p><i>Saccharomyces exiguous</i></p> <p><i>Saccharomyces turicensis</i></p>		
<p><i>Brettanomyces anomalus</i></p> <p><i>Candida famata,</i></p> <p><i>Candida firmetaria</i></p> <p><i>Candida friedrichii,</i></p> <p><i>Candida humilis</i></p> <p><i>Candida inconspicua,</i></p> <p><i>Candida kefyr</i></p> <p><i>Candida krusei,</i></p> <p><i>Candida lipolytica</i></p> <p><i>Candida maris,</i></p> <p><i>Yarrowia lipolytica</i></p> <p><i>Cryptococcus humicolus</i></p> <p><i>Debaryomyces hansenii</i></p> <p><i>Dekkera anomala</i></p> <p><i>Galactomyces geotrichum</i></p> <p><i>Geotrichum candidum</i></p> <p><i>Issatchenkia orientalis</i></p> <p><i>Kluyveromyces lodderae</i></p> <p><i>Kluyveromyces marxianus</i></p> <p><i>Pichia fermentans</i></p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	Испания	<p>Lopitz-Otsoa et al., 2006</p> <p>Latorre-García et al., 2007</p>

<i>Saccharomyces exiguus</i> <i>Saccharomyces humaticus</i> <i>Saccharomyces pastorianus</i> <i>Saccharomyces turicensis</i> <i>Saccharomyces unisporus</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		
<i>Candida holmii</i> <i>Candida kefir</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces fragilis</i> <i>Saccharomyces lactis</i>	Индия	Assadi, 2000
<i>Kazachstania aerobia</i> <i>Kazachstania salicola</i> <i>Kazachstania serovazzii</i> <i>Kazachstania turicensis</i> <i>Kazachstania unispora</i>	Италия	Garofalo et al., 2015
<i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Kazachstania unispora</i> <i>Kazachstania exigua</i>	Китай	Jianzhong et.al, 2009; Gao et al., 2012; Gao et al., 2013

### 1.6. Дифференциация и идентификация микробиома кефирных зерен

Кефирные зерна представляют собой уникальное микробное сообщество, состоящее из бактерий, дрожжей и иногда нитевидных плесеней, создающих сложное симбиотическое сообщество. Сложность их физической и микробиологической структуры является причиной того, что кефирные зерна до сих пор однозначно не изучены. Микробиота кефирных зерен была изучена

с использованием многих микробиологических и молекулярных подходов. Развитие метагеномики, основанной на идентификации без культивирования, открывает новые возможности для идентификации ранее неизолированных и неидентифицированных видов микроорганизмов из кефирных зерен.

Первоначальная дифференциация микроорганизмов сообщества включает комплекс фенотипических признаков, основанных на изучении морфологических и физиолого-биохимических свойств. Наиболее распространенными бактериями в зернах кефира и кефире являются МКБ (молочнокислые бактерии), на долю которых приходится от 37% до 90% микробной популяции. Эти виды микроорганизмов подразделяются на четыре группы: гомоферментативные и гетероферментативные молочнокислые бактерии и дрожжи, ассимилирующие и не ассимилирующие лактозу (Gao et al., 2012). Анаэробное культивирование при выделении чистых культур бактерий проводили при комнатной температуре (21 °С), на агаризованной среде МРС в чашках Петри (90 мм). В таких условиях культуры вырастают за 3–5 суток. Чистые анаэробные культуры получали методом истощающего штриха. После посева чашки помещали в анаэростат, куда вносили газ–пакет. При применении стандартных микробиологических методов посева на агаризованную среду трудно обеспечить необходимую полноту выделения компонентов кефирных зерен. Морфологические характеристики колоний некоторых микроорганизмов могут быть настолько близки, что их легко принять за идентичные культуры, в то время как колонии, мало различающиеся морфологией, могут быть образованы одним и тем же микроорганизмом

(Сычева и Карташова, 2015). Так, например, в неблагоприятных для роста условиях при длительном воздействии физических, химических, биологических стрессов наблюдалось выщепление минорных фенотипов (субпопуляций) молочнокислых бактерий, образование жизнеспособных некультивируемых форм (Pachomov et al., 2018).

МКБ – филогенетически неродственные микроорганизмы, живущих только за счёт процесса брожения, в ходе которого образуется молочная кислота. В качестве источника энергии используют лактозу и др. углеводы. Гетерогенные по морфологии: палочковидные и шаровидные (кокки сферической или эллипсоидной формы), которые характеризуют как грамположительные, не образующие капсулы, споры (за исключением сем. *Sporolactobacillaceae*), не образуют пигмент, кроме *Leuconostoc citreum*, образующего капсулы и желтый пигмент, не восстанавливают нитраты в нитриты. Каталазо- и оксидазо-отрицательные, лишённые цитохромов, аэро- и кислототолерантные, неподвижные, образующие в качестве конечного метаболита молочную кислоту.

Молочнокислые бактерии широко распространены в природе. Они живут на поверхности растений, в их ризосфере и при корневой зоне, в местах разложения растит. остатков, в молоке и молочных продуктах, входят в состав микрофлоры кишечника. Благодаря образованию больших количеств молочной кислоты, к которой сами они в значит. степени устойчивы, Молочнокислые бактерии могут быстро размножаться и вытеснять др. микроорганизмы.

С помощью молочнокислых бактерий получают квашеную капусту, силос, кисломолочные продукты и др. Молочнокислые бактерии используются в произве антибиотика низина, бактериоцинов, декстранов, молочной кислоты.

Необходимо отметить, что до 60 % всего микробного состава кефира составляют мезофильные молочнокислые стрептококки, из которых можно выделить кислотообразователи – *Streptococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* и ароматобразующие виды – *Lactococcus lactis* и др. Ароматобразующие стрептококки обогащают молочные продукты ароматическими веществами (эфирь, диацетил) и большим количеством летучих кислот (уксусная и пропионовая). В готовом продукте их количество доходит до  $10^9$  КОЕ в 1 см<sup>3</sup>.

При этом при более высокой температуре (40-45°C, максимальная 45-50°C) лучше развиваются и сбраживают лактозу термофильные стрептококки (*Streptococcus thermophilus*). Их клетки образуют цепочки разной длины (Лаптев и др., 2009).

Исторически МКБ бактерии, относятся к родам *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Bifodobacterium*, причем *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bifodobacterium* формируют ядро этой группы, а в последнее время к ним были добавлены такие рода как: *Oenococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus* (Lahtinen et al., 2012; Стоянова, 2017). Род *Lactobacillus* по морфологии характеризуются большим

разнообразием – от коротких коккообразных до длинных нитевидных палочек от 0,7-1,1 до 3,0-8,0 мкм, расположенных единично или собранные в цепочки. Часто длина определяется средой выращивания. Использование биохимического метода идентификации при работе со смешанной популяцией микроорганизмов ограничено еще и тем, что после посева пробы жидкой культуры на плотную питательную среду, для установления соотношения бактерий двух разных видов необходимо выделить чистую культуру и исследовать все колонии, выросшие на поверхности среды, что существенно увеличивает экономические и трудовые затраты. Актуальным вопросом является поиск более эффективного метода для решения поставленной задачи. Молекулярно-генетические методы идентификации зарекомендовали себя как надежные и независимые от внешних факторов.

Для идентификации лактобацилл классические микробиологические методы (по культуральным признакам, морфологии, окраске по Граму, подвижности, наличию каталазы и спектру сбраживаемых углеводов) дополняют молекулярно-генетическими методами на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, используя программное обеспечение MegAlign 6.00 DNASTAR Inc в 2009 г. Однако высокая стабильность нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК не позволяет однозначно идентифицировать близкородственные виды. Среди лактобацилл встречаются многочисленные виды и подвиды филогенетически близких групп *L. casei*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. acidophilus*, трудно поддающихся точной дифференциации, что приводит к поиску новых генетических маркеров. Для

использования анализа нуклеотидной последовательности видовой идентификации рекомендовано идентифицировать маркерные гены, анализ которых позволяет оценить связанность всего генома между микроорганизмами (Blaiotta et al., 2008). Анализ *groEL*, *rplB* и *rpoB* генов позволил выявить высокую полиморфность нуклеотидных последовательностей данных генов у представителей филогенетической группы *L. casei* и достоверно идентифицировать фенотипические и генетически близкие виды этой группы лактобацилл (Shvetsov et al., 2011). При этом дискриминационная способность данных генов в несколько раз превышает 16S рНК гена. Нуклеотидные последовательности были анализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqScape 2.6 (Apply de Biosystems).

По данным некоторых исследователей в кефирных зернах периферийная часть состоит почти исключительно из бактерий, преимущественно *Bacillus*, тогда как внутренняя часть зерна содержит дрожжи, а поверхность раздела внутренней и внешней частей имеет смешанный состав, где обнаружены бактерии с длинными полисахаридными нитями, дрожжи и грибы (Lin et al., 1999; Lopitz-Otsoa et al., 2006).

К важным дифференцирующим признакам дрожжей относится их способность окислять и сбраживать различные углеводы в том числе мальтозу, сахарозу, галактозу, трегалозу и другие. Дрожжи способны расти в довольно широком диапазоне рН от 3 до 9, при этом предпочитают кислые среды (рН 4,5-5,5). Дрожжи относятся к осмофильным микроорганизмам, некоторые из

них способны выдерживать концентрацию сахаров до 55%, соли до 8%. По способности к ассимиляции лактозы нескольких десятков штаммов дрожжей разных таксономических групп предложено разделить их по отношению к лактозе на три группы:

I - использующие лактозу и способные вызывать ее брожение;

II - использующие лактозу путем прямого окисления;

III - не использующие лактозу.

Для сравнения микробного профиля кефирных зерен наряду с классическими методами выделения чистых культур используют метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE). Данный метод признан наиболее информативным при сравнении микробных сообществ, поскольку он позволяет изучать микробный профиль без выделения чистых культур. При использовании метода DGGE также не было выявлено принципиальных различий микробного профиля между исследованными образцами кефирных зерен (Mayoa et al., 2012). Доминирующими по степени четкости выраженных полосок являлись 7 видов микроорганизмов. Отмечены некоторые различия среди наиболее малочисленных групп микроорганизмов, образующих трудноразличимые полосы. Таким образом, в результате проведенной работы не было выявлено различий в микробных профилях кефирных зерен, используемых на разных молочных производствах России. Об этом свидетельствуют результаты исследований, проводимых как «с выделением чистых культур» и их последующей идентификации с помощью 16S рРНК анализа, так и метода денатурирующего градиентного гель

электрофореза (DGGE) «без выделения чистых культур» (Magalhães et al., 2011; Shevtsov et al., 2011).

Комбинация всех вышеуказанных фенотипических и генотипических характеристики привела к возникновению нового полифазного метода дифференциации.

### **1.7. Взаимодействие между микроорганизмами кефирных зёрен**

Сложные взаимодействия между дрожжами и бактериями и их взаимозависимость в зернах кефира до конца не изучены. Однако, когда бактерии отделены от зерна, дрожжи растут не так эффективно (Cheirsilp et al., 2003; Farnworth and Mainville, 2008; Rattray and O'Connel, 2011).

Благодаря своей высокой способности метаболизировать лактозу (Rea et al., 1996), род *Lactococcus* имеет тенденцию расти быстрее, чем дрожжи в молоке (Rea et al., 1996; Tamime, 2006). Этот род гидролизует лактозу, производя молочную кислоту и создавая подходящую среду для роста дрожжей (Tamime, 2006). Более того, дрожжи синтезируют комплекс витаминов группы В и гидролизуют молочные белки, используя кислород для получения CO<sub>2</sub> и этанола (Lopitz-Otsoa et al., 2006; Tamime, 2006). Взаимодействие между дрожжами и молочнокислыми бактериями может стимулироваться или ингибироваться ростом одного или обоих микроорганизмов в совместных культурах. Эти микроорганизмы могут конкурировать за питательные вещества для роста, или могут производить метаболиты, которые ингибируют или стимулируют друг друга (Lopitz-Otsoa

et al., 2006). Некоторые виды дрожжей являются протеолитическими или липолитическими, обеспечивая аминокислоты и жирные кислоты (Ratray and O'Connell, 2011). Такие виды, как *Debaryomyces hansenii* и *Yarrowia lipolytica*, усваивают молочную кислоту, образуемую LAB, повышая pH и стимулируя рост бактерий. Производство витамина B бактериями *Acetobacter* spp. также способствует росту других микроорганизмов, присутствующих в зернах кефира (Lopitz-Otsoa et al., 2006; Rea et al., 1996).

Полученные данные показали, что молочнокислые бактерии физиологической группы, активно использующие лактозу для молочнокислого брожения, вероятно, являются основными продуцентами системы, установленной в кефирных зернах. Микроорганизмы, относящиеся к другой группе, используют продукты метаболизма лактозы (глюкозу и галактозу); отношения между членами этой группы могут быть либо пассивным антагонизмом, либо кооперации. Изучение динамики молочнокислого брожения в ходе развития культуры показало, что химические превращения в среде менялись в ходе этого процесса. При сбраживании углеводов ясно можно различить две фазы. В первый период (логарифмическая фаза роста бактерий) идет интенсивный синтез белков и других веществ клетки, которые являются более восстановленными, чем углеводы. В среде накапливалось больше окисленных продуктов метаболизма. Вторая фаза характеризовалась более медленными темпами биосинтеза и постепенным снижением окислительно-восстановительного потенциала культуры, что приводило к ускоренному переносу протонов на ФГК с

последующим его восстановлением до молочной кислоты. Эти две фазы отражают перераспределение окислительно-восстановительных реакций в ходе биосинтеза структурных элементов бактериальных клеток (конструктивные процессы) и ферментации (энергетический процесс). Тесные симбиотические отношения молочнокислых бактерий и дрожжей, стимулирующее действие дрожжей на рост молочнокислых бактерий, показано многими исследователями (Motaghi et al., 1997; Стоянова и др., 2015).

Сложные взаимодействия между дрожжами и бактериями, а также их зависимость от микробного состава кефирных зёрен ещё не полностью изучены. Однако, когда бактерии отделяются от зерна, дрожжи не будут расти так эффективно (Cheirsilp et al., 2003; Farnworth и Mainville, 2008; Rattray и O'Connell, 2011). Взаимодействие между дрожжами и МКБ занимает центральное место в широком спектре ферментированных продуктов, в частности, в кефире (Han et al., 2018). Обе группы микроорганизмов естественным образом поддерживают друг друга различными способами.

#### 1. Усвоение молочной кислоты.

Один интересный механизм взаимодействия между дрожжами и МКБ осуществляется в присутствии ассимилирующих молочную кислоту дрожжей. Накопление молочной кислоты повреждает и убивает лактобактерии, даже когда рН культуры поддерживается добавлением щелочных растворов (Katakura et al., 2010). Однако молочная кислота может потребляться в качестве источника углерода дрожжами, не потребляющими лактозу, такими как *S. cerevisiae*, что приводит к повышению рН и длительному росту

лактобактерий. Физиологической особенностью МКБ является их кислотоустойчивость, как следствие характерного для них энергетического обмена. Кислотный стресс вызывает внутриклеточное подкисление, которое снижает активность цитоплазматических ферментов (Miyoshi et al., 2013). Транскриптомные и протеомные исследования показали, что многие МКБ повышают уровень активности гликолитических ферментов при кислотном, термическом и осмотическом стрессах, но без увеличения синтеза молочной кислоты. Хотя исследования, посвященные выяснению механизма образования диацетила, проводятся давно, единого мнения о том, как идет биосинтез этого соединения у молочнокислых бактерий до настоящего времени нет. Один из путей образования диацетила – синтез из L-ацетолактата как одного из промежуточных продуктов метаболизма цитрата. Это соединение нестабильное, выделяется бактериальными клетками в среду, где окислительно декарбоксилируется в диацетил и неокислительно в ацетоин. Другой путь – через конденсацию ацетальдегида-тиаминпирофосфата и ацетил-КоА не признан большинством исследователей, т.к. не выделены ферменты, катализирующие реакции. Ацетат выделяется во внешнюю среду, а оксалоацетат декарбоксилируется с образованием пирувата. Диацетил образуется в реакции ацетил-КоА с «активным ацетоальдегидом» (комплекс фермент – оксиэтилтиаминпирофосфат). При восстановлении диацетила ацетоиндегидрогеназой образуется ацетоин (рис. 4). Лактобациллы, такие как *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* и лактококки *L. lactis* модифицируют метаболизм пирувата за счет молочной

кислоты, и таким образом увеличивают синтез основных соединений, богатые энергией промежуточные продукты, такие как АТФ и НАД, ЭПС и/или гликоген. Уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которая отвечает за синтез молочной кислоты из пирувата, заметно снижается. Пируватоксидаза и фосфатацетилтрансфераза, используемые для синтеза ацетил-кофермента А, индуцируются у *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *L. rhamnosus* в условиях кислотного стресса. Ацетил-КоА перенаправляется на биосинтез жирных кислот, которые могут усиливать прочность и непроницаемость цитоплазматической мембраны (Leile et al., 2013).

## 2. Образование CO<sub>2</sub>/ удаление O<sub>2</sub>

Углекислый газ может обеспечить подходящую атмосферу (пониженное содержание кислорода и повышенное содержание CO<sub>2</sub>) для роста *Lactobacillus* spp. Несмотря на то, что отсутствуют исследования микроорганизмов, выделенных из кефира, исследования других сообществ и микроорганизмов, выделенных из пищи, подтверждают это взаимодействие. Углекислота, вырабатываемая дрожжами, способствует появлению резкого кислого и дрожжевого вкуса кефира (Karaçalı et al., 2018).

## 3. Обеспечение бактерий питательными веществами.

Трофические взаимодействия и обмен метаболитами (перекрестное питание) позволяют нескольким группам микроорганизмов выживать при ограниченных ресурсах. Было показано, что виды дрожжей служат бактериям, обеспечивая их витаминами, факторами роста и незаменимыми аминокислотами (Pahva et al., 2010; Ponomarova et al., 2017). Исследования

показали (Stadie et al., 2013), что *Zygotorulaspota florentina* выделяет незаменимые аминокислоты, которые поддерживают рост *L. nagelii*, когда они совместно культивируются, но не в том случае, если они культивируются как монокультура.

Для изучения деталей перекрестного питания метаболитами между *S. cerevisiae* и двумя группами МКБ (*Lactobacillus plantarum* или *Lactococcus lactis*) были проведены эксперименты, где в модельных системах с использованием комбинированных метаболических и генетических инструментов (Ропомагова et al., 2017). Было замечено, что избыток азота в среде культивирования способствует возникновению мутуализма (форма взаимопользовательного сожительства, когда присутствие партнёра становится обязательным условием существования каждого из них) дрожжей с *L. lactis*. Взаимовлияние между *L. lactis* и *S. cerevisiae* легко возникает, когда лактоза является основным источником углерода. Это еще раз подчеркивает тот факт, что состав питательной среды играет важную роль в формировании межвидовых взаимодействий.

Сложные взаимодействия между дрожжами и бактериями, а также их зависимость в кефирных зёрнах ещё не полностью изучены. Однако, когда бактерии отделяются от зерна, дрожжи не будут расти так эффективно (Rataruga et al., 2010). Взаимодействие между дрожжами и МКБ занимает центральное место в широком спектре ферментированных продуктов, в частности в кефире. Разные группы микроорганизмов естественным образом поддерживают друг друга различными способами (Aziza et al., 2012).

Для определения трофических взаимодействий между микробными компонентами представлены исследования физиологической активности выделенных изолятов из кефирных зерен (около 33 изолятов бактерий и 55 изолятов дрожжей). Выявлено присутствие двух физиологически групп молочнокислых бактерий по их способности синтезировать фермент  $\beta$ -галактозидазу, необходимой для сбраживания лактозы, и показано, что выделенные дрожжи не обладали  $\beta$ -галактозидазной активностью, не использовали лактозу, а активно использовали глюкозу и с низкой активностью - галактозу, не образовывали сгусток на молоке. Подход, основанный на оценке физиологической активности выделенных изолятов молочнокислых бактерий, позволяет утверждать, что продуцентом системы микробного сообщества являются молочнокислые бактерии, относящиеся к первой физиологической группе, обладающие  $\beta$ -галактозидазной активностью, использующие лактозу для молочнокислого брожения и быстро закисляющие систему. Присутствие в системе нескольких видов молочнокислых бактерий, обладающих  $\beta$ -галактозидазной активностью, говорит о том, что между бактериями этой группы должны существовать определенные регулирующие факторы развития: либо конкурентные взаимоотношения за субстрат, либо смена основного продуцента в зависимости от условий, в частности, изменение pH среды (Cheirsilp and Radchabut, 2011). Общая схема трофической цепи ассоциативной культуры кефирных зерен, в составе которых входят 3 группы МКБ: синтезирующие и не синтезирующие  $\beta$ -галактозидазу, с репрессивным

синтезом  $\beta$ -галактозидазы группа МКБ, а также уксуснокислые бактерии и дрожжи представлена на рис. 3.

В зависимости от среды и условий культивирования микробиота кефирных зерен и кефирной закваски проявляет уникальные способности к саморегуляции. Микробный симбиоз в кефирных зернах обеспечивает сохранение качества кефира и микробного профиля кефирных зерен в течение всего года с незначительными изменениями в соотношении основных микробных групп. Микробный состав кефира может отличаться от состава кефирных зерен из-за различий в рН и времени культивирования; эти различия

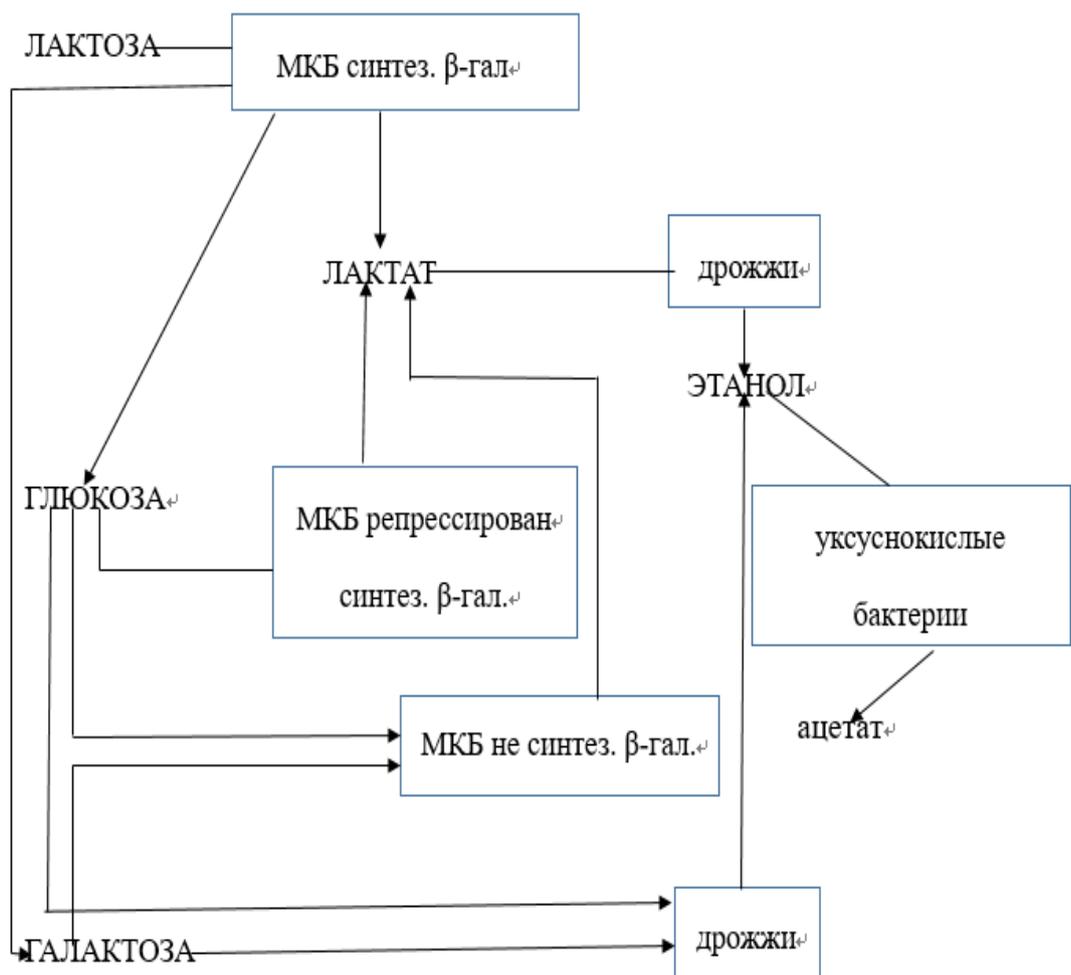


Рисунок 3. Общая схема трофической цепи ассоциативной культуры кефирных зерен, сбраживающих и не сбраживающие лактозу.

также могут быть связаны с расположением микроорганизмов внутри зерен. Так, молочнокислые бактерии рода *Lactococcus* находятся на поверхности кефирных зерен, легко десорбируются в культуральную жидкость и поэтому в кефире их достаточно много (Градова и др., 2014).

### **1.8. Производство и сохранение кефирных зёрен**

На производство кефира влияют несколько факторов, включая сырье, технологию производства, условия хранения кефира и используемых кефирных зерен, которые необходимо оптимизировать для достижения наилучшего качества продукта. Повышение температуры культивирования от 20 до 30 °С часто приводит к увеличению количества дрожжей (от  $7.1 \cdot 10^6$  до  $10^7$  КОЕ/г в кефирном зерне и от  $1.2 \cdot 10^5$  до  $1.7 \cdot 10^6$  КОЕ/мл в закваске), уксуснокислых бактерий (от  $10^5$  до  $10^7$  КОЕ/г в зерне и от  $4.2 \cdot 10^4$  до  $7.0 \cdot 10^6$  КОЕ/мл в закваски), и незначительно влияло на количество мезофильных молочнокислых бактерий в составе кефирных зернах (Schoevers, Britz, 2003; Хохлачева и др., 2006).

Однако более высокая температура ферментации 25 °С приводила к быстрому снижению значений рН, что ингибировало рост гомоферментативных и гетероферментативных молочнокислых стрептококков. В закваске, приготовленной при 25°С, большее количество молочнокислых палочек, чем в закваске, приготовленной при 18–20°С. В

результате исследований было обнаружено, что все штаммы, относящиеся к этому виду, могут активно развиваться в температурном интервале 20-30°C, а при 35°C культуры развивались очень слабо (Londero et al., 2012). Все штаммы образуют максимальную биомассу при 25°C. Уровень накопления биомассы в процессе ферментации при 25°C превышает накопление биомассы, образованную при 20°C, в 1.3-1.9 раз, а при 30°C – в 1.2-1.8 раза (Хамагаева и Ванданова, 2006).

При встряхивании (аэрировании) в процессе культивирования наблюдались увеличение продукции экзополисахаридов культурами кефирного грибка и существенные различия в качественном и количественном составе зерен. Так, при встряхивании снижалось количество дрожжей и молочнокислых бактерий в кефирных зернах, но при этом значительно увеличивалось содержание углеводов и жиров (Schoevers, Britz, 2003).

На основании скрининга полисахарид-синтезирующих молочнокислых бактерий показано, что из 119 исследованных изолятов 60% способны синтезировать экзополисахариды. Из них отобраны 9 изолятов, наиболее активно синтезирующих экзополисахариды. Отмечено повышение активности синтеза экзополисахаридов на среде с сахарозой молочнокислыми бактериями, способными ее сбраживать. Отобраны культуры *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* как наиболее активные продуценты экзополисахаридов при культивировании их на среде с лактозой и сахарозой. При сравнительном исследовании экзополисахаридов, синтезированных природными кефирными зернами и монокультурами, методами ИК-

спектроскопии и методом динамического и статистического светорассеивания показана аналогичность структуры ЭПС, но обнаружены различия физико-химических свойств полученных образцов экзополисахаридов с потенциальной пребиотической активностью.

Существует три основных способа производства кефира: кустарный процесс, коммерческий процесс по русскому методу и коммерческий процесс с использованием чистых культур (Farnworth, 2005; Otles and Cagindi, 2003; Rattray and O'Connell, 2011). Могут использоваться и другие субстраты, например, молоко других видов животных, кокосовое молоко, соевое молоко, фруктовые соки и/или растворы сахара и патоки (Magalhães et al., 2010a; Öner et al., 2010; Rattray and O'Connell, 2011).

Традиционное кустарное производство включает инокуляцию молока переменным количеством зерен и ферментацию в течение 18-24 часов при температуре 20-25 °С. По окончании процесса ферментации зерна просеиваются и могут быть использованы для новой ферментации или выдержаны (1-7 дней) в свежем молоке, а кефирный напиток хранится при 4 °С, готовый к употреблению (Beshkova et al., 2002; Farnworth and Mainville, 2008; Otles and Cagindi, 2003).

Начальная концентрация инокулята в зерне (пропорция зерно/молоко) влияет на рН, вязкость, конечную концентрацию лактозы и микробиологический профиль конечного продукта (Garrote et al., 1998; Simova et al., 2002). Агитация во время ферментации также влияет на микробный состав кефира, благоприятствуя развитию гомоферментативных лактококков

и дрожжей (Farnworth and Mainville, 2008; Rattray and O'Connel, 2011; Tamime, 2006). Инкубация при температуре выше 30 °С стимулирует рост термофильных LAB, в то время как является неблагоприятным фактором для роста дрожжей и мезофильных МКБ (Rattray and O'Connel, 2011).

Второй метод, известный как "русский метод", позволяет производить кефир в больших масштабах и использует процесс последовательной ферментации из перколята, полученного в результате первой ферментации зерен (ферментация без зерен или материнской культуры) (Farnworth and Mainville, 2008; Rattray and O'Connel, 2011).

Второй метод, известный как "русский метод", позволяет производить кефир в больших масштабах и использует процесс последовательной ферментации из перколята, полученного в результате первой ферментации зерен (ферментация без зерен или материнской культуры) (Farnworth and Mainville, 2008; Rattray and O'Connel, 2011).

В промышленном процессе производства кефира могут использоваться различные методы, но все они основаны на одном и том же принципе. Молоко инокулируется чистыми культурами, выделенными из кефирных зерен, и коммерческими культурами (Beshkova et al., 2002; Rattray and O'Connel, 2011; Tamime, 2006). Этап созревания может быть выполнен или нет, он заключается в выдерживании кефира при температуре 8-10 °С в течение 24 ч (Beshkova et al., 2002; Rattray and O'Connel, 2011), чтобы обеспечить рост микроорганизмов, в первую очередь дрожжей, способствующих специфическому аромату

продукта (Beshkova et al., 2002). Пропуск этого этапа связан с развитием нетипичного вкуса в кефире (Beshkova et al., 2002; Rattray and O'Connell, 2011).

Основным маркером для оценки симбиотических отношений между различными микроорганизмами является увеличение биомассы кефирного зерна во время ферментации. Ассоциативная микробная культура кефирных зерен является устойчивым, высокоорганизованным сообществом, обладающим сложными вертикальными и горизонтальными трофическими связями. Основными продуктами брожения углеводов молока при производстве кефира являются молочная кислота, этанол и CO<sub>2</sub>, которые придают этому напитку, кислотность и низкое содержание алкоголя. Также можно найти второстепенные компоненты, в том числе диацетил, ацетальдегид и аминокислоты, входящие в состав ароматизаторов (Rattray and O'Connell, 2011). Во время брожения зерна увеличиваются в размере и количестве, и обычно извлекаются из ферментированного молока и повторно используются. Если их сохранить, они могут сохранять свою активность в течение многих лет (Garrote et al., 2010). Высушенные зерна сохраняют свою активность в течение 12-18 месяцев, в то время как влажные зерна сохраняют активность в течение 8-10 дней. Были протестированы различные методы консервирования, при этом замораживание считается лучшим методом. Лиофилизация зерна также была протестирована, но привела к снижению метаболизма лактозы, а также изменениям бактериального профиля, который отличался от исходного профиля зерна (Farnworth et al., 2005). Кефир можно употреблять сразу после отделения зерна или хранить в холодильнике для

последующего употребления (Ogles et al., 2003). Характеристики ферментированного молока должны сохраняться во время хранения; однако, поскольку может происходить непрерывная метаболическая активность остаточной микробиоты кефира, состав охлажденного кефира может быть изменен во время хранения (Gronnevik et al., 2011). Сообщается, что при хранении в холодильнике при температуре 4°C вязкость со временем резко снижается (Magra et al., 2012), в то время как общий жир, лактоза, сухое вещество и рН остаются постоянными до 14 дней хранения (Vieira et al., 2015), а количество молочной кислоты незначительно увеличивается после 7 дней хранения. Хотя липолитическая активность молочного жира кефирных зерен не высока, но при ферментации могут образовываться свободные жирные кислоты (Kim et al., 2002).

Аэрация при культивировании кефирного зерна в молоке способствовала увеличению продукции экзополисахаридов и вызывала существенные различия в качественном и количественном составе зерен. Так, при встряхивании снижалось количество дрожжей и молочнокислых бактерий в кефирных зернах, но при этом значительно увеличивалось содержание углеводов и жиров.

Кефирные зерна представляют собой сложный симбиоз нескольких видов микроорганизмов: молочнокислых стрептококков и лактобактерий, уксуснокислых бактерий и дрожжей. Эти зерна можно использовать для ежедневного приготовления кефира в домашних условиях. В настоящее время популярность кефирных зерен среди населения неуклонно растет. Масса

кефирных зерен увеличивается за счет роста микроорганизмов и биосинтеза компонентов зерна - белков и полисахаридов. Микробиота кефирного зерна может рассматриваться как биопленка. Процессы, регулирующие образование биопленки, включают формирование поверхности для прикрепления клеток, межклеточные взаимодействия и рост сложной культуры. Сообщалось об образовании биопленки некоторыми видами, и был описан ряд генов, гипотетически ответственных за адгезию или образование биопленки. Образование биопленки помогает клеткам выживать в условиях стресса окружающей среды, например, при высоких концентрациях кислоты и этанола.

Кефирная живая составляющая представляет собой сложную смесь бактерий и грибов. Сухие кефирные грибки фасуют порциями по 10, 20, 50, 100 г в пакеты из полиэтилена и запаивают. Срок хранения кефирных грибов 3 месяца при температуре не выше 8 °С. Сухие кефирные грибки содержат не более 4.5 % влаги. Продолжительность сквашивания молока при соотношении кефирного грибка и молока 1:40 и температуре 18-22°С для натуральных грибов составляет 16-18 ч.

К основным недостаткам при производстве кефира можно отнести неприятный вкус и аромат, характерный для дрожжей (Tamime, 2006). Последнее может быть вызвано быстрым ростом *S. cerevisiae*, сопровождающимся типичным уксусным ароматом (Tamime, 2006). Избыточное производство уксусной кислоты также может влиять на аромат кефира и происходит из-за интенсивного роста *Acetobacter* spp. или

присутствия *Dekkera* spp. в зернах. Горький вкус может быть вызван грибами (например, *Geotrichum candidum*) (Pahwa et al., 2010) и/или активностью некоторых нетипичных дрожжей, которые могут присутствовать в продукте (Tamime, 2006).

### 1.9. Пробиотические показатели кефира

Кефир потреблялся на протяжении веков, и из-за его доступности и потенциала для улучшения состояния здоровья многие потребители включают его в свой образ жизни в качестве ферментированного напитка, который может содержать живые микроорганизмы. Кефир содержит легкоусвояемые белки, которые легко усваиваются организмом. Незаменимые минорные кислоты, в избытке содержащиеся в кефире, регулируют белковый, углеводный и липидный обмен и оказывают положительное влияние на регуляцию массы тела, поддержание иммунного ответа и энергетического баланса. Пептиды проявляют антиоксидантную и антимикробную активность в молочном кефире, полученном в результате протеолиза  $\beta$ -казеина, было обнаружено 236 пептидов, которые проявляли антимикробные, антиоксидантные, ингибирующие ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), иммуномодулирующие и антитромботические эффекты (Hamet et al., 2013; Ebner et al., 2015). Пептид F3 был очищен от тибетского кефира и проявлял антибактериальные свойства в отношении кишечной палочки и золотистого стафилококка (Miao et al., 2016). Идентифицировано 35 пептидов из кефира, приготовленного из коровьего молока, которые проявляли

антигипертензивный эффект, опосредованный ингибированием активности АПФ (Amorim et al., 2019).

Кефир богат аминокислотами, так как серин, треонин, аланин, лизин, валин, изолейцин, метионин, фенилаланин и триптофан, которые играют важную роль в центральной нервной системе, содержит легкоусвояемые белки, метаболиты, которые способствуют перевариванию казеина и усвоению его организмом (Bensmira et al., 2015). Незаменимые минорные кислоты, в избытке содержащиеся в кефире, также регулируют белковый, глюкозный и липидный обмен и оказывают положительное влияние на регуляцию массы тела, поддержание иммунного ответа и энергетического баланса (Олескин и др., 2020).

Известно, пробиотические культуры кефира могут активировать иммунную систему для подавления вирусных инфекций. Противовирусный механизм кефира включает продукцию макрофагов, усиленный фагоцитоз с положительной дифференциацией CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> как биомаркер ответа на лечение, иммуноглобулинов (IgG<sup>+</sup> и IgA<sup>+</sup>), В-клеток, Т-клеток, нейтрофилов, определенная часть которых при необходимости способны вырабатывать антитела. Молочнокислые бактерии из кефира повышают цитотоксичность натуральных клеток-киллеров по отношению к опухолевым клеткам (Yamane et al., 2018). Кефир может действовать как противовоспалительное средство за счет снижения экспрессии интерлейкинов IL-1 и IL-6, синтезируемых макрофагами и Т-клетками и стимулирующих иммунный ответ, а интерфероны IFN- $\alpha$  и II типа (IFN- $\gamma$ ) индуцируют антивирусную защиту.

Под влиянием чужеродных антигенов вырабатывается повышенное количество цитокинов — медиаторов воспалительного процесса, выполняющих регуляторные функции, которые в свою очередь продуцируют повышенное образование IL-6, активацию Т-лимфоцитов и других иммунных клеток и их миграцию, приводящее к развитию признаков "цитокинового шторма" при коронавирусной инфекции. Поэтому кефир может быть важным ингибитором "цитокиновой бури", способствующей развитию COVID-19 (Nakagaki et al., 2018; Voyoglu-Barnum et al., 2019; Bornstein et al., 2020).

По результатам клинических исследований можно сделать вывод, что пробиотики оказывают положительное действие на физиологические функции и общее состояние человека (Meier, Steuerwald, 2005). Пробиотики способствуют заселению толстого кишечника организмами естественной микробиоты, которые приживаясь, начинают расти и размножаться, не позволяя тем самым активизироваться патогенным и условно-патогенным бактериям, вирусам и дрожжам. Данным способом происходит лечение дисбактериоза, а также профилактика рецидива дисбактериоза после антибиотикотерапии. Благодаря внесению в организм препаратов с высоким содержанием пробиотических микроорганизмов развитие вредных микроорганизмов подавляется и происходит постепенное восстановление нормальной работы кишечника восстановление баланса между бактериями нормальной микробиоты и организмами, вызывающими различные заболевания. К примеру, развитие бактерии *Helicobacter pylori*, которая провоцирует развитие язвенной болезни и хронического гастрита, подавляется

при помощи пробиотиков (De Vuyst, Leroy, 2007). Результатом употребления пробиотиков является улучшение пищеварения, нормализация моторной функции кишечника, устранение вздутия живота и т.д.

В здоровом кишечнике бактерии желудочно-кишечного тракта помогают расщеплять некоторые трудноперевариваемые компоненты пищи и усваивать сложные углеводы (например, крахмал и пищевые волокна), продуцируя витамины, биотин, ниацин, фолиевую кислоту и другие полезные вещества. Расщепление солей жирных кислот бактериями пробиотиков приводит к понижению уровня холестерина в крови.

Кроме всего вышесказанного, восстановление микробиоты при помощи пробиотиков стимулирует и улучшает функцию местного иммунитета кишечника. Иммунным клеткам практически невозможно распознать среди большого количества микроорганизмов кишечной микробиоты хороших и плохих бактерий. В кишечнике эту функцию выполняет кишечная лимфоидная ткань (Penner et al., 2005).

В связи с ухудшением эпидемиологической обстановки в мире увеличился спрос на продукты и безопасные препараты, полезные для здоровья. Традиционные кисломолочные продукты смешанного молочнокислого и спиртового брожения, включая кефир, с древних времен зарекомендовали себя как средство для борьбы с инфекциями и преждевременной старостью. Сбраживание молока с целью получения кефира - это процесс общего метаболизма симбиотических культур микроорганизмов, способствующих формированию и стабильности

микробиологии кефирных зерен. Матричные компоненты кефирных зёрен в основном состоят из внеклеточных полисахаридов и белков. Исследования показали, что он обладает хорошей вязкостью, эластичностью и пластичностью, обладает определенным антибактериальным и защитным действием и имеет широкие перспективы применения в пищевой промышленности. Исследования показали, что кефиры обладают множеством активных функций, таких как гиполипидемическое, иммуномодулирующее, бактериостатическое, антиоксидантное, защитное действие на желудочно-кишечный тракт и т.д. Но существует меньше сообщений о его механизме действия и основе активных веществ, которые могут быть использованы в качестве цели последующих исследований. Последующее исследование противораковой активности, включая анализ и очистку противораковых веществ, соответствие между активными веществами и бактериями, их продуцирующими, а также испытания на животных или клинические испытания.

## 1.10. Заключение

В связи с ухудшением эпидемиологической обстановки в мире увеличился спрос на продукты и безопасные препараты, полезные для здоровья. Кисломолочные продукты с пробиотическим потенциалом, включая кефир, благотворно влияют на функционирование органов и тканей всего организма человека, его микробиом, а также иммунную и эндокринную систему. С древних времен они зарекомендовали себя как средство для борьбы с инфекциями и преждевременной старостью. Благодаря постоянному развитию современных молекулярных технологий, таких как метагеномика, высокопроизводительные технологии секвенирования, становится возможным более глубокий анализ сложного микробного сообщества кефирных зёрен. Сбраживание молока с целью получения кефира - это процесс общего метаболизма симбиотических культур микроорганизмов, способствующих формированию и стабильности микроэкологии кефирных зерен.

Из анализа литературных данных следует, что, несмотря на некоторые различия в количественном соотношении, в кефирном зерне практически всегда присутствуют четыре группы микроорганизмов: молочнокислые бактерии, лактококки, уксуснокислые бактерии и дрожжи. Каково синергическое или антагонистическое влияние этих микроорганизмов друг на друга в процессе метаболизма смешанной культуры? Возможно ли определить один или несколько индикаторных микроорганизмов или индикаторных метаболитов для количественной оценки и анализа состояния ферментации

кефирных бактерий? Ответы на эти вопросы не только обеспечат теоретическую основу для исследования кефирных сообществ, но и могут быть использованы в качестве руководства для исследования других микробных консорциумов. Противоречивые данные, использованные при разработке концептуальной модели, в том числе результаты исследования микробного состава и трофических взаимодействий между компонентами сложившегося консорциума кефирного зерна, необходимые для построения новых сообществ и разработки подходов к контролю стабильности кефирного зерна, которые могут быть использованы для создания новых функциональных пищевых продуктов и лекарственных препаратов с благотворным влиянием на здоровье человека.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты и методы исследования

Для проведения исследований использовали лиофилизированные культуры кефирных зерен OS (Осетия), T2-3 (Тибет), N1, N4, N5, N6, N7 (Московский регион) из Коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. При идентификации выделенных лактобацилл и оценке их пробиотических показателей использовали для сравнения пробиотическую культуру *Lactobacillus plantarum* CM MSU 588 (из Коллекции микроорганизмов Московского государственного университета) (табл. 3).

Таблица 3.

#### Образцы кефирных зерен, отобранных для исследований

Регион получения кефирного зерна	Шифр культуры
Московский регион	N1, N4, N5, N6, N7
Осетия	OS
Тибет	T 2–3

## 2.2. Нарращивание биомассы кефирных зёрен

Увеличение биомассы кефирных зёрен измеряли в течение 14 дней культивирования в стерильном молоке с ежедневными пересевами. Все операции, связанные с культивированием кефирных зёрен, проводят, соблюдая особую чистоту. Посуду и инвентарь, соприкасающиеся с кефирными зёрнами, тщательно протирали спиртом. Кефирные зерна культивировали путем последовательного высева зерен в увеличивающихся объемах молока для поддержания концентрации 10%. (ГОСТ 31454-2012). Пророщивание зерен производили в молоке, так как рост зерен замедляется, если их промывать водой после каждого просеивания. Кефирные зерна отделяли от кисломолочного продукта путем фильтрации с помощью пластикового сита. Кефирные зерна промывали дистиллированной водой при комнатной температуре и оставляли сушиться на стерильной фильтровальной бумаге при комнатной температуре ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), после чего кефирные зерна взвешивали с использованием аналитических весов для гравиметрического определения. После взвешивания кефирные зерна использовали в качестве нового посева, сохраняя соотношение кефирные КЗ и молока. Скорость роста биомассы определяли гравиметрически и рассчитывали процент прироста.

При нарушении условий культивирования кефирных зерен в их составе могут оказаться посторонние микроорганизмы, например бактерии группы кишечной палочки, *Oidium lactis* – гриб из порядка гифомицетов из группы несовершенных грибов, который вызывает спиртовое брожение и снижает этим качество кисломолочных продуктов, а также *Mycoderma* – плёнчатые

дрожжи, которые, развиваясь на поверхности кефира при доступе воздуха, разлагают спирт, превращая его в уксусную кислоту, придающую кефиру острый вкус, что снижает его органолептические свойства.

Поэтому за микробиологической чистотой кефирного зерна необходимо тщательно следить и не допускать его заражения посторонними микроорганизмами.

### **2.3. Определение спектра антимикробного действия кефиров, приготовленных на основе кефирных зерен из разных территориальных зон**

Антимикробную активность кефиров, приготовленных на основе кефирных зерен из разных территориальных зон определяли методом диффузии в агар с измерением зоны подавления роста тест-культур в мм с дальнейшим пересчетом уровня активности по стандартным растворам коммерческих препаратов антибиотиков (Егоров, 2004).

При изучении спектра ингибирующего действия в качестве тест-культур использовали представители разных групп бактерий: из грамположительных бактерий использовали *Staphylococcus aureus* 144; из грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* 52, а также штаммы микроскопических грибов: *Aspergillus niger* 369 и дрожжи *Candida albicans* INA 00763. Штаммы получены из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Бактерии *E. coli*, *S. aureus* выращивали на мясо-пептонном агаре (МПА).

Микроскопические грибы выращивали на среде Сабуро (в г/л): глюкоза- 40,0; пептон - 10,0; агар-агар -20,0; левомецетин -10 мкг/мл. Таблетки левомецетина производства «Ирбитского химико-фармацевтического завода» г. Ирбит по 0,5 г растворяли в стерильном буфере с рН 5,5 и добавляли в среду культивирования грибов.

Бациллы, стафилококки культивировали при 37°C, *E. coli* - при 42°C, , микроскопические грибы и дрожжи - при 28°C.

Экстракцию антибиотика из культуральной жидкости проводили смесью ацетон: уксусная кислота: вода (4:1:5) при 55 °С в течение 90 мин. Экстракты разводили фосфатным буфером (рН 5,5) в соотношении 1:10 и вносили в лунки. Количественное определение антибиотической активности проводили по измерению зон подавления роста тест-культур с дальнейшим пересчетом по калибровочной кривой. Фосфатный буфер с рН 5,5 для титрования антибиотика готовили на дистиллированной воде, в 1 л которой растворяли 6,64 г калия фосфорнокислого однозамещенного и 0,142 г калия фосфорнокислого двузамещенного трех водного. Буфер стерилизовали при 1 ати 20 мин. Тест-культуры с оптической плотностью ОП 0,7 при 540 нм и толщине кюветы 0,5см ( $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл) заседали в среду для тестов.

В качестве стандарта на грамположительные бактерии использовали коммерческий препарат низина «*Nisaplin*» (фирма “Aplin & Barrett, Ltd”, Великобритания) с активностью  $1 \times 10^6$  МЕ/г; на грамотрицательные бактерии— левомецетин, с активностью 100 мкг/мл (ЗАО «Биофарм Право-Альфа», Россия); на грибы и дрожжи— нистатин (ОАО «Биосинтез» с

активностью 100000 ед./г). Для титрования использовали суспензию кефиров разного срока созревания

По зоне задержки роста судили об ингибиторной способности штаммов по отношению к разным группам микроорганизмов.

Планшеты заливали диффузионной средой для титрования с индикаторным микроорганизмом и пробивали лунки ( $d=6$  мм). В лунки вносили  $100\pm 20$  мкл полученных растворов проб и разведений стандарта – коммерческого препарата низина «Nisaplin» (фирма «Aplin & Barrett, Ltd», Великобритания). После 24 часов инкубации измеряли диаметр зон задержки роста тест-культуры и рассчитывали концентрацию антибиотика.

#### **2.4. Микроскопическое изучение микробиоты кефирного зерна**

Для определения морфологических свойств готовили фиксированные препараты чистых культур. Для этого на обезжиренное предметное стекло наносили каплю отобранного материала, а если препарат готовили из колоний, выросших на чашке Петри, на стекло микробиологической петлей исследуемый материал вносили в каплю дистиллированной воды. Затем препарат высушивали и фиксировали клетки над пламенем горелки. На фиксированные клетки нанесли фуксин и выдерживали 2 мин, затем промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Микроскопию проводят с иммерсией на микроскопе Микромед 1 (вар.2-20) фирмы Микромед-1 с объективом 100x и окуляром 10x.

Зарисовывали/и фотографировали полученные результаты для дрожжей и МКБ.

## **2.5. Электронно-микроскопическое изучение кефирных зёрен**

Брали несколько гранул кефирных зёрен, промывали их стерильной водой и помещали в 2,5%-ный глутаровый альдегид для фиксации (при 4°C в течение 24 ч). Фиксированные образцы трижды промывали 0,1 М PBS (К-фосфатный буфер, 15 мин), а затем по очереди обезвоживали этанолом 30%、50%、70%、90% и 100%, по 15 минут каждый раз. Затем препарат закрепляли 1% раствором OsO<sub>4</sub> при 4°C в течение 1 часа, затем повторили описанную выше операцию очистки с PBS и вновь обезвоживали этанолом от 70% по очереди 80%、90% и до 100%. (по 10 мин). Затем использовали безводный этанол и промывали три раза. Затем образец дважды обрабатывали изоамилперацетатом (по 15 мин) и, наконец, высушивали. Высушенный образец прикрепляли к держателю образца двусторонней клейкой лентой, и образец наблюдали с помощью сканирующего электронного микроскопа, после нанесения покрытия золотым распылителем в сканирующем электронном микроскопе (HITACHI SU-8010, рис. 4)



## **2.6. Культивирование кефирных зерен в лабораторных аэробных и анаэробных условиях**

Для оживления и восстановления их физиолого-биохимической активности лиофилизированные кефирные зерна (0,1 г) помещали в 20 мл стерильного обезжиренного молока (содержание жира не более 1.5 %) и культивировали в пробирках Фалькон на 50 мл при комнатной температуре (21 °С) при постоянных пересевах в течение месяца.

Еженедельно производили замену молока – содержимое пробирок выливали в стерильное сито и промывали стерильной дистиллированной водой, промытые кефирные зерна снова помещали в пробирки и заливали стерильным свежим молоком.

Для определения скорости роста (времени генерации) кефирных зерен каждые двое суток (за это время молоко почти полностью ферментируется микроорганизмами кефирного зерна в кефир) промывали кефирные зерна дистиллированной водой и стерильным пинцетом переносили на стерильную

фильтровальную бумагу, убирая таким образом излишки влаги, затем переносили кефирное зерно на сухую фильтровальную бумагу и производили взвешивание (с учетом веса фильтровальной бумаги).

Для оживления и восстановления их физиолого-биохимической активности лиофилизированные кефирные зерна (0,1 г) помещали в 20 мл стерильного обезжиренного молока (содержание жира не более 1.5 %) и культивировали в пробирках Фалькон на 50 мл при комнатной температуре (21 °C) при постоянных пересевах в течение месяца.

Еженедельно производили замену молока – содержимое пробирок выливали в стерильное сито и промывали стерильной дистиллированной водой, промытые кефирные зерна снова помещали в пробирки и заливали стерильным свежим молоком.

Для определения скорости роста (времени генерации) кефирных зерен каждые двое суток (за это время молоко почти полностью ферментируется микроорганизмами кефирного зерна в кефир) промывали кефирные зерна дистиллированной водой и стерильным пинцетом переносили на стерильную фильтровальную бумагу, убирая таким образом излишки влаги, затем переносили кефирное зерно на сухую фильтровальную бумагу и производили взвешивание (с учетом веса фильтровальной бумаги).

## **2.7. Выделение чистых культур из микробиоты кефирных зерен из разных территориальных зон**

Для выделения микроорганизмов из биоты кефирных зерен готовили молочный 2% агар. Подготавливали молоко – центрифугировали при 1,500g в течение 20 мин в центрифужных пробирках, удаляли образовавшийся на поверхности жир. К 100 мл обезжиренного молока добавляли 2 г агара, расплавляли в микроволновке (молоко не должно закипеть в микроволновке). Стерилизовали при 0,5 атм.

Для выделения чистой культуры на плотную среду методом Коха делают высев из накопительной культуры. Принцип метода заключается в получении чистой культуры из изолированной колонии, которую считают потомством одной клетки.

С целью получения изолированных колоний в стерильном физиологическом растворе готовили десятикратные разведения накопительной культуры, после чего стерильной пипеткой наносили одну каплю соответствующего разведения этой культуры ( $10^{-3}$  или  $10^{-4}$ ) на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри (гидролизованное молоко с 1.5% агара или сусло-агара). Материал осторожно размазывают стерильным стеклянным шпателем по всей поверхности среды. Разведение готовили с таким расчетом, чтобы в одной чашке выросло не более 20-30 колоний. Затем этим же шпателем во второй чашке протирают поверхность плотной среды. Засеянные чашки выдерживали в термостате при температуре

30±1°C в течение 2-3 сут. после чего рассматривают и анализируют выросшие колонии.

Внешний вид и строение колоний являются важными культуральными признаками при определении вида микроорганизмов, так как каждому виду присуща типичная форма колонии. Колонии изучают невооруженным глазом в проходящем и отраженном свете и под микроскопом при малом увеличении (8х). В проходящем свете колонии рассматривают со стороны дна чашки. Отмечают величину колоний (точечные - менее 1 мм, мелкие - 1-2 мм, средние - 2-4 мм, крупные - от 4-5 мм и более), их форму (правильная, круглая, неправильная, плоская, сферическая) и прозрачность. В отраженном свете, рассматривая колонию со стороны крышки, определяют цвет, характер поверхности (гладкая, бугристая, блестящая, матовая), профиль колонии (выпуклый, плоский, вдавленный).

Для выделения лактобактерий, выросших в анаэробных условиях, готовили анаэробный бульон MRS (HiMedia Laboratories, Индия). Для этого растворяли среду MRS из расчета 55 г/л в дистиллированной воде, разливали в пенициллиновые флаконы по 10 мл, закрывали флаконы резиновыми крышками и алюминиевыми колпачками, дегазировали в течение 30 мин и заполняли газовую фазу флаконов аргоном. Флаконы стерилизовали при 0,5 атм в течение 15 мин.

Агаризованные среды MRS готовили следующим образом. Навеску сухой среды MRS с агаром (HiMedia Laboratories, Индия) растворяли в дистиллированной воде из расчета 67.2 г/л, разливали по флаконам, закрывали

герметичными крышками, дегазировали, как описано выше и расплавляли агар в микроволновке. Среды с агаром стерилизовали при 0,5 ати в течение 15 мин.

Для выделения дрожжей готовили 5% сусло–агар. В первой колбе к 50 мл дистиллированной воды добавляли 2 г агара (двойной концентрации – 4%), плавил агар в микроволновке, затем стерилизовали при 1 ати. Во второй колбе растворяли 15 г сусла (двойной концентрации – 10%) в 150 мл дистиллированной воды, стерилизовали при 0,5 ати. После стерилизации заново плавил агар (при необходимости) и смешивали с суслом. Стерилизация проводилась отдельно, т.к. при автоклавировании среда с суслом становилась кислой ( $\text{pH} \approx 5$ ), а при данном  $\text{pH}$  агар гидролизуеться.

## **2.8. Определение гидрофобности культур, выделенных из кефирных зерен**

Гидрофобность культур, выделенных из кефирных зерен, была определена в соответствии с методом микробной адгезии к углеводородам (MATH – microbial adhesion to hydrocarbons), как описано у Vinderola, Reinheimer (2003), с помощью гексадекана в качестве растворителя. Работать с гексадеканом нужно строго в перчатках и респираторе.

Бактерии выращивали в жидкой среде MRS в течение 24 ч при 37°C. Важно оценить первоначальный рост, так как от него зависит степень разведения. Рост должен быть не менее 1,5 ед. о.п. в 3-мл среды MRS. Далее, выращенную культуру дважды отмывают в 60 мМ калий-фосфатном буфере ( $\text{pH} 6.5$ ) при 2,000g в течение 10 минут в специальных центрифужных стаканах на 20 мл или в пластмассовых пробирках с крышкой на 15 мл.

Начальную оптическую плотность измеряли на ФЭКе при длине волны 560 нм ( $A_0$ ) и доводили её до 0,9-1,1 единиц оптической плотности в 3 мл буфера. К полученным пробам добавляют 600 мкл гексадекана. Флакончики с резиновыми пробками интенсивно встряхивают в течение 2 минут и выдерживали в течение 1 ч при 37°C, чтобы произошло разделение фаз. Нижнюю водную фазу осторожно отбирают с помощью стерильного шприца и измеряют при 560 нм ( $A_1$ ).

Гидрофобность клеточной поверхности выделенных культур по проценту (%)  $\Gamma$  рассчитывают с использованием следующей формулы:

$$\Gamma \% = \left( 1 - \frac{A_0}{A_1} \right) \times 100 \%$$

## **2.9. Определение способности к образованию биопленок культур, выделенных из кефирных зерен**

Посев культуры осуществляется заранее во флаконы с тефлоновыми кубиками 3x3x3 мм (культивирование происходит именно в них). Важно не забывать ставить холостой контроль: флакончик с MRS и блочками без культуры МКБ. Бактериальные штаммы инкубировали в жидкой среде MRS при 37°C в течение 24 ч в химически чистых флакончиках на 12 мл с 20 химически чистыми тефлоновыми кубиками. Затем планктонную культуру аккуратно удаляли и 2 раза аккуратно промывают блочки водой. Отмытые биопленки фиксировали с помощью 96% этанола: на 15 мин 3 мл. После фиксации отмывают от спирта и удаляют излишки воды. Далее - окрашивание 1% раствором кристаллического фиолетового (КФ, 3 мл) в течение 15 мин.

Промывали 3 раза водой, пока вода не становится бесцветной. Экстрагировали с помощью 96% этанола не менее 30 минут. Измеряли оптическую плотность при  $\lambda=590$  нм,  $l=1$  см, контроль – стерильный MRS бульон + кубики без клеток + все процедуры (Klimko et al., 2019).

Для окраски бактерий по методу Грама приготовленный на предметном стекле мазок высушивали на воздухе и фиксировали над пламенем горелки. На мазок наливали раствор основного красителя - кристаллического фиолетового - на 1-2 мин. Сливали остаток краски и наливали раствор Люголя до почернения препарата (обычно на 1 - 2 мин.). Затем сливали раствор Люголя, и в течение 20-30 с. препарат обрабатывали этиловым спиртом, тщательно промывали водой, докрашивали водно-спиртовым раствором фуксина в течение 2 мин. Окрашенный мазок высушивали и микроскопировали.

## **2.10. Высокпроизводительное секвенирование микробиоты**

### **кефирных зёрен**

#### **2.10.1. Высокпроизводительное секвенирование гена 16S рРНК с**

##### **бактериальными праймерами**

Технология секвенирования Illumina работает следующим образом. ДНК разрезается с помощью ультразвука, к ней легируются адаптеры, проводится гель-электрофорез, и потом на ячейку с множеством отверстий добавляются нуклеотиды (которые намечены разными флуоресцентными красками).

Проводится репликация, при этом микроскоп все время фиксирует изменения цвета комплекующих и фрагментов.

16S рРНК- один из трёх основных типов рРНК, образующих основу рибосом прокариот, находятся в их малой (30S) субъединице. Константа седиментации равна 16S (единиц Сведберга); константы двух других молекул равны 5 и 23S. Длина 16S рРНК - около 1500 нуклеотидов. Секвенирование гена 16S рРНК является быстрым и точным методом идентификации бактериальных и архейных изолятов, однако оно неприменимо для нескольких родов и обеспечивает только разрешение до уровня рода (Shevtsov et al., 2011).

Немногие исследования, проведенные в 1980-х годах, показали, что филогенетическое сравнение с использованием консервативной области генома было более стабильным для получения фенотипических признаков и других связанных признаков (Ciccarelli et al., 2006; Staley, 2006; Sayers et al., 2009).

ДНК из образцов была выделена с использованием набора Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) в соответствии с инструкцией производителя. Коллекции ампликонов 16S рРНК были получены методом ПЦР с универсальными праймерами к V4 участку по ранее описанной методике (Fadrosh et al., 2014). Были использованы следующие праймеры: 515F (5' GTGBCAGCMGCCGCGGTAA 3'; Hugerth et al., 2014) и Pro-mod-805R (5'- GACTACNVGGGTMTCTAATCC 3'; Merkel et al., 2019). Секвенирование проводили на приборе MiSeq system (Illumina, USA) с использованием набора реагентов, считывающих 150 нуклеотидов с каждого конца.

Демультиплексирование, последующая обработка и анализ полученных сиквенсов были проведены с использованием соответствующих скриптов QIIME 2 программного обеспечения ver. 2019.1 (Bolyen et al., 2019). Таблица OTU была составлена в программе SILVAngs (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>).

### **2.10.2. Высокопроизводительное секвенирование дрожжей**

Область ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК была амплифицирована из ДНК выделенных дрожжей с использованием набора праймеров для ПЦР ITS1F и ITS1R (Willger et al., 2014). После амплификации полученные участки очищали магнитными шариками AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.) и подготавливали к секвенированию с помощью набора Nextera XT DNA в соответствии с инструкциями производителя (Illumina, США).

После каналов UPARSE сиквенсы были собраны, отфильтрованы и дереплицированы (Edgar, 2013). Операционные таксономические единицы (OTUs) были объединены в группы с идентичностью последовательности  $\geq 97\%$ , из которых были удалены химеры. Таксономическая идентичность была присвоена с использованием BLASTn и справочной базы данных Fittings v. 1-2 (Dannemiller et al., 2014). Таксономия и операционные таксономические единицы были преобразованы в таблицу с помощью программы biom-format V1.3.1 (Caporaso et al., 2010).

Невозможность объективного определения структуры сообщества кефирных зерен на основании выделения чистых культур показана многими авторами, изучающими ассоциативные культуры.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Данные представлены как «среднее  $\pm$  стандартное отклонение» по результатам из трех независимых культивирований. Для оценки значимости различий использовали t-критерий Стьюдента. Анализируемые выборки происходили из генеральной совокупности, имеющей нормальное распределение в соответствии с W-критерием Шапиро-Уилка,  $P > 0,05$  (Statistica v. 10.0).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ<sup>1</sup>

### 3.1. Морфологические характеристики кефирных зёрен

Кефирные зерна были получены из частных домохозяйств в Осетии, Тибетском регионе Китая и Московском регионе. Кефирные зерна можно

---

<sup>1</sup>Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. **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. Серия 16: Биология. 2022. Т. 77. № 4. С. 266–272. DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-266-272 IF (РИНЦ) - 0,630. [**Ding F.**, Krasilnikova A.A., Leontieva M.R., Stoyanova L.G., Netrusov A.I. Analysis of kefir grains from different regions of the planet using high-throughput sequencing // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2022. V. 77. № 4. P. 286-291. DOI: 10.3103/S0096392522040010. IF (SJR) - 0.189]. Вклад автора в печатных листах: (0.38/0.22) (Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).

2. **Дин Ф.**, Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Микробиом и метабиотические свойства кефирных зёрен и кефиров на их основе // Микробиология. 2022. Т. 91. № 4. С. 391-409. doi: 10.31857/S0026365622100214. IF (РИНЦ) - 1,550. [**Ding F.**, Stoyanova L.G., Netrusov A.I. Microbiome and metabiotic properties of kefir grains and kefirs based on them // Microbiology. V. 91, № 4, с. 339-355. DOI:10.1134/S0026261722100885. IF (WoS): 0.26; IF (SJR) - 0.341]. (1.19/0.62)

3. **Дин Ф.**, Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Микробиомы кефирных зёрен из регионов исторического происхождения и их пробиотический потенциал // Антибиотики и химиотерапия. Т. 67. №. 7-8. С. 4-7. DOI: 10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-4-7. IF (РИНЦ) - 0,528. (0.30/0.16)

4. **Дин Ф.**, Красильникова А.А., Нетрусов А.И., Стоянова Л.Г. Первичная идентификация микробиома кефирных зерен из разных территориальных зон // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2022. Т. 42. № 2. С. 160-169. DOI: 10.36871/vet.san.hyг.ecol.202202003. IF (РИНЦ) - 0,577. (0.63/0.34)

описать как студенистые белые или слегка желтые массы с эластичной консистенцией и размером от 1.2 до 2.5 см в диаметре (рис. 5).

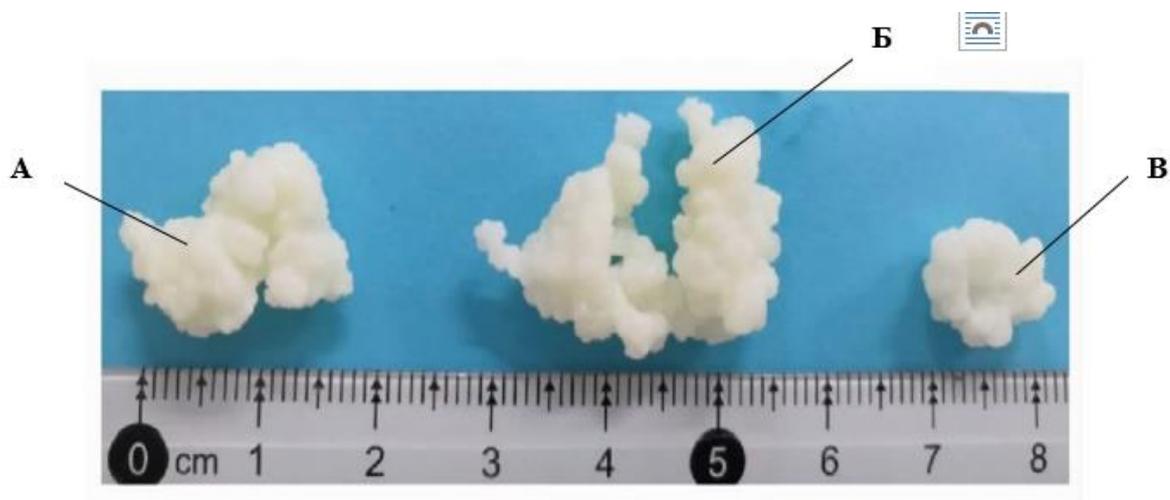


Рисунок 5. Вид кефирных зёрен из разных регионов:  
А - Осетии; Б - Тибета; В – Московского

Кефирные зерна представляют собой компактные образования неправильной формы со складчатой или бугристой поверхностью с упругой консистенцией, по форме и цвету напоминающие цветную капусту. Их размер варьируется от нескольких миллиметров до 2-4 см.

Изучение кефирных зерен в микроскопе показало, что поверхности зерен кефира были гладкими, бугристыми и имели желатиновое матричное вещество, которое покрывало скопления клеток сверху в виде тонкой полисахаридной пленки.

С помощью электронно-микроскопических исследований установлено пространственное расположение микробов в структуре кефирных зерен (рис. 6, 7, 8, 9). Согласно данным электронной микроскопии микробиота КЗ представлена дрожжевыми клетками лимonoобразной и вытянутой формы,

которые находятся в тесном соседстве с кокками и короткими и длинными палочками. Видны крупные (7-8 мкм) клетки дрожжей со шрамами от отделившихся почек и тесно прилегающие к ним клетки МКБ (1-3 мкм в длину). Видны только клетки МКБ (1-4 мкм в длину).

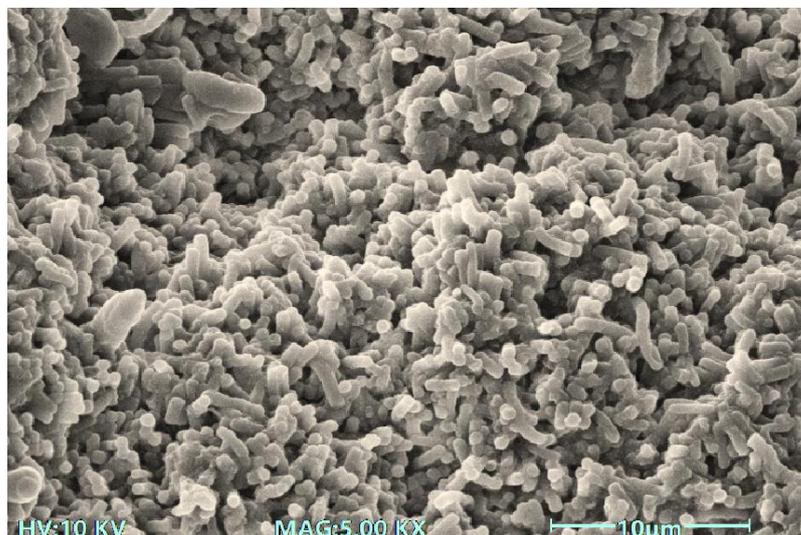


Рисунок 6. Вид кефирного зерна, выделенного из кефира (Тибет) в сканирующей электронной микроскопии (НИТАСНІ SU-8010).

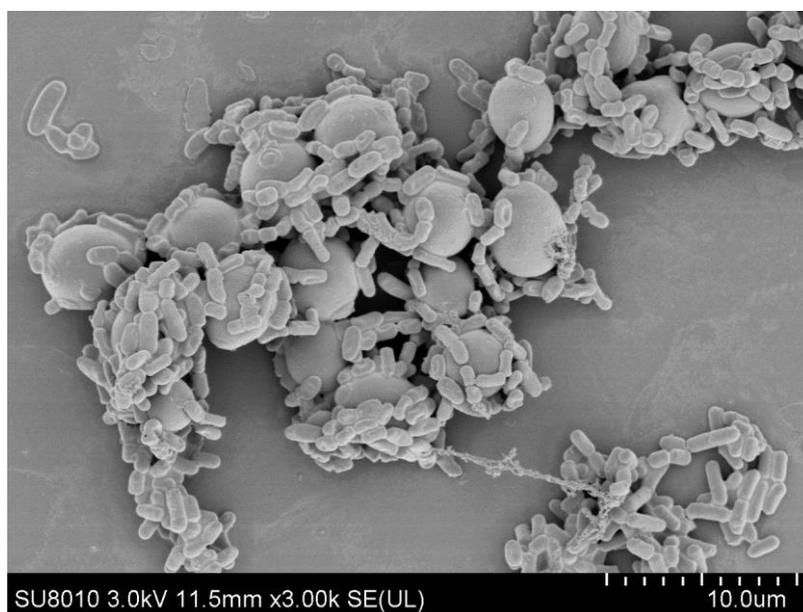


Рисунок 7. Вид поверхности кефирного зерна (при 10 µm), выделенного из кефира (Тибет) в сканирующей электронной микроскопии (НИТАСНІ SU-8010)

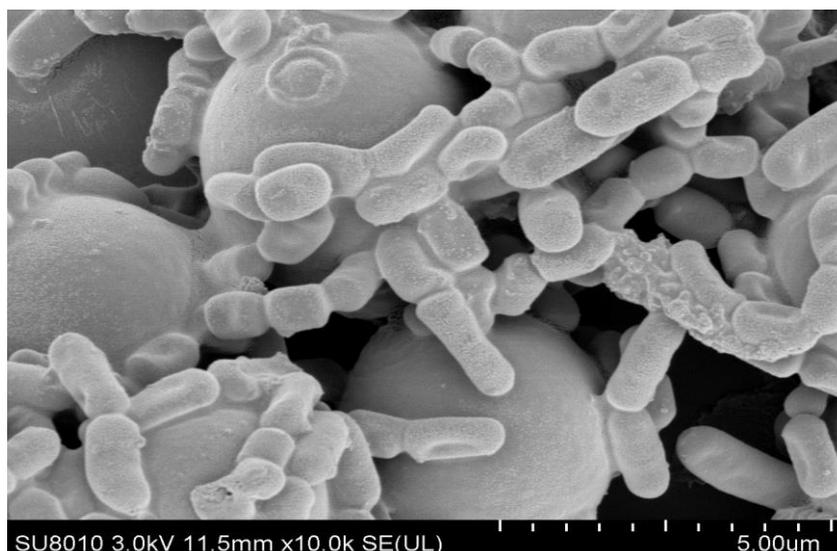


Рисунок 8. Вид поверхности кефирного зерна (при 5  $\mu\text{m}$ ), выделенного из кефира (Тибет) в сканирующей электронной микроскопии (HITACHI SU-8010)

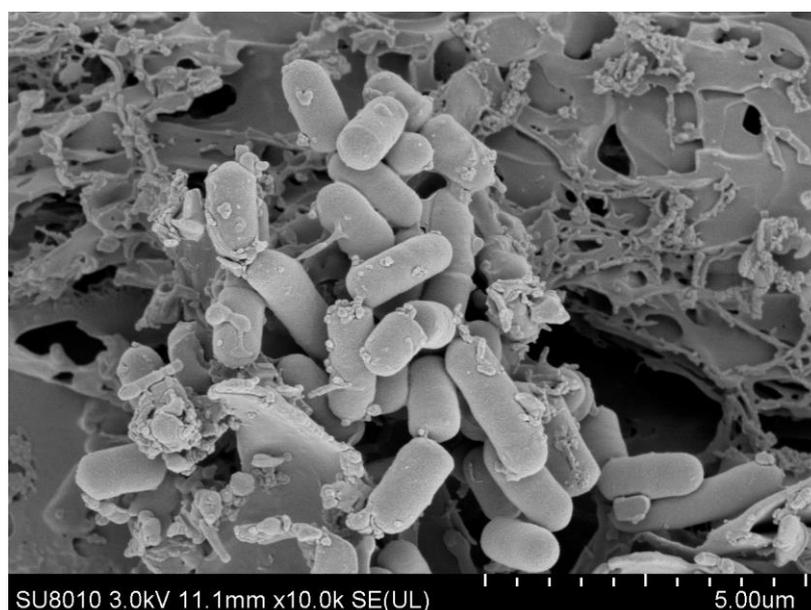


Рисунок 9. Вид середины кефирного зерна, выделенного из кефира (Тибет), в сканирующей электронной микроскопии (HITACHI SU-8010).

Согласно данным электронной микроскопии микробиота кефирных зерен представлена дрожжевыми клетками лимонобразной и вытянутой формы, которые находятся в тесном соседстве с кокками и короткими и длинными палочками (рис. 7 и 8). Короткие палочки, предположительно *Lactobacillus*

*kefir*, расположены ближе к поверхности грибка, а длинные и изогнутые тонкие палочки, такие как *Lactobacillus kefiranofaciens*, по всему объему грибка и концентрация их увеличивается к центру. Кокки преимущественно располагаются на поверхности дрожжевых клеток, в то время как палочки находятся в пространстве между дрожжевыми клетками. Дрожжи концентрируются как в центре кефирного грибка, так и по поверхности. По-видимому, распределение микроорганизмов на поверхности и внутри зерен зависит от их отношения к кислороду, а также связано с различиями значений рН. Внутри зерен очень низкое значение рН, которое ингибирует рост лактококков.

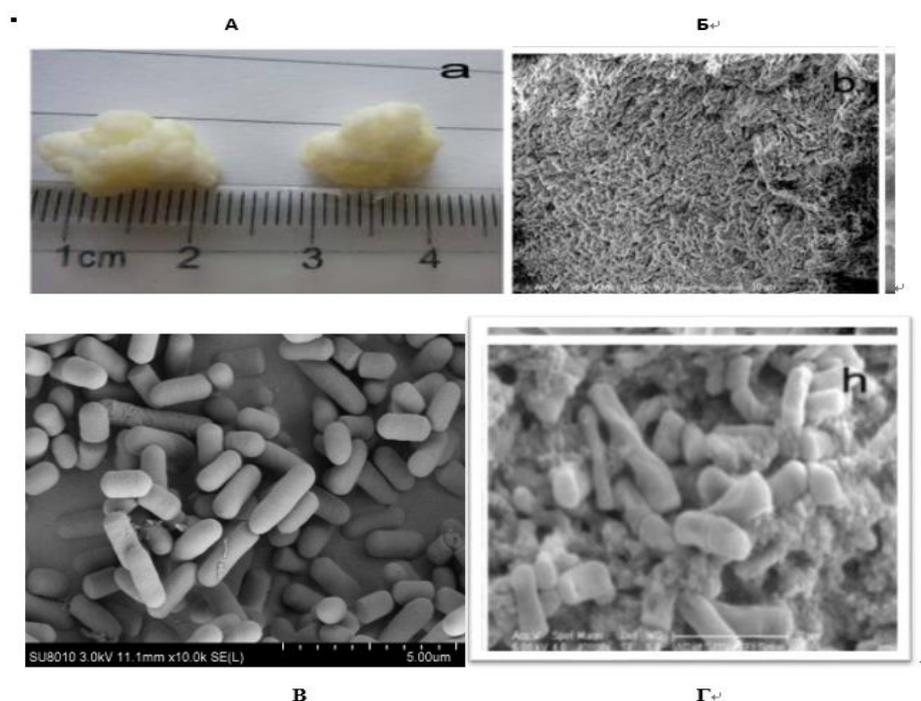


Рисунок 10. Микрофотографии кефирных зерен из Тибета: А – внешний вид, Б - поверхность кефирного зерна в сканирующем электронном микроскопе (увеличение  $\times 5\ 000$ ), В - внутренняя часть кефирного зерна (увеличение  $\times 40\ 000$ ); Г - внешняя поверхность кефирного зерна (увеличение  $\times 40\ 000$ ).

Невооруженным глазом внешняя поверхность зерен Тибетского кефира выглядела гладкой и блестящей. Тем не менее, поверхности зерен в СЭМ при увеличении  $\times 5000$  оказались очень неровными. Во внутренней части зерна наблюдали разнообразные лактобациллы (длинные и изогнутые), дрожжи и фибриллярный материал. Кефирные зерна имели губчатую фибриллярную структуру, которая была разветвленной и взаимосвязанной. Фибриллярный материал постепенно увеличивался по направлению к внутренним частям зерна. На внутренних частях зерна было множество лактобацилл (длинных и изогнутых) с небольшим количеством дрожжей, внедренных в фибриллярный материал.

Микрофотографии показали четкое пространственное распределение микроорганизмов в зернах. Так, дрожжи в зерне располагаются близко к его поверхности, что отражает их облигатную зависимость от молекулярного кислорода, а в середине зерна обнаружены только бактерии, не нуждающиеся в кислороде для своей жизнедеятельности. Пространственная локализация дрожжей и бактерий в кефирных зернах подтверждает их различное отношение к молекулярному кислороду. При этом дрожжи тяготеют к внешним слоям кефирных зёрен, тогда как молочнокислые бактерии стараются занимать внутренние их области, где концентрация кислорода в значительной степени снижена вследствие высокой дыхательной активности поверхностных дрожжей.

Структура кефирных зерен из разных регионов была сходной.

### 3.2. Динамика роста кефирных зерен

Изначально для определения скорости роста кефирных зерен гравиметрическим методом были взяты фрагменты зерен приблизительно одинаковой массы: OS, Тибет 2-3, N5, N6. За время проведения эксперимента были получены числовые значения массы кефирных зерен и зависимость роста зерен от времени (таблица 4).

Активная кислотность — водородный показатель (рН) свежего молока, концентрацию водородных ионов. Кислотность молока обусловлена содержанием органических кислот: фосфорной и лимонной и их кислых солей, а также белков, которые определяют кислотность свежесцеженного молока (16 – 18Т). При хранении кислотность молока возрастает вследствие образования молочной кислоты при молочнокислом брожении.

В наших исследованиях общая кислотность 15,99—20,99° Т, что соответствует активной кислотности рН =6.8. В процессе сбраживания (ферментации) молока кефирными зернами рН снижается до 3.45 (образец КЗ из Тибета) или 3.4 ( образцы Московской области), что соответствует общей титруемой кислотности 102 -94-Т.

Наши результаты показали, что после 12 дней выращивания в молоке биомассы КЗ увеличилась на 61% (OS), 56% (Т2-3), 65% (N5) и 64% (N6) по сравнению с исходным весом. То есть после 12 дней последовательной ферментации биомассы зерен увеличились более чем на 60% по сравнению с начальной массой.

Таблица 4.

Прирост биомассы кефирных зерен, отобранных из разных регионов, при пересевах в течение 12 суток ( $p \leq 0,05$ )

Шифр образцов	Длительность инкубирования кефирных зерен при пересевах, сут.				Прирост массы, %:
	1	4	8	12	12 сут
	биомасса, г				
OS, Осетия	10.62 ±0,05	12.43 ±0,05	14.96 ±0,11	17.09 ±0,06	61,2 ±0,21
T2-3, Тибет	10.58 ±0,06	12.32 ±0,12	14.65 ±0,31	16.58 ±0,08	56.0 ±0,16
N5, Москва	10.65 ±0,035	12.58 ±0,1	15.28 ±0,1	17.58 ±0,11	65.3 ±0,17
N6, Москва	10.54 ±0,075	12.17± 0,09	14.37 ±0,21	17.32 ±0,01	64.7 ±0,22

Кефир, полученный из КЗ из разных территориальных зон, соответствовал требованиям стандарта (ГОСТ 31454-2012) по органолептическим и физико-химическим показателям: молочно-белый цвет, консистенция однородная по всей длине сгустка с небольшим газообразованием, вкус кисломолочный с незначительным запахом дрожжей, активная кислотность рН была в пределах 3,4-4,2, общая титруемая кислотность не превышала 124°Т. Количество

молочнокислых бактерий в кефирах, изготовленных на всех образцах КЗ, было не менее  $10^7$  КОЕ/г, а дрожжей - не менее  $10^4$  КОЕ/г.

### **3.3. Антимикробного спектра действия кефиров на основе кефирных зерён из разных территориальных зон**

Важным критерием отбора штаммов является спектр их антимикробного действия. Изучение антимикробного спектра действия кефиров на основе кефирных зерён из разных территориальных зон показало, что кефиры ингибируют разные группы бактерий: как грамположительные (на примере *Staphylococcus aureus*), так и грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli*), что характерно для МКБ. Ингибирование роста микроскопических грибов является неизвестным биологическим свойством для *L. lactis subsp. lactis*. И имеет место и штаммовая специфичность лактококков по синтезу бактериоцинов. Представленные данные можно рассматривать не только как пример реакции биологической системы на неблагоприятные факторы внешней среды, но и как системы взаимоотношений дрожжей и лактококков в природных экосистемах. Уровень активности рассчитывали по стандартной кривой с учетом разведений стандартных антибиотиков, специфичных для каждой группы микробов (табл. 5).

Антимикробная активность на *S. aureus* (Грам+) максимальна у КЗ из Московской области (превышает на 30% ингибиторную активность КЗ из Осетии), а на *E. coli* в Осетинских и Тибетских образцах (активность рассчитана по левомицетину). Эти же образцы проявляли и высокую

антимикотическую активность в отношении дрожжей *Candida albicans*, возбудителя микозов, опасных для здоровья.

Таблица 5.

Антимикробный спектр действия кефиров, приготовленных на основе кефирных зерен из разных территориальных зон, в динамике культивирования.

Тест-культуры	Образцы	Время культивирования в обороте						Стандарт
		24 часа		48 часов		72 часа		
		д, мм	А	д, мм	А	д, мм	А	
<i>Staphylococcus aureus</i> 144	1	14	107	15	110	16	122	Nisaplin, МЕ/мл
	2	13	105	16	122	17	175	
	3	12	98	13	105	15	110	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	14	32	18	54	20	62	Левомецетн, ед/мл
	2	16	45	20	62	22	89	
	3	15	38	19	57	21	72	
<i>Aspergillus niger</i> INA 00760	1	12	52	13	58	15	108	Нистатин, ед/мл
	2	14	80	16	126	17	138	
	3	15	108	15	108	16	126	
<i>Candida albicans</i> INA 00763	1	12	58	13	92	16	134	Нистатин, ед/мл
	2	15	122	16	134	17	160	

Примечание: 1. КЗ из Осетии; 2- КЗ из Москвы; 3 - КЗ из Тибета; д,мм— диаметр зоны подавления роста тест-культуры; А— Ингибиторная активность соответствующий концентрации антибиотика по калибровочной кривой; МЕ/мл – активность по Nisaplin; ед/мл - активность по левомецетину, нистатину

Китайские исследователи (Miao et al., 2016) из тибетского кефира выделили бактериоцин пептидной природы, который проявлял антибактериальные свойства в отношении кишечной палочки и золотистого стафилококка, что подтверждено и нашими данными. Фунгицидная активность является редким свойством для МКБ. Однако она было

зафиксирована во всех образцах кефиров. Причем активность в отношении аспергиллов и дрожжей проявлялась больше в стационарной фазе (после 48 часов культивирования) и была также максимальной в образцах кефира, приготовленного из кефирных зерен Тибета.

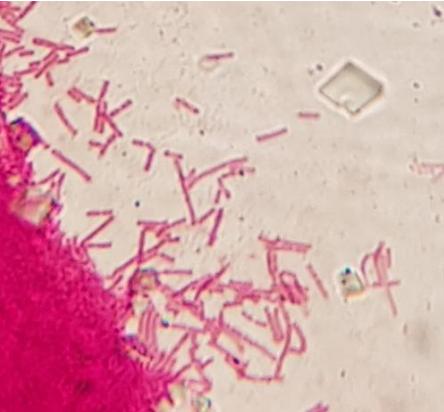
Изучение антимикробного спектра действия кефиров, полученных из КЗ разных регионов позволило выявить наиболее активные КЗ, производящие кефиры с максимальным эффектом подавления роста оппортунистических патогенов, а самое главное – грибов (дрожжей) из рода *Candida*. Это достижение позволит заложить основы профилактического и лечебного применения кефиров для лечения кандидозов человека.

#### **3.4.Выделение чистых культур молочнокислых бактерий**

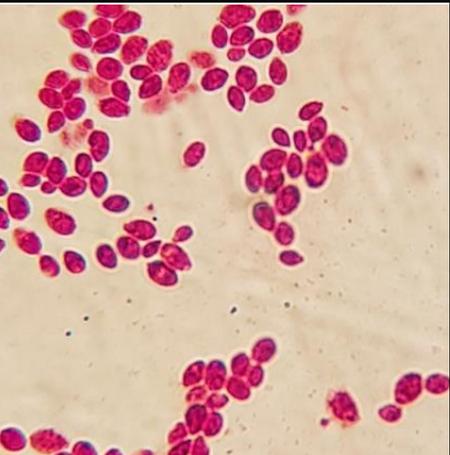
Из кефирных зерен OS, T2-3 и N5 анаэробно были выделены культуры с наилучшим ростом 1Б, 2Б, 3Б, 4Б, 5Б, 6Б и 7Б. Штамм лактобацилл *L. plantarum* CM MSU 588 был исследован ранее на кафедре микробиологии (Klimko et al., 2019). В предыдущих исследованиях он показал высокий пробиотический потенциал, поэтому в данной работе его использовали для сравнения полученных результатов. Морфологические свойства выделенных чистых культур представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Морфологические свойства выделенных чистых культур из кефирных зерен

Шифр культуры	Описание	Внешний вид клеток (×1000)
1Б	<p>Выделены из кефирного зерна OS; мелкие слизистые опалесцирующие колонии.</p> <p>Размер клеток (длина) 3-10 мкм.</p>	
2Б	<p>Выделены из кефирного зерна N5; Мелкие слизистые прозрачные колонии; проводят гетероферментативное молочнокислое брожение (выдел. CO<sub>2</sub> в анаэр. усл.).</p> <p>Размер клеток ≈ 5 мкм.</p>	
3Б	<p>Выделены из кефирного зерна T2-3; Средние слизистые опалесцирующие колонии.</p> <p>Размер клеток ≈ 5 мкм.</p>	

4Б	<p>Выделены из кефирного зерна N5; Большие слизистые колонии; проводят гетероферментативное молочнокислое брожение (выдел. CO<sub>2</sub> в анаэр. усл.).</p> <p>Размер клеток ≈ 3 мкм.</p>	
7Б	<p>Выделены из кефирного зерна N5; Мелкие слизистые прозрачные колонии.</p> <p>Размер клеток ≈ 3 мкм.</p>	
<p><i>L. plantarum</i> CM MSU 588</p>	<p>Размер клеток ≈ 2 мкм; белые непрозрачные колонии, Ø 1-3мм.</p> <p>Проводят гомоферментативное молочнокислое брожение.</p>	
5Б	<p>Выделены из кефирного зерна OS; крупные слизистые непрозрачные колонии.</p> <p>Размер клеток ≈ 5 мкм</p>	

6Б	Выделены из кефирного зерна N5; крупные слизистые непрозрачные колонии. Размер клеток $\approx 5$ мкм	
----	--	---

После микроскопирования стало известно, что большинство из выделенных культур – палочки, похожие на лактобациллы. А культуры 5Б и 6Б (выделенных культур из Москвы) и выглядят более круглыми, похожими на дрожжи. Исходя из того, что выделенные бактерии относятся к МКБ, можно сделать вывод об их метаболизме (гомоферментативном или гетероферментативном молочнокислом брожении) по выделению углекислого газа.

### **3.4. Молекулярная идентификация выделенных чистых культур микроорганизмов**

После проведения высокопроизводительного секвенирования гена, кодирующего синтез 16S рРНК, с бактериальными праймерами и с праймерами на ген ITS1 рРНК дрожжей, были определены следующие таксоны для выделенных из КЗ дрожжей и бактерий (табл. 7).

Все выделенные культуры являются типичными представителями микробиоты КЗ, иногда насчитывающей до 50 различных видов бактерий, относящихся к родам *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactocaseibacillus*,

*Sporolactobacillus* и др., и дрожжей из родов *Kluveromyces*, *Kazachstania*, *Saccharomyces*, *Pichia* и др. Следует отметить при этом, что вид дрожжей *Galactomyces candidus* очень редко встречается в описаниях выделенных из КЗ дрожжевых культур.

Таблица 7.

Идентификация выделенных чистых культур бактерий и дрожжей из некоторых кефирных зерен

Лабораторный шифр культуры	Результаты идентификации (род, вид)	Источник выделения (номер КЗ)
<b>Бактерии</b>		
1б	<i>Lactobacillus kefir</i>	OS (Осетия)
2б	<i>Lactobacillus kefir</i>	N5 (Москва)
3б	<i>Lactobacillus casei</i>	T2 -3 (Тибет)
4б	<i>Lactobacillus kefir</i>	N5 (Москва)
<b>Дрожжи</b>		
N1	<i>Pichia fermentans</i>	N1 (Москва)
N4	<i>Pichia fermentans</i>	N1 (Москва)
N5	<i>Pichia fermentans</i>	N5 (Москва)
N6	<i>Pichia fermentans</i>	N6 (Москва)
N7	<i>Pichia fermentans</i>	N7 (Москва)
T-2-3	<i>Yarrowia lipolytica</i>	T 2-3 (Тибет)
OS	<i>Galactomyces candidus</i>	OS (Осетия)

Выделенные из всех исследуемых образцов кефирного зерна лактобактерии на агаровой МРС среде представляли собой мелкие слизистые

опалесцирующие колонии. Размер клеток от 3 мкм до 5 мкм. По типу сбраживания углеводов были гетероферментативными молочнокислыми бактериями, выделяли CO<sub>2</sub> в анаэробных условиях. Лактобацилла была идентифицирована как *Lactobacillus kefir*, которая продуцирует молочную кислоту, уксусную кислоту, этанол и углекислый газ, и, как сообщалось в исследованиях *in vivo* и *in vitro*, обладает пробиотическими свойствами, такими как адгезия к слизи, была извлечена из тонкого кишечника и толстой кишки. Штамм *Lactocaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 588 был исследован ранее (Klimko et al., 2019). Культура *Lacticaseibacillus rhamnosus* (ранее значилась как *Lactobacillus rhamnosus*) — бактерия, которая первоначально считалась подвидом *L. casei*, но генетические исследования показали, что это отдельный вид *L. casei*, в которую также входят *L. paracasei* и *L. zeae*. Это короткая грамположительная гомоферментативная факультативная анаэробная неспорообразующая палочка, часто образующая цепочки. Некоторые штаммы бактерий *L. rhamnosus* используются в качестве пробиотиков и особенно полезны при лечении инфекций, поэтому в данной работе его использовали для сравнения полученных результатов.

### **3.5. Сравнение ростовых характеристик выделенных молочнокислых бактерий**

Клетки выделенных чистых культур МКБ по-разному растут в среде MRS, о чем свидетельствуют показатели ОП в стационарной фазе развития культур (табл. 8). Рост выделенных из кефирных зерен чистых культур

лактобацилл в аэробных и анаэробных условиях в течение 72 ч инкубирования в среде МРС ( $p \leq 0,05$ ).

Исходя из полученных данных, коллекционная культура *Lactocaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 588, взятая как контрольная, показала наилучший рост как в аэробных, так и в анаэробных условиях, ее можно отнести к статусу факультативно - анаэробной.

Таблица 8.

Накопление биомассы кефирных зёрен в анаэробных и аэробных условиях

Шифр культуры	Анаэробно		Аэробно	
	0 ч	72 ч	0 ч	72 ч
2б (выделены из КЗ OS)	0,02	0,59	0,05	0,06
5б (выделены из КЗ Москвы)	0,01	0,23	0,05	0,30
6б (выделены из КЗ Москвы)	0,01	1,82	0,04	0,14
штамм <i>Lactobacillus plantarum</i> СМ MSU 588	0,01	1.66	0.05	1.22

Выделенные культуры не накапливали большей биомассы, чем взятый для сравнения уже изученный пробиотический штамм *Lactobacillus rhamnosus* СМ MSU 588.

Аэрация при культивировании кефирного зерна в молоке способствовала увеличению продукции экзополисахаридов и вызывала существенные различия в качественном и количественном составе зерен. Микробный состав

кефира может отличаться от микробного состава кефирных зерен из-за различий в условиях pH, времени культивирования, а также это различие может быть связано с местом нахождения микроорганизмов в зернах.

Изучение динамики роста культур МКБ было сделано с целью определения таких свойств культур, как скорость роста, способность к росту на выбранных средах, способность к росту аэробно/анаэробно. Также была определена длительность фаз роста: лаг-фазы, экспоненциальной фазы, стационарной фазы, фазы отмирания. Знание данных свойств было необходимо для разработки условий ферментации кефирных зерен для изготовления кефиров.

По результатам наших исследований (табл.7) из изученных КЗ, полученных из разных регионов, чаще всего выделяются представители дрожжевого состава *Pichia fermentans* (штаммы N1, N4, N5, N6, N7,), а также *Yarrowia lipolytica* (вид аскомицетовых дрожжевых грибов), относящийся к порядку *Saccharomycetales*, которые были выделены из Тибетских кефиров, что подтверждено работами китайских ученых (Jianzhong et al., 2009; Gao and Bo, 2017). Из образца кефирного зерна, полученного из Северной Осетии выделены дрожжи *Galactomyces candidus*, очень редко встречающийся в описаниях выделенных из КЗ дрожжевых культур.

Характеристика *G. candidus*: растет при 37 °С, что объясняет его выделение из образца КЗ из жаркого климата Осетии. По морфологии колонии плотные, плоские, беловато-серые, мицелий, воздушный, ветвистый; артроспоры прямоугольные, реже сферические; желатин не разжижает;

ассимилируют глюкозу, галактозы, сорбозу, ксилозу, глицерин и сукцината. Но отрицательная ассимиляция наблюдалась для инулина, сахарозы, раффинозы, мелибиозы, лактозы, трегалозы, мальтозы, метилглюкозида, целлобиозы, салицина, рамнозы, рибозы, глюконата, глюкозамина и ксилита. Являются сапрофитами в молоке, сыре, яйцах и других пищевых продуктах. Высеивается при хронических бронхитах, при инфекционных поражениях кожи и ЖКТ (желудочно-кишечного тракта).

### **3.7. Определение степени гидрофобности поверхностей выделенных культур молочнокислых бактерий**

Гидрофобность клеток оценивали по относительному распределению между водной фазой и фазой органического растворителя гексадекана. По результатам экспериментов только один штамм 2б, выделенный из КЗ кустарного производства в Москве (образец 5) продемонстрировал высокие показатели гидрофобности – 53,8%, опередив в этом отношении «эталонный» штамм 588 с 9,3% гидрофобности. Основными метаболитами гидрофобной природы являются жиры, нуклеиновые кислоты, некоторые белки и пептиды. Снижение гидрофобности поверхности приводит к подавлению адгезии к ней бактерий и, напротив, бактерии, обладающие относительно гидрофильной поверхностью клеток, проявляли большее сродство к поверхности полистирола. Остальные исследованные культуры, в том числе штамм 4б, относящийся к тому же виду, что и штамм 2б, показали невысокое сродство к

гексадекану, что свидетельствует об их более гидрофильных поверхностях.

(рис. 11).

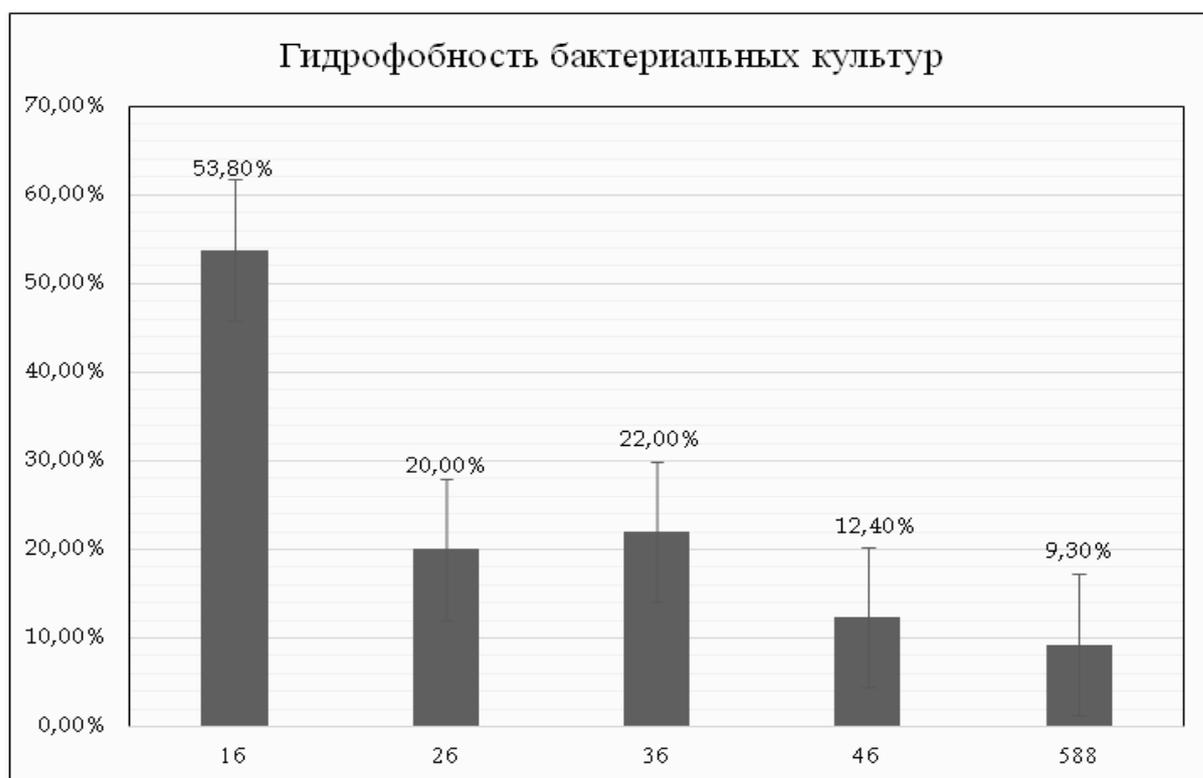


Рисунок 11. Гидрофобность штаммов *Lactobacillus kefir*, выделенных из кефирных зерен разных территорий в сравнении с *Lactocaseibacillus rhamnosus*.

Примечания: штаммы *L. kefir*, выделенные из образцов регионов: 16- Осетия; 26,46- из г. Москвы( № 5); и 36 (*Lactobacillus casei*) - из Тибета, 588- *Lactocaseibacillus rhamnosus*

### **3.8. Определение способность к образованию биопленок поверхностей выделенных культур молочнокислых бактерий**

Процессы, управляющие образованием биопленки, включают создание поверхности для прочного прикрепления клеток к этой поверхности, межклеточные взаимодействия и рост сложной структуры.

Степень пленкообразования соответствовала интенсивности окрашивания кубиков красителем. Пленкообразующими считали культуры, если значение ОП

превышало контроль в 3 и более раз ( $OP_{580} > 1.0$ ), склонными к адгезии в 2-3 раза ( $0.6 > OP_{600} < 1.0$ ).

Остальные оценивали как непленкообразующие. В результате проведенных экспериментов было установлено, что наибольшее сродство к гексадекану (показатель степени гидрофобности поверхности клетки) имеет культура 1б (среди бактерий, рис. 12). Наименьшие показатели отмечены для культур 2б и 4б, хотя культуры принадлежат одному виду, выделены из КЗ одного региона (г.Москва), что еще раз подчеркивает различие между МКБ, которые могут проявляться на уровне штаммов.

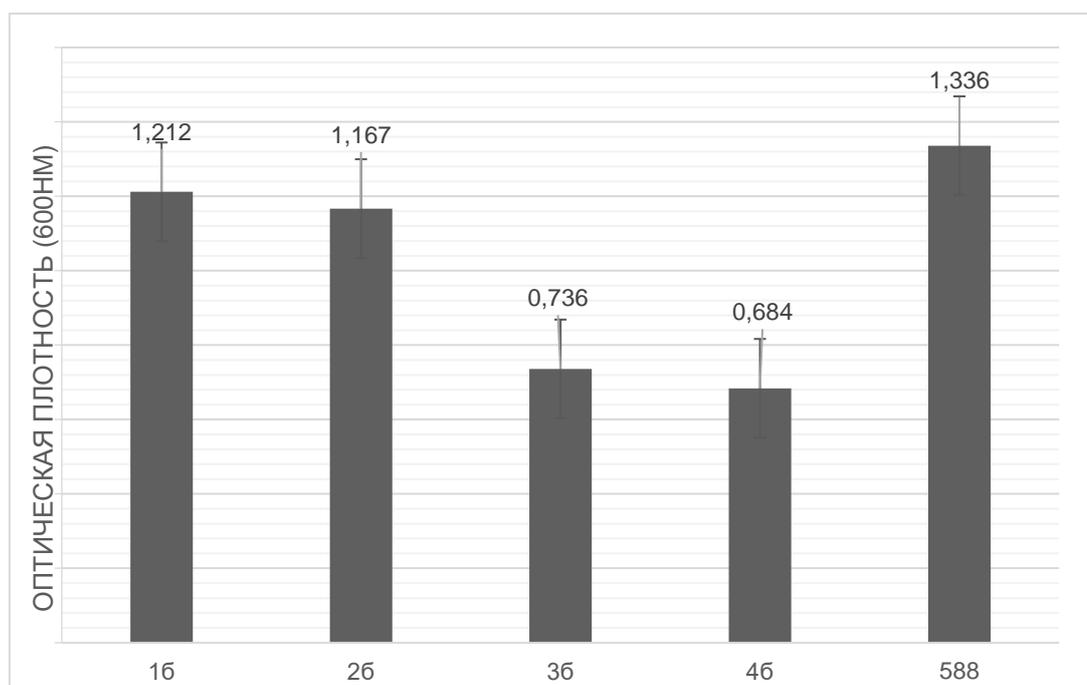


Рисунок 12. Способность выделенных штаммов *Lactobacillus kefiri*, выделенных из кефирных зерен разных территорий, к образованию биопленок в сравнении с *Lactocaseibacillus rhamnosus*.

Примечание: штаммы *L. kefiri*, выделенные из образцов регионов: 1б - Осетия; 2б, 4б - из г. Москвы; 3б (*Lactobacillus casei*) - из Тибета

Высокая степень гидрофобности культуры *G. candidus*, выделенной из КЗ кустарного производства в Осетии, свидетельствует о его способности к образованию биопленок на гидрофобных поверхностях, что является одним из важных признаков при выборе культур для рекомендации их в качестве потенциальных пробиотиков. Такой вид дрожжей встречается в описаниях микробного пейзажа кефирных зерен, что заставляет задуматься о дальнейшем изучении этого штамма как пробиотика, тем более, что он выделен из традиционного региона происхождения КЗ, Северной Осетии.

### **3.9. Определение способности выделенных культур дрожжей к образованию биопленок**

Еще одним критерием для выбора потенциальных пробиотических культур бактерий и дрожжей является их способность образовывать биопленки на гидрофобных поверхностях, типа тефлона. Для проверки способности к образованию биопленок были взяты чистые культуры дрожжей, выделенных из различных кефирных зёрен. Проведённые исследования показали, что дрожжи, относящиеся к виду *Pichia fermentans*, выделенные из КЗ московского региона (N5, N6), продемонстрировали различную способность к пленкообразованию (рис. 13). Самым активным в отношении образования биопленок оказался штамм *Yarrowia lipolytica*, выделенный из КЗ Тибета, он в 2-3 раза опережал штаммы *Pichia fermentans* по этому показателю. При этом штамм *Galactomyces candidus* из КЗ Осетии, являясь «чемпионом» по гидрофобности поверхности, показал лишь среднюю способность к

пленкообразованию, что говорит о том, что нет прямой корреляции между образованием биопленки и степенью гидрофобности поверхности микробных клеток. Известно, что адгезия является необходимым условием для реализации важных пробиотических эффектов, таких как иммуномодуляция и вытеснение патогенных организмов в кишечнике человека и других животных. В ассоциированном со слизистой оболочкой кишечника состоянии у микробов с высокой адгезивной способностью имеются явные преимущества их нахождения в ЖКТ.

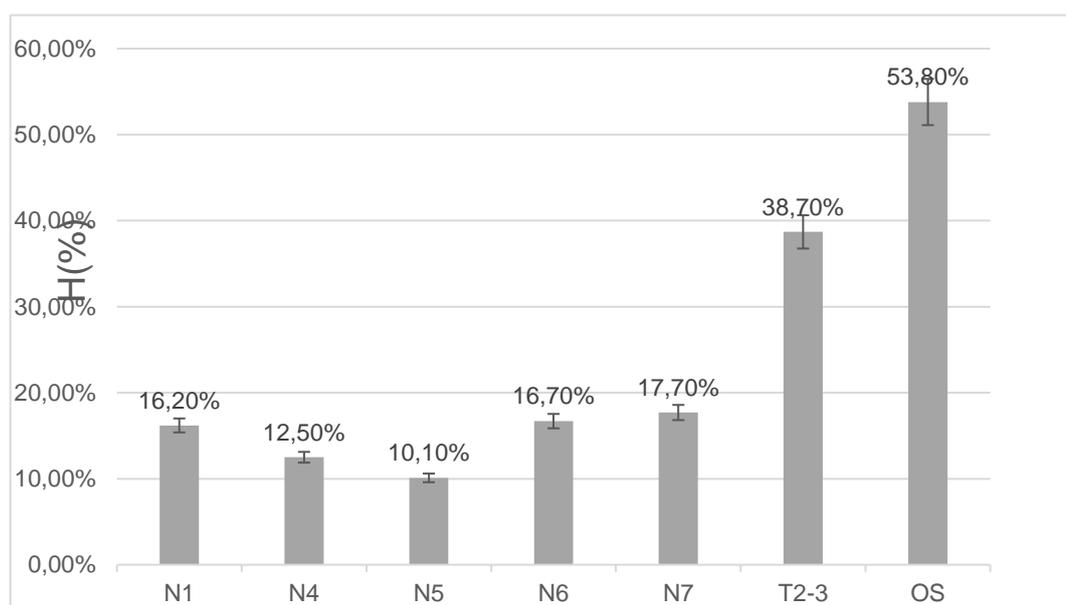


Рисунок 13. Гидрофобность выделенных из кефирных зерен дрожжей

Примечания: штаммы, выделенные из образцов: N1, 4, 5,6, 7 - *Pichia fermentans* (из г. Москвы); T-2-3 -- *Yarrowia lipolytica* (из Тибета); OS -- *Galactomyces candidus* (из Осетии).

Как можно видеть из данных рис. 13, 14 выделенные из различных регионов планеты, дрожжи демонстрируют способность колонизировать гидрофобные поверхности, образуя биопленки, хотя эта способность варьирует в значительной степени среди изученных штаммов. Здесь еще раз продемонстрировано правило принадлежности пробиотической способности

(в данном случае – образование биопленок) отдельным штаммам вида, а не виду в целом. Так, дрожжи одного вида *Pichia fermentans* (штаммы N1, N4, N5, N6, N7) демонстрируют различную способность к пленкообразованию, причем самым активным в этом отношении явился штамм OS (рис. 13), он же показал и наибольшую гидрофобность поверхностей клеток этого вида (рис. 14). А самым активным в отношении образования биопленок оказался штамм T2-3 *Yarrowia lipolytica*, в 2-3 раза опережая низкопродуктивные штаммы вида *Pichia fermentans* (рис. 14). При этом штамм дрожжей *G. candidus* OS, являясь «чемпионом» по гидрофобности поверхности, показал лишь среднюю способность к пленкообразованию, что говорит о том, что образование биопленки и степень гидрофобности поверхности микробных клеток могут быть связаны и не напрямую.

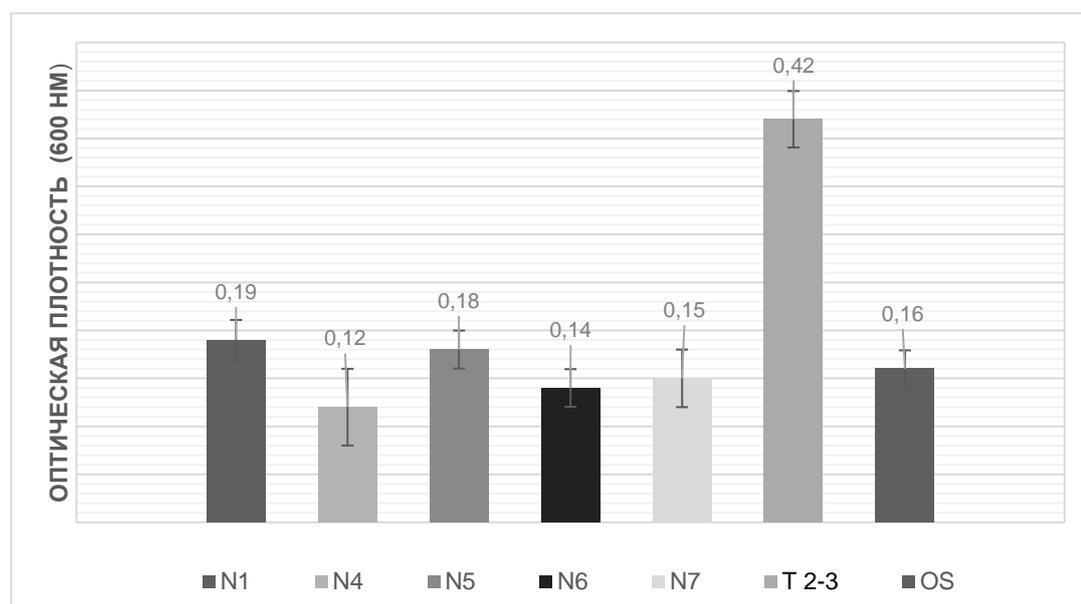


Рисунок 14. Сравнительная способность дрожжей к образованию биопленок на гидрофобных поверхностях типа тефлона, выделенных из КЗ разных регионов. Примечания: штаммы, выделенные из образцов: N1, 4, 5-7 - *Pichia fermentans* (из г. Москвы); T2-3 - *Yarrowia lipolytica* - из Тибета; OS - *Galactomyces candidus* - из Осетии.

По результатам наших исследований из изученных КЗ, полученных из разных регионов, чаще всего выделяются представители дрожжевого вида *Pichia fermentans* (штаммы N1, N4, N5, N6, N7), что может отражать не истинное микробное разнообразие КЗ, а лишь простой факт, что этот вид быстрее других растет в условиях, выбранных для первого этапа выделения чистых культур (более крупные колонии быстрорастущих клеток). В дальнейшем усилия были направлены в сторону выделения и более медленно растущих видов дрожжей, труднее выделяемых из микробных консорциумов.

Выделение большого количества МКБ относящихся к одному виду (*Lactobacillus kefir* штаммы 2б, 4б), по-видимому, также отражает их способность к более быстрому росту на среде MRS а аэробных и анаэробных условиях культивирования, а не реальное микробное разнообразие изученных КЗ. Как и в случае кефирных дрожжей, показано разнообразие морфотипов этих лактобацилл для пополнения коллекции потенциальных пробиотических культур. Проведённые исследования показали определенное филогенетическое разнообразие быстро растущих бактерий, выделенных из кефирных зёрен, которые были собраны в разных регионах планеты. Их различающиеся по гидрофобности поверхности, что является важным свойством будущих пробиотиков, отражают штаммовые различия.

Убедительные демонстрации штаммовых особенностей выделенных чистых культур МКБ и дрожжей из различных КЗ разных регионов, указывают на дальнейшие направления исследований по получению эффективных пробиотических культур, обладающих большинством необходимых свойств

(быстрый рост, способность образовывать биопленки, подавлять рост потенциальных патогенов, быть устойчивыми к желудочно-кишечному стрессу и быть непатогенными и неаллергенными). Считается, что адгезия является необходимым условием для реализации определенных пробиотических эффектов, таких как иммуномодуляция и вытеснение патогенных организмов (Mitra et al., 2020). В ассоциированном со слизистой оболочкой кишечника состоянии у микробов с высокой адгезивной способностью имеются явные преимущества их нахождения в ЖКТ.

### **3.10. Высокопроизводительное секвенирование кефирных зерен**

Определение состава дрожжевых культур в нескольких кефирных зернах. Для эксперимента были выбраны кефирные зерна OS, выделенные из заквасок Северной Осетии, кефирные зерна Т-2-3, выделенные из заквасок Тибета, и кефирные зерна N5, выделенные из заквасок Москвы. Анализ исследуемых кефирных зерен позволил сделать выводы о видовом составе дрожжей в исследованных образцах.

При сравнении видового состава дрожжей в зернах OS, Т-2-3 и N5 выявляется процентное преимущество дрожжей грибов класса *Saccharomycetes*, однако, в зернах OS присутствует также незначительное количество дрожжей *Pichia kluyveri* – 4 % (табл. 9). Было зафиксировано преобладание дрожжей рода *Kazachstania* в исследуемых зернах – 96%, 97% и 55% в зернах OS, Т-2-3 и N5 соответственно.

Таблица 9.

## Дрожжевой состав кефирного зерна из Осетии

OS				
	Таксон	%		%
Филум	<i>Ascomycota</i>			100
Класс	<i>Saccharomycetes</i>			100
Порядок	<i>Saccharomycetales</i>			100
Семейство	<i>Saccharomycetaceae</i>	96	<i>Pichiaceae</i>	4
Род	<i>Kazachstania</i>	96	<i>Pichia</i>	4
Вид	<i>Kazachstania turicensis</i>	83	<i>Pichia kluyveri</i>	4
	<i>Kazachstania unispora</i>	13		

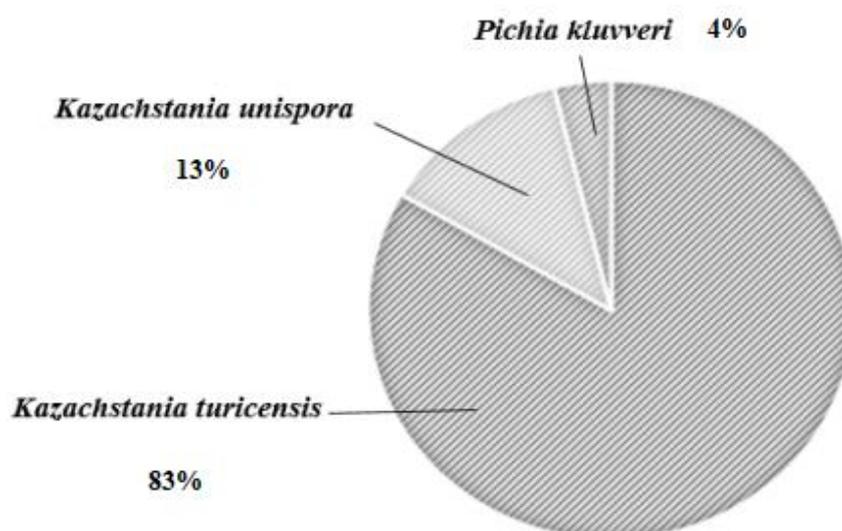


Рисунок 15. Дрожжевой состав микробиоты кефирных зерен из Осетии, определенный методом секвенирования генов ITS1.

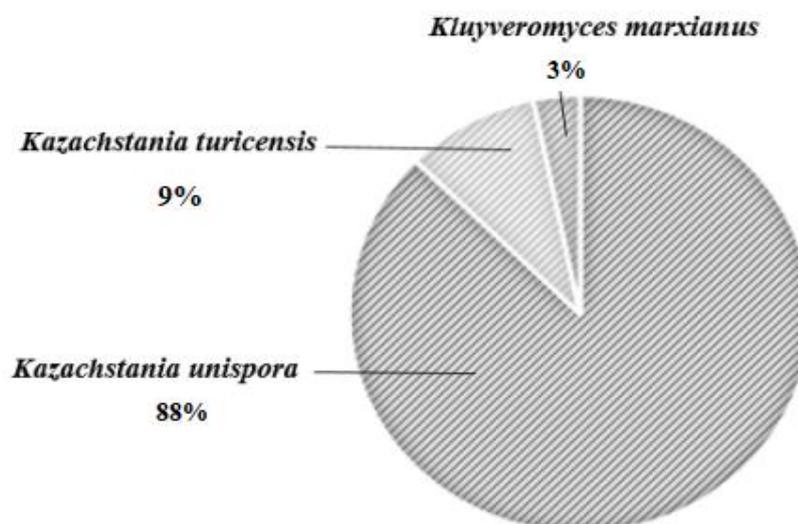


Рисунок 16. Дрожжевой состав микробиоты кефирных зерен из Тибета, определенный методом секвенирования генов ITS1.

Таблица 10.

## Дрожжевой состав кефирного зерна из Тибета

Т-2-3				
	Таксон	%		%
Филум	<i>Ascomycota</i>			100
Класс	<i>Saccharomycetes</i>			100
Порядок	<i>Saccharomycetales</i>			100
Семейство	<i>Saccharomycetaceae</i>			100
Род	<i>Kazachstania</i>	97	<i>Kluyveromyces</i>	3
Вид	<i>Kazachstania unispora</i>	88	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	3
	<i>Kazachstania turicensis</i>	9		

## Дрожжевой состав кефирного зерна из Москвы

N5				
	Таксон	%		%
Филум	<i>Ascomycota</i>			100
Класс	<i>Saccharomycetes</i>			100
Порядок	<i>Saccharomycetales</i>			100
Семейство	<i>Saccharomycetaceae</i>			100
Род	<i>Kazachstania</i>	55	<i>Kluyveromyces</i>	45
Вид	<i>Kazachstania unispora</i>	10	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	38
	<i>Kazachstania turicensis</i>	45	<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>	7

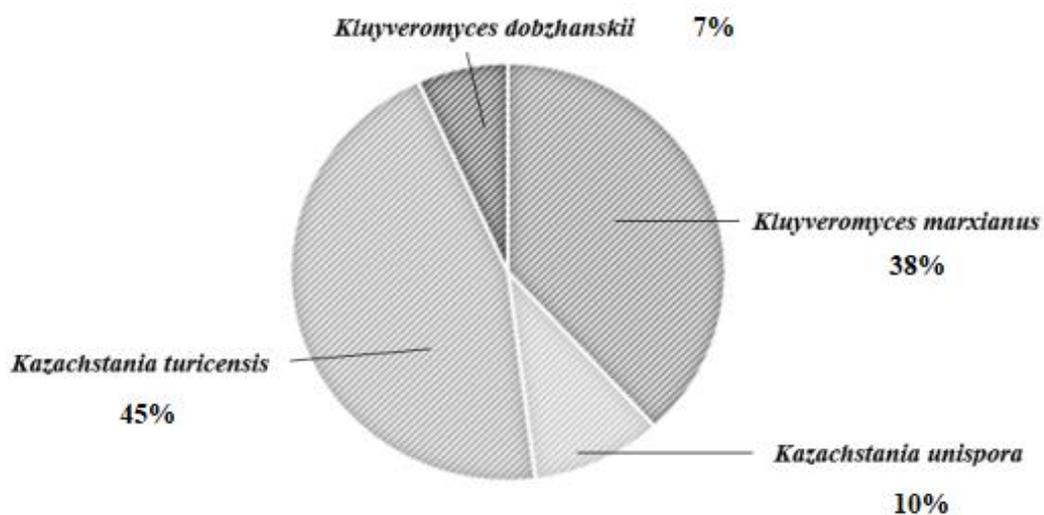


Рисунок 17. Дрожжевой состав микробиоты кефирных зерен из Москвы, определенный методом секвенирования генов ITS1.

Дрожжи *Pichia kluyveri*, их биологические характеристики таковы: колонии от белого до кремового цвета, влажные, вязкие, легко перемешиваются, цвет передней, задней части, центра и краев колоний одинаковый, имеется ложный мицелий, а процесс роста имеет фруктовый привкус. Основными видами применения дрожжей *Pichia kluyveri*, о которых сообщалось до сих пор, являются: ферментация кормов, ферментация и разложение пищевых отходов, а также разложение фруктовых кислот.

Все перечисленные виды являются типичными представителями дрожжевого сообщества кисломолочных продуктов; вызывает, однако, удивление тот факт, что сахаромицетов среди них не оказалось.

Невысокое в процентном соотношении присутствие дрожжей класса *Agaricomycetes* по сравнению с классом *Saccharomycetes* в образце зерен Т-2-3 еще не свидетельствует о важности того или иного рода в микробном пейзаже и функционале зерен. Весьма возможно, что присутствующие в небольшом количестве клетки играют важные и значительные роли в физиологии сложного микробного сообщества зерна. Но этот вопрос требует дальнейшего изучения и выделения чистых культур дрожжей, обнаруженных методом высокопроизводительного секвенирования тотальной ДНК зерен.

Профилирование по 16S рРНК с бактериальными праймерами оказалось более результативным, и дало новой информации о видовом разнообразии микроорганизмов исследуемых кефирных зерен (рис. 18, 19 и 20).

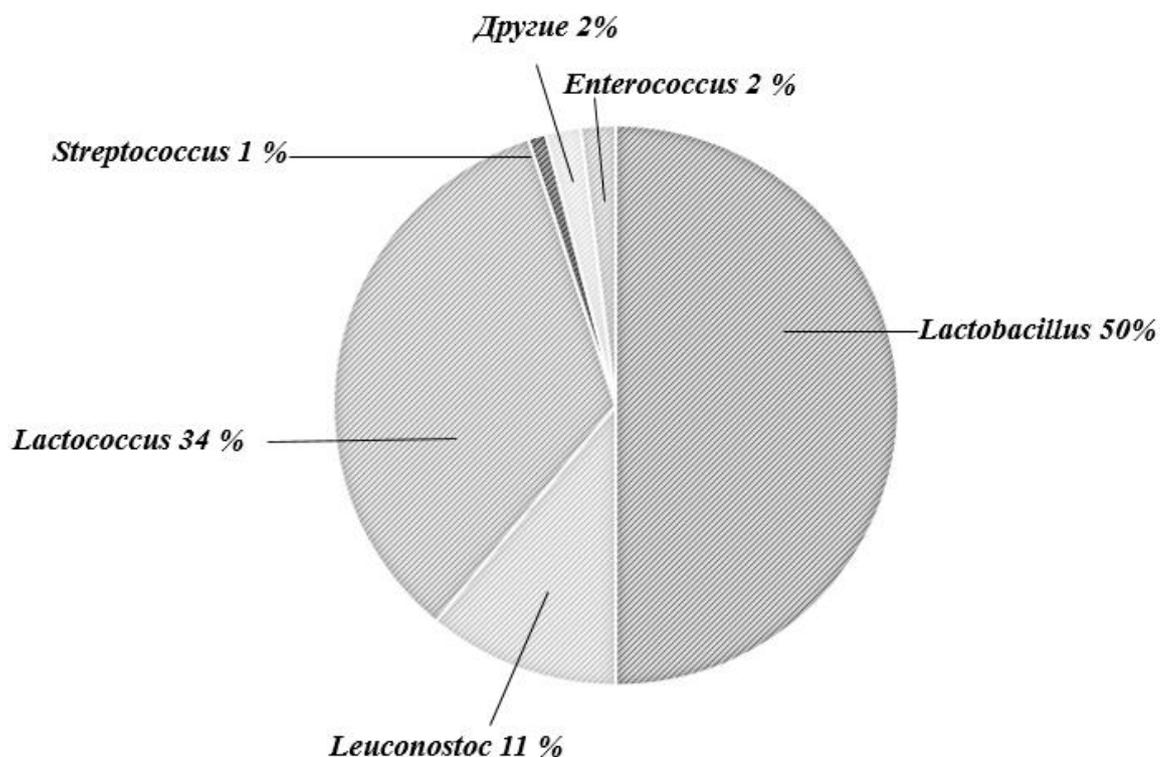


Рисунок 18. Разнообразие бактериальной в составе кефирного зерна OS, который собран из Северной Осетии, установленное по результатам высокопроизводительного секвенирования гена 16S рНК.

Наблюдали, что микробиота кефира из Осетии состоит из *Lactococcus* (34%), *Lactobacillus* (50%) и *Leuconostoc* (11%). А ещё заметно *Enterococcus* (2%) и *Streptococcus* (1%). Обнаружена группа молочнокислых бактерий рода *Enterococcus*, которые, как известно, колонизируют кишечник человека уже в первые недели его жизни и являются незаменимой культурой, участвующей в процессах переработки пищи.

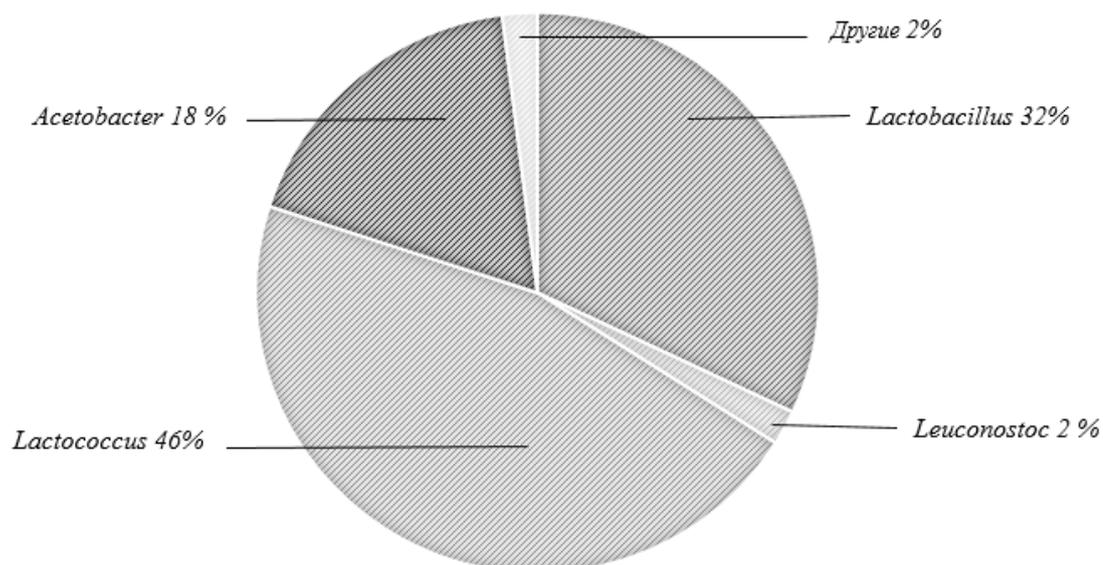


Рисунок 19. Бактериальное разнообразие состава кефирного зерна Т1, который собран из Тибета, установленное по результатам высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК.

Установлено, что основной бактериальный состав кефира из Тибета включает *Lactococcus* (46%), *Lactobacillus* (32%) и *Acetobacter* (18%). А ещё заметно присутствие *Leuconostoc* (2%).

*Acetobacter* являются подвижными и грамотрицательными палочками, которые располагаются поодиночке, попарно, цепочками. Клетки имеют форму от эллипсоида до палочки (у них размер обычно 0,6-0,8 мкм·1-4 мкм, имеют дыхательный тип метаболизма, не образуют эндоспор, разжижают желатин, восстанавливают нитраты или образуют индол.

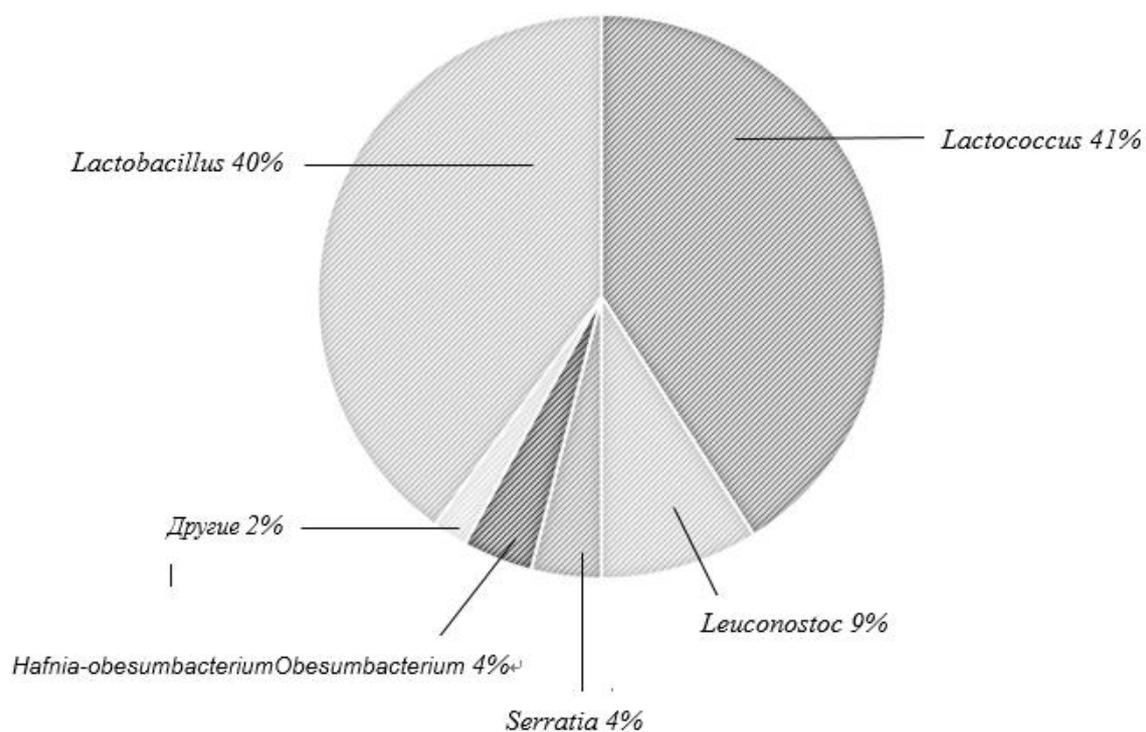


Рисунок 20. Бактериальное разнообразие состава кефирного зерна N5, из Московской области, установленное по результатам высокопроизводительного секвенирования гена 16S рНК.

Высокопроизводительное секвенирование переменных участков генов 16S рНК и области ITS1 КЗ позволило установить биологическое разнообразие МКБ и дрожжей, их населяющих. При этом КЗ из разных регионов показали различные составы дрожжевых и бактериальных видов, хотя по органолептическим показателям выработанные ими кефиры отличались незначительно. Так, в КЗ из Осетии и Тибета основные позиции в зерне занимают представители рода дрожжей *Kazachstania* (96 и 97%, соответственно), тогда как в КЗ московского региона представители этого рода составили лишь 55% от дрожжевой популяции, остальные 45% занимали дрожжи рода *Kluyveromyces*. Представители последнего рода занимают только 3% от популяции дрожжей в КЗ из Тибета, а в КЗ из Осетии их вообще не

обнаружили. По-видимому, роль кляйверомицетов в таких КЗ выполняют представители рода *Pichia* из семейства *Pichiaceae* с содержанием 4% от всего дрожжевого населения КЗ из Осетии. Полученные данные четко дифференцируют КЗ из разных регионов по содержанию в них дрожжей разных родов, хотя принадлежат они одному семейству *Saccharomycetaceae* (за исключением семейства *Pichiaceae* в КЗ из Осетии). Это наблюдение может отражать эволюционирование КЗ от их предков, существующих тысячелетия, В КЗ московского региона наблюдается наибольшее видовое разнообразие дрожжей с преобладанием представителей рода *Kazachstania* (55%), однако от них лишь немного отстает род *Kluveromyces* (45%). Эти два рода (с двумя видами каждый) монополизировали дрожжевой состав КЗ из московского региона. Следует также отметить выделение в чистую культуру дрожжей *Galactomyces candidus*, что является уникальным результатом данного исследования. До сих пор представителей этого рода не обнаруживали ни в одном КЗ в мире.

Видовое разнообразие бактерий в изученных КЗ (рис. 18,19,20) более представительное, чем было известно ранее, и наибольшее количество бактериальных родов обнаружено в КЗ из московского региона (5 родов). Причем представители лактобацилл и лактококков занимают первые места с общим доминированием в сообществе в 81%. Такие же примерно соотношения выявлены и в КЗ из Осетии (84% доминирования лактобацилл и лактококков) и Тибета (78% доминирования лактобацилл

и лактококков). По-видимому, представители именно этих двух родов несут основную нагрузку по превращению лактозы в молочную кислоту при сбраживании молока КЗ. Лактобациллы и лактококки обнаружены практически во всех КЗ, изученных в разных странах мира. Обращает также внимание факт наличия представителей рода *Leuconostoc* во всех исследованных нами КЗ, хотя и в разных соотношениях: 9% в КЗ из московского региона, 11% - из Осетии и лишь 2% - из Тибета. Представители этого рода известны своими способностями образовывать мощные полисахаридные пленки в аэробных условиях и проводить гетероферментативное молочнокислое брожение.

### **3.11. Обсуждение результатов**

В соответствии с поставленными задачами было проведено изучение пространственного расположения микробов в кефирных зёрнах, выделенных из разных территориальных зон. Электронно-микроскопические исследования КЗ, полученных из Москвы, Осетии и Китая (район Тибета), показали четкое пространственное распределение микробов в зернах. Так, дрожжи в зерне располагаются близко к его поверхности, что отражает их облигатную зависимость от молекулярного кислорода, а в середине зерна обнаружены только бактерии, не нуждающиеся в кислороде для своей жизнедеятельности. Дальнейшие исследования с применением кислородного микроэлектрода

могут помочь в измерении реальных градиентов концентраций кислорода на поверхности и в середине КЗ.

При разработке биотехнологических основ применения КЗ были изучены ростовые характеристики кефирных зёрен с целью выбора наиболее быстрорастущих КЗ и отработки режимов сбраживания. Ферментация кефира на молочных продуктах - это процесс общего метаболизма сложного сообщества симбиотических бактерий и дрожжей. Как различные бактерии способствуют формированию и стабильности микроэкологии КЗ? Каково синергетическое влияние этих микробов друг на друга в процессе метаболизма КЗ? Можно ли определить одного или нескольких показательных микроорганизмов для количественной оценки КЗ и предсказания скорости брожения с помощью КЗ, а также качества конечного продукта - кефира? Ответы на эти вопросы закладывают теоретическую основу для практического применения КЗ и помогут создать руководство для практического применения КЗ в реальном процессе производства кефира.

Культивирование кефирных зерен из разных территориальных зон в молоке в динамике роста позволило простым способом рассчитать скорость роста КЗ по накоплению биомассы, и, таким образом, сравнить биотехнологические показатели разных КЗ для разработки технологического регламента производства кефира на основе изучаемых кефирных зерен.

Изучение антимикробного спектра действия кефира, полученных из КЗ разных регионов позволило выявить наиболее активные КЗ, производящие

кефиры с максимальным эффектом подавления роста оппортунистических патогенов, а самое главное – грибов (дрожжей) из рода *Candida*. Это достижение позволит заложить основы профилактического и лечебного применения кефира для лечения кандидозов человека.

Высокопроизводительное секвенирование геномов КЗ позволило установить биологическое разнообразие МКБ и дрожжей, их населяющих. При этом КЗ из разных регионов показали различные составы дрожжевых и бактериальных видов, хотя по органолептическим показателям выработанные ими кефиры отличались незначительно. Так, в КЗ из Осетии и Тибета основные позиции в зерне занимают представители рода дрожжей *Kazachstania* (96 и 97%, соответственно), тогда как в КЗ московского региона представители этого рода составили лишь 55% от дрожжевой популяции, остальные 45% отданы дрожжам рода *Kluyveromyces*. Представители последнего рода занимают только 3% от популяции дрожжей в КЗ из Тибета, а в КЗ из Осетии их вообще не обнаружили. По-видимому, роль кляйверомицетов в таких КЗ выполняют представители рода *Pichia* из семейства *Pichiaceae* с содержанием 4% от всего дрожжевого населения КЗ из Осетии. Полученные данные четко дифференцируют КЗ из разных регионов по содержанию в них дрожжей разных родов, хотя принадлежат они одному семейству *Saccharomycetaceae* (за исключением семейства *Pichiaceae* в КЗ из Осетии). Это наблюдение может отражать эволюционирование КЗ от их предков, существующих тысячелетия, в КЗ московского региона наблюдается наибольшее видовое разнообразие дрожжей с преобладанием представителей

рода *Kazachstania* (55%), однако, от них немногим отличается род *Kluveromyces* (45%). Эти два рода (с двумя видами каждый) монополизировали дрожжевой состав КЗ из московского региона. Несмотря на видовое разнообразие, органолептические показатели всех трех кефиров, произведенных из изученных КЗ, существенно по вкусу не отличаются. Следует также отметить выделение в чистую культуру дрожжей *Galactomyces candidus*, что является уникальным результатом данного исследования. До сих пор представителей этого рода не обнаруживали ни в одном КЗ в мире.

Дрожжевой состав КЗ, установленный нами для зерен из разных регионов, напоминает таковой для зерен из Китая и Италии (*Kazachstania unispora*; Gao et al., 2012; Garofalo et al., 2015). Дрожжи *Kluveromyces marxianus* обнаружены в КЗ из Канады (Farnworth, 2005), Болгарии (Simova et al., 2002) и Аргентины (Garrote et al., 2001), что отражает почти универсальное распространение их по миру. Дрожжи *Yarrowia lipolytica*, выделенные нами из КЗ Тибета обнаружены также в КЗ из Болгарии (Simova et al., 2002), Швейцарии (Fröhlich-Wyder, 2003) и Испании (Lopitz-Otsoa et al., 2006; Latorre-García et al., 2007). Большое количество видов дрожжей рода *Kazachstania* обнаружены в КЗ из Италии (Garofalo et al., 2015), что также свидетельствует о широком представительстве этого рода в КЗ различных стран.

Видовое разнообразие бактерий в изученных КЗ более представительное, и наибольшее количество бактериальных родов обнаружено в КЗ из московского региона (5 родов), хотя представители лактобацилл и лактококков

занимают первые места с общим доминированием в сообществе в 81%. Такие же примерно соотношения выявлены и в КЗ из Осетии (84% доминирования лактобацилл и лактококков) и Тибета (78% доминирования лактобацилл и лактококков). По-видимому, представители именно этих двух родов несут основную нагрузку по превращению лактозы в молочную кислоту при сбраживании молока КЗ. Лактобациллы и лактококки обнаружены практически во всех КЗ, изученных в разных странах мира (табл. 1). Обращает также внимание факт наличия представителей рода *Leuconostoc* во всех исследованных нами КЗ, хотя и в разных соотношениях: 9% в КЗ из московского региона, 11% - из Осетии и лишь 2% - из Тибета. Представители этого рода известны своими способностями образовывать мощные полисахаридные пленки в аэробных условиях и проводить гетероферментативное молочнокислое брожение. Бактерии этого рода выделены из КЗ во Франции, Ирландии и Великобритании (Walsh et al., 2016), Бельгии (Korsak et al., 2015), Бразилии (Zanirati et al., 2015) и ряде других стран (табл. 1).

Интересен факт обнаружения в большом количестве (18%) ацетобактера в КЗ из Тибета. Эти бактерии – строгие аэробы, они способны окислять этанол, образуемый дрожжами КЗ, в уксусную кислоту. Наличие таких бактерий в КЗ в больших пропорциях отражает особенность китайских КЗ, что предопределяет возникновение более кислого вкуса кефира. Однако, уровень рН после сбраживания молока КЗ из Тибета оставался на приемлемом уровне (3,5 – 4,0). Представителей этого рода выделяли также из КЗ в Китае (Gao et

al., 2012, 2013), Франции, Ирландии и Великобритании (Walsh et al., 2016). Остальные представители бактерий в изученных КЗ различаются, однако, они не несут особой смысловой нагрузки, поскольку представлены в минорных количествах, хотя, возможно, и способны придавать особый вкус и аромат конечному продукту.

Установление точного видового состава КЗ разных регионов имеет значительный биотехнологический эффект. Так, на рынки развитых стран мира агентства по контролю за качеством продуктов не допускают изделия, изготовленные с помощью микроорганизмов, которые не определены до вида. К таким продуктам относятся и кефиры различного происхождения. Так, многие западные «кефиры» готовят с использованием заквасок, содержащих лактобациллы (типа тех, что применяют при изготовлении йогуртов) и пекарские дрожжи. Вкус таких «кефиров» оставляет желать лучшего. Это является следствием запрета на использование КЗ с неустановленным точно микробным составом. Наши исследования прокладывают путь к устранению этого недостатка и открывают путь к КЗ с молекулярно-идентифицированным составом микробов на рынки развитых и развивающихся стран (включая КНР).

Выделение чистых культур бактерий и дрожжей из изученных КЗ показало наличие в них потенциальных пробиотиков, поскольку многие вновь выделенные культуры МКБ и дрожжей показали значительные уровни гидрофобности клеток и способности к образованию биопленок. Это прежде всего отражает их потребности находится в тесном контакте с другими

клетками в зерне, но говорит и об их пробиотических свойствах, поскольку способность к адгезии на различных поверхностях – одно из проявлений потенциальных пробиотических культур. Вновь выделенные из новых КЗ разных регионов МКБ и дрожжи пополняют коллекцию потенциальных пробиотических культур кафедры микробиологии МГУ.

Проведённые исследования показали, что дрожжи, относящиеся к одному виду *Pichia fermentans*, выделенные из КЗ московского региона (N1, N5, N6), продемонстрировали различную способность к пленкообразованию, при этом самым активным в отношении образования биопленок оказался штамм *Yarrowia lipolytica*, выделенный из КЗ Тибета, он в 2-3 раза опережал штаммы *Pichia fermentans* по этому показателю. При этом штамм *Galactomyces candidus* из КЗ Осетии, являясь «чемпионом» по гидрофобности поверхности, показал лишь среднюю способность к пленкообразованию, что говорит о том, что нет прямой корреляции между образованием биопленки и степенью гидрофобности поверхности микробных клеток. Известно, что адгезия является необходимым условием для реализации важных пробиотических эффектов, таких как иммуномодуляция и вытеснение патогенных организмов в кишечнике человека и других животных. В ассоциированном со слизистой оболочкой кишечника состоянии у микробов с высокой адгезивной способностью имеются явные преимущества их нахождения в ЖКТ.

Проведённые исследования показали определенное филогенетическое разнообразие микроорганизмов, составляющих микробиом КЗ, отобранных для исследований из разных регионов планеты. С использованием метода

высокопроизводительного секвенирования микробиома КЗ показано, что основными представителями сложного сообщества кефирных зёрен являются молочнокислые бактерии (лактобациллы и лактококки в разных соотношениях), *Leuconostoc* spp. и разные виды дрожжей родов *Kazachstania* и *Kluveromyces*.

Благодаря постоянному развитию современных молекулярных технологий, таких как метагеномика, снижению стоимости высокопроизводительной технологии секвенирования и популяризации области применения, становится возможным более глубокий анализ сложного микробного состава кефирных зёрен.

В настоящее время КЗ в основном используют для получения молочных продуктов, хотя дальнейшие исследования могли разработать способы их применения в качестве разрыхлителя для хлеба, изготовления рисового вина, улучшения качества соков и других продуктов питания и напитков. Кроме того, поскольку все исследования пока еще находятся в зачаточном состоянии, КЗ еще не были коммерциализированы, будь то в качестве разрыхлителя или активного функционального вещества. Развитие коммерческой ценности КЗ станет новой целью исследований. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для создания устойчивых пробиотических микробных сообществ и продуктов функционального питания, остро необходимых в период пандемии коронавирусной инфекции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью работы явилось изучение микробных сообществ кефирных зёрен, выделенных из разных территориальных зон их исторического происхождения. В ходе работы были изучены морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства кефирных зёрен, полученных из России, Осетии и Китая, район Тибета. Электронно-микроскопические исследования КЗ, показали четкое пространственное распределение микроорганизмов в зернах. Так, дрожжи в зерне располагаются близко к его поверхности, что отражает их облигатную зависимость от молекулярного кислорода, а в середине зерна обнаружены только бактерии, не нуждающиеся в кислороде для своей жизнедеятельности. Изучение антимикробного спектра действия кефиров, полученных из КЗ разных регионов позволило выявить наиболее активные КЗ, производящие кефиры с максимальным эффектом подавления роста оппортунистических патогенов, а самое главное – грибов (дрожжей) из рода *Candida*. Это достижение позволит заложить основы профилактического и лечебного применения кефиров для лечения кандидозов человека.

Проведённые исследования показали определенное филогенетическое разнообразие микроорганизмов, составляющих микробиом КЗ, отобранных для исследований из разных регионов планеты. С использованием метода высокопроизводительного секвенирования маркерных генов микробиома КЗ показано, что основными представителями сложного сообщества кефирных

зёрен являются молочнокислые бактерии (лактобациллы и лактококки в разных соотношениях), а также *Leuconostoc* spp. При сравнении дрожжевого состава установлено, что у всех КЗ присутствуют дрожжи *Kazachstania turicensis* независимо от места происхождения. Но КЗ из Тибета и Москвы содержат также и *Kluveromyces marxianus*, которые обладают пробиотическими свойствами.

Проведённые исследования показали, что дрожжи, относящиеся к одному виду *Pichia fermentans*, выделенные из КЗ московского региона (N5, N6), продемонстрировали различную способность к пленкообразованию, при этом самым активным в отношении образования биопленок был штамм *Yarrowia lipolytica*, выделенный из КЗ Тибета, он в 2-3 раза опережал штаммы *Pichia fermentans* по этому показателю. Штамм *Galactomyces candidus* из КЗ Осетии, с наиболее гидрофобной поверхностью из выделенных в чистую культуру дрожжей, показал лишь среднюю способность к пленкообразованию, что еще раз продемонстрировало отсутствие прямой корреляции между степенью гидрофобности поверхности микробных клеток и их способностями образовывать биопленки. При этом адгезия является необходимым условием для реализации важных пробиотических эффектов, таких как иммуномодуляция и вытеснение патогенных организмов в кишечнике человека и других животных. В ассоциированном со слизистой оболочкой кишечника состоянии у микробов с высокой адгезивной способностью имеются явные преимущества их нахождения в ЖКТ.

При сравнении биотехнологических свойств изученных КЗ разных регионов установлено, что все они имеют различные свойства и могут быть использованы в производствах кефиров (табл. 12).

Таблица 12.

Сравнения исследованных штаммов по основным характеристикам

Свойство	КЗ №5 (Москва)	КЗ Т2-3 (Тибет)	КЗ OS (Осетия)
Прирост биомассы, % /12 сут.	64,7±0,2	56,0±0,2	61,2±0,2
Подавление роста <i>Staphylococcus aureus</i> (А)	175	110	122
Подавление роста <i>Escherichia coli</i> (А)	89	105	62
Подавление роста <i>Aspergillus</i> (А)	138	126	108
Подавление роста <i>Candida</i> (А)	134	160	176
Гидрофобность (бактериальный состав)	++	++	+++
Образование биопленки (бактериальный состав)	++	+	++
Гидрофобность (дрожжевой состав)	++	++	+++
Образование биопленки (дрожжевой состав)	++	++	+++
Рейтинг	1-2	3	1-2

Из данных таблицы 12 видно, что КЗ N5, полученные из Москвы, по приросту биомассы, подавлению роста *Staphylococcus aureus* и грибов рода *Aspergillus* опережают остальные изученные КЗ, а OS выделенные из Осетии лучше других подавляют рост дрожжей р. *Candida*, имеют бактерии и дрожжи с высокими гидрофобностями и способностями к образованию биопленок, поэтому для дальнейших разработок можно рекомендовать КЗ N5 и OS.

## ВЫВОДЫ

1. При исследовании морфологии зёрен OS, T2-3 и N5 с помощью электронно-микроскопических исследований установлено, что факультативные анаэробы (дрожжи) расположены ближе к поверхности зерна, а в середине его - анаэробные лактобациллы.
2. Определены биотехнологические показатели кефирных зёрен (КЗ) разных территориальных зон: в лабораторных условиях: биомасса зёрен OS, T2-3 и N5 после 12 суток роста в коровьем молоке увеличилась на 56 - 65 %.
3. Путем высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК бактерий и ITS1-областей дрожжей КЗ установлено, что в их состав входят молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc*, а в зёрнах T2-3 выявлены также *Acetobacter* spp. Представителями дрожжевого сообщества КЗ чаще всего являются дрожжи родов *Kazachstania* или *Kluyveromyces*, при этом из КЗ T2-3 выделены дрожжи *Yarrowia lipolytica*, а из OS – *Galactomyces candidus*, последние – впервые из КЗ.
4. Изучение антимикробного спектра действия кефиров, полученных из КЗ OS, T2-3 и N5 показало, что наиболее активными относительно оппортунистических патогенов являются зёрна N5 (Москва); они же обладают наиболее высокой скоростью роста.
5. Максимальной ингибиторной активностью по отношению к дрожжам рода *Candida* обладает кефир на основе зёрен OS (Осетия), что может быть в дальнейшем использовано для лечения и профилактики кандидозов человека. Дрожжи и бактерии из этих же КЗ обладали наилучшими адгезионными свойствами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 31454-2012. Кефир. Технические условия. Изд. М. Россия
2. *Андроханов, В. А.* Почвенно-экологическое состояние техногенных ландшафтов: динамика и оценка / *В. А. Андроханов, В. М. Курачев.* – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010 – 224 с.
3. *Градова Н.Б. Саранцева А.А.* Исследование микробного профиля структурированной ассоциативной культуры микроорганизмов – кефирных грибков // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14. №5. С.704-710.
4. *Градова Н.Б. Хохлачева, А.А. Мурзина Е.Д. Мясоедова В.В.* Микробные компоненты кефирных грибков, как продуценты экзополисахарида кефирана // Биотехнология. 2014. № 6. С.18-26.
5. *Еникеев Р.Р.* Описание биосинтез и биологическое действие полисахарид акефирных грибков – кефирана // Биофармацевтический журнал. 2011.Т. 3. №. 3. С.11–18
6. *Зайшек К., Колар М. и Горшек А.* Характеристика экзополисахарида кефирана, вырабатываемого молочнокислыми бактериями, заключенными в натуральных кефирных зернах // Int. J. Технология молочных продуктов. 2011. С. 544-548.
7. *Зайшек К., Горшек А. и Колар М.* Условия культивирования влияют на производство кефира за счет смешанной культуры молочнокислых бактерий, содержащихся в зернах кефира. Пищевая химия. 2013. С. 970-977.

8. *Кароматов И.Д., Шодиева М.С.* Тибетский молочный гриб – лечебные свойства. // Электронный научный журнал «Биология и интегративная медицина». 2018. С. 168-173.
9. *Лаптев С.В., Мезенцева Н.И., Каменская Е.П.* Химия, микробиология и экспертиза молока и молочных продуктов // Бийск: БТИ АлтГТУ. 2009. 237 с.
10. *Олескин А.В., Шендеров Б.А.* Пробиотики, психобиотики и метабиотики: проблемы и перспективы // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. 2020. Т. 2 № 3. С. 233–243
11. *Римада П.С. и Абрахам А.Г.* Влияние различных параметров ферментации на качественные характеристики кефира // Int. Dairy J. 2006. № 16, С. 33-39.
12. *Стоянова Л.Г.* Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2017. №. 5. С. 41-61.
13. *Сычева М.В., Карташова О.Л.* Биологические свойства энтерококков различного происхождения // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. №. 4. С. 17-21.
14. *Хамагаева И.С., Ванданова Е.В.* Подбор условий культивирования симбиотической закваски для производства кефира // Пищевая и перерабатывающая промышленность, реферативный журнал. 2006. №. 2. С. 95-98.

15. *Хохлачева А.А., Егорова М.А., Калинина А.Н., Градова Н.Б.* Трофические закономерности функционирования и микробный профиль эволюционно сложившейся ассоциативной культуры кефирных зерен // Микробиология. 2015. Т. 84. №. 4. С. 466–447.
16. *Шендеров Б.А.* Микробная экология человека и ее роль в поддержании здоровья // *Метаморфозы*. 2014. № 5. С.72-80.
17. *Amorim F.G., Coitinho L.B., Dias A.T., Friques A.G.F. et al.* Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules // *Food Chem*. 2019. V. 282. P .109-119.
18. *Assadi M.M., Pourahmad R., Moazami N.* Use of isolated kefir starter cultures in kefir production // *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2000. V. 16. P. 541–543.
19. *Aziza M., Amrane A.* Diauxic growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on amino acids and glucose // *Brazilian Journal of chemical engineering*. 2012.V.29. №.2. P. 203-210.
20. *Beshkova D, Simova E.D, Simov Z.I, Frengova G.I, Spasov Z.N.* Pure cultures for making kefir // *Food microbiol*.2002. V. 19. P. 537-544.
21. *Bornstein S.R., Rubin O.F., Khunti K., Mingrone G., Hopkins D., Birkenfeld L., Boehm B., Amiel S., Holt R.I., Skyler J.S., et al.* Practical recommendations for the management of diabetes in patients with COVID-19. *Lancet. Diabetes Endocrinol*. Published online. April 23, 2020.

22. Bourrie Benjamin C. T.; Willing, Benjamin P. Cotter, Paul D. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir // *Frontiers in Microbiology*. 2016. V. 7. № 15. P. 647-664.
23. Boyoglu-Barnum S., Chirkova T., Anderson L. J. Biology of infection and disease pathogenesis to guide RSV vaccine development // *Front. Immunol.* 2019; V. 10. P. 74-89.
24. Caparose J.G.K.J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. // *Nat Met* 2010. V.7. P. 335-336.
25. Cheirsilp B., Shimizu H., Shioya S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirianofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Biotechnol*, 2003. V. 100. № 1. P. 43-53.
26. Chen Z., Shi J., Yang X., Nan B., Liu Y., and Wang Z. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *Int. Dairy J*, 2015. 43, 15–21.
27. Ciccarelli F.D., Doerks T., von Mering C., Creevey C.J., Snel B., Bork P. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life // *Science* 2006. V. 311. P. 1283–1287.
28. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. 2007. V. 13. № 4. P. 194-199.
29. Diosma G., Romanin D.E., Rey-Burusco M.F., Londero A., Garrote G.L. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 30 № 1. P. 43–53.

30. *Ebner J., Asgi Arslan A., Fedorova M., Hoffmann R.; Kugukgetin A., Pischetsrieder M.* Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains // *J. Proteomics*. 2015. V.117. P. 41-57.
31. *Farag M.A., Jomaa S.A., El-Wahed A.A.* The many faces of kefir fermented dairy products: quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety // *Nutrients*. 2020. V. 12. № 2. P.346-359.
32. *Farnworth E.R.* Kefir a complex probiotic // *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. 2005. V. 2. № 1. P. 1-17.
33. *Farnworth E.R., Mainville I.* Kefir - A Fermented Milk Product. // In: Farnworth, E. R. 2th ed., *Handbook of Fermented Functional Foods*. 2008. № 2. P. 89-127
34. *Fonseca G. G, Hei latorre-García, L., del Castillo-Agudo, L., Polaina J.* Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 23. P. 785–791.
35. *Fröhlich-Wyder M.T.* Yeasts in dairy products. In: Boekhout T, Robert, V (Eds) *Yeasts in Food*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 2003. P. 209-237.
36. *Fleet G.H.* Growth of yeasts during wine fermentation of Wine // *Research* 1990. № 1. P. 211-223.
37. *Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanhu J., Mingsheng D.* Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis // *Food Microbiol.* 2009. V. 26. № 8. P. 770–775.

38. Gao Jie., Gu F., Abdella N. H., Ruan H., He G. Investigation on culturable in Tibetan kefir grains from different areas of China // *J. Food Sci.* 2012. V. 77. № 8. P. 425-433.
39. Gao Jie., Gu F., He J., Xiao J., Chen Q., Ruan H. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains // *Eur. Food Res. Technol.* 2013. V. 236. № 3. P. 549–556.
40. Gao Xin, Bo li. Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: a review. *Food Agric.* 2017, 1-10.
41. Garofalo, C., Osimani, A., Milanovič, V., Aquilanti L., De Filippis, F., Stellato, G. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions // *Food Microbiol.* 2015. V. 49. № 1. P. 123–133.
42. Garrote, G. L., Abraham, A. G., and Antoni, G. L. D. Preservation of kefir grains, a comparative study. *LWT-Food Science and Technology.* 1997.V.30. № 1. P. 77-84.
43. Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios // *Journal of Dairy Research.* 1998. V. 65. № 1. P. 149-154.
44. Garrote G.L., Abraham A.G., De Antoni G.L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains // *J. Dairy Res.* 2001, V. 68. № 4. P. 639-652.
45. Garrote G.L., Abraham A.G., De Antoni G.L. Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink // *In Biotechnology of Lactic Acid Bacteria.* 2010. V. 44. № 2. P. 327-340.

46. *Guzel-Seydim Z., Wyffels J.T., Seydim A.C., Greene A.K.* Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation // *Int. J. Dairy Technol.* 2005. V. 58. № 1. P. 25–29.
47. *Hamet M.F., Londero A., Medrano M., Vercammen E., Van H.K., Garrote G.L.* Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefiranofaciens* in microbial consortia present in kefir grains. // *Food Microbiol.* 2013. V. 36. № 2. P. 327–334.
48. *Hugerth L.W. et al.* DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // *Applied and Environmental Microbiology*, 2014. V. 80. №16. P. 5116–5123.
49. *Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanhu J., Mingsheng D.* Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis // *Food Microbiol.* 2009. V. 26. P. 770–775.
50. *Katakura Y., Sano R., Hashimoto T., Ninomiya K., Shioya S.* Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. 86. P. 319-326.
51. *Karaçalı R., Özdemir N., Çon A.H.* Aromatic and functional aspects of kefir produced using soya milk and *Bifidobacterium* species // *Int. J. Dairy Technol.* 2018. V. 71. № 4. P. 921–933.
52. *Kesmen Z., Kacmaz N.* Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods // *J. Food Sci.* 2011. V. 76. № 5. P. 276–283.

53. *Kim Y.J.; Liu R.H.* Increase of Conjugated Linoleic Acid Content in Milk by Fermentation with Lactic Acid Bacteria. // *J. Food Sci.* 2002. 67. P. 1731-1737.
54. *Klimko A.I., Cherdyntseva T.A., Brioukhanov A.L., Netrusov A.I.* In vitro evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* 2020. Vol. 12. N 3: P. 1139-1148.
55. *Kok-Tas T., Ekinçi F.Y., Guzel-Seydim Z.B.* Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR // *Int. J. Dairy Technol.* 2012. V. 65. № 1. P. 126–131.
56. *Korsak N., Taminiâu B., Leclercq M., Nezer C., Crevecoeur S., Ferauche C.* et al. Short communication: evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments // *J. Dairy Sci.* 2015. V. 98. № 6. P. 3684–3689.
57. *Kotova I.B., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I.* Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process // *Advs Exp. Medicine, Biology - Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health.* 2016. V.4. P. 93-102.
58. *Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., von Wright A.* Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects// Fourth edition. CRC Press. 2012. 798 c.
59. *Latorre-García L, del Castillo-Agudo L, Polaina J.* Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 23. № 6. P. 785-791.

60. *Leite A.M., B. Mayo., C. T. C. C. Rachid, R. S. Peixoto, J. T.Silva, V. M. F. Paschoalin, and S. Delgado.et al.* Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiol.* 2012. V. 31. №. 2. P.215–221.
61. *Leite A.M.O., Leite D.C.A., E.M. del Aguila, et al.* Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes // *J. Dairy Sci.* 2013. V. 96. №. 7. P. 4149–4159.
62. *Londero A., Hamet M.F., De Antoni G.L., Garrote G.L., Abraham A.G.* Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. // *J. Dairy Res.* 2012. V.79. № 3. P. 262–271.
63. *Lopitz-Otsoa F.; Rementeria A.; Elguezabala N.; Garaizar J.* Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities // *Rev. Iberoam Micol.* 2006. V. 23, № 1. P. 67-74.
64. *Loretan T., Mostert J. F., Viljoen B.C.* Microbial flora associated with South African household kefir. // *South African Journal of Science* 2003. V. 99. № 1. P. 92–94.
65. *Machado A., Leite D.O., Antonio M., Miguel L., Peixoto R.S., Rosado A.S., Silva J.T., Margaret V., Paschoalin F.* // Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. *Brazilian J. Microbiol.* 2013, V. 44, P. 341-349.
66. *Mainville I., Robert N., Lee B., Farnworth E.R.* Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir // *Syst. Appl. Microbiol.* 2006. V. 29. № 1. P. 59–68.

67. Magalhães K.T., Pereira G.V.M., Campos C.R., Dragone G., Schwan R.F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition // *Braz. J. Microbiol.* 2011. V. 42. № 2. P. 693–702.
68. Mayo B., Rachid C.T., Peixoto R.S., Silva J.T., Paschoalin V.M. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis // *Food Microbiol.* 2012. V. 31. № 2. 215-221.
69. Medrano B., Perez P.F., Abraham A.G. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors // *International Journal of Food Microbiology.* 2008. V. 122. P. 1-7.
70. Meier R., Steuerwald M. Place of probiotics. *Curr Opin Crit Care.* 2005. V. 11. P. 318-325.
71. Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA Primer Systems for Profiling of Thermophilic Microbial Communities. *Microbiology* 2019. 88. P. 671–680.
72. Miao J., Liu G., Ke C., Fan W., Li C., Chen Y., Dixon W., Song M., Cao Y., Xiao H. Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli* // *Food Control.* 2016.V. 65. P. 63-72.
73. Mitra S., Ghosh B.C. Quality characteristics of kefir as a carrier for probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG // *Int. J. Dairy Technol.* 2020. V. 73. P. 384–391.
74. Miguel, M.G.C.P., Cardoso P.G., Lago L.A., Schwan R.F. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods // *Food Res. Int.* 2010. V. 43. P. 1523–1528.

75. Miyoshi A., Rochat T., Gratadous J.J., Yves Rar, Costa S., Langella P., Azevedo V. Oxidative stress in *Lactococcus* // Genetic.Mol.Res. 2003. V. 3.4. P.348-359.
76. Motaghi M., Mazaheri M., Moazami N., Farkhondeh A., Fooladi M., Goltapeh E. Kefir production in Iran. World J. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 13, P. 579–581.
77. Nakagaki T., Nakano Y., Yamane T., Sakamoto T., Nakagaki T., Nakano Y. Lactic acid bacteria from kefir increase cytotoxicity of natural killer cells to tumor cells. Foods. 2018. 7. 48.
78. Nalbantoglu U., Cakar A., Dogan H., Abaci N., Ustek D., Sayood K. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains // *Food Microbiol.* 2014. V. 41. P. 42–51.
79. Otles S., Cagindi, O. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. // *Pakistan Journal of Nutrition.* 2003. V.2. P. 54-59.
80. Öner Z, Karahan A. G, Çakmakçi M. L. E. Effects of different milk types and starter cultures on kefir. // *Gida.* 2010. V.35. P. 177-182.
81. Pakhomov Y.D., Blinkova L.P., Dmitrieva O.V., Berdyugina O.S., Stoyanova L.G. Non-culturability and Nisin Production of *Lactococcus lactis* // *Journal of Bacteriology and Parasitology.* 2013. V.5. P. 2-8.
82. Pogačić T., Sinko S., Zamberlin S., Samarzija D. Microbiota of kefir grains // *Mljekarstvo Dairy.* 2013. V. 63. № 1. P. 3-14.

83. *Pahwa, S; Kaur, S; Jain, R; Roy, N.* Design based on the structure of new histidinol dehydrogenase inhibitors from *Geotrichum candidum* // Bioorg Med Chem Lett. 2010. V. 20 №. 13. P. 3972-3976
84. *Penner R., Fedorak R. N., Madsen K. L.* Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases // Curr Opin Pharmacol. 2005. V. 5. № 6. P. 596-603.
85. *Prado M.R., Blandón L.M., et al.* Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products // Frontiers in Microbiology. 2015. V. 6. 01177.
86. *Rattray F.P, O'Connell M.J.* Fermented Milks Kefir. In: Fukay J.W. Encyclopedia of Dairy Sciences (2<sup>th</sup> ed) // Academic Press. 2011. P. 518–524.
87. *Rea M.C., Lennartsson T., Dillon P., Drina F.D, Reville W.J, Heapes M. Cogan T.M.* Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics // J Appl Microbiol. 1996. V. 8. P. 83-94.
88. *Sayers C., Russell Ch., Pelorosso M., Adachi J., Pastor J., Singh V., Tagbor K., Hooyman P.* “Determination of Rock strength using advanced Sonic Log interpretation technique”. SPE-124161-MS-P.2009.
89. *Simova E., Beshkova D., Angelov A., Hristozova T., Frengova G., Spasov Z.* Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 28. № 1. P. 1–6.
90. *Schoevers A., Britz T.J.* Influence of different culturing conditions on kefir grain increase // Int. J. Dairy Techn. 2003.V.56. № 3. P. 183–187

91. Shevtsov A.B., Kushugulova A.R., Tynybaeva I.K., Kozhakhmetov S.S., Abzhalelov A.B., Momynaliev K.T., Stoyanova L.G. Identification of phenotypically and genotypically related *Lactobacillus* strains based on nucleotide sequence analysis of the *gro EL*, *rpo B*, *rpl B*, and *16S rRNA* genes // *Microbiology*. 2011. V. 80. № 5. P. 672-681.
92. Stadie J., Gulitz A., Ehrmann M.A., Vogel R.F. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir // *Food Microbiol.* 2013. V. 35. P. 92-98.
93. Staley J.T. The bacterial species dilemma and the geno-mic-phylogenetic species concept // *Philos Trans R Soc Lond B Bio Sci.* 2006.361. P. 1899-1909.
94. Tamime A.Y. Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products // *In: Tamime A.Y. (ed.), Fermented Milk Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. 2006 P. 174-216.*
95. Walsh A.M., Crispie F., Kilcawley K., O'Sullivan O., O'Sullivan M. G., *et.al.* Microbial Succession and Flavor Production in the Fermented Dairy Beverage Kefir // *mSystems* 2016.V.1. № 5. P. 2-16.
96. Wang S.Y., Chen K.N, Lo Y.M., *et al.* Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. // *Food Microbiology*, 2012. V. 32. № 2. P. 274-285.
97. Witthuhn R. C., Schoeman T., Britz T. J. Isolation and characterisation of the microbial population of different South African kefir grains. // *Int. J. Dairy Technol.* 2004. V. 57. № 1. P. 33–37.

98. *Witthuhn R. C., Schoeman T., Britz T. J.* Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation // *Int. Dairy J.* 2005. V. 15. № 4. P. 383–389.
99. *Yang X.J., Fan M.T., Shi J.L., Dang B.* Isolation and identification of preponderant flora in Tibetan kefir // *China Brewing.* 2007. V. 171. P. 52–55.
100. *Yüksekdağ Z. N., Beyatlı Y., Aslım B.* Determination of some characteristic coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic // *Food Sci. Technol.* 2004. V. 37. № 6. P. 663–667.
101. *Zanirati D. F., Abatemarco M. Jr., de Cicco Sandes S. H., Nicoli J. R., Cantini Nunes A., Neumann E.* Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures // *Anaerobe* 2015. V. 32. P.70–76.
102. *Zamberi N.R., Mohamad N.E., Yeap S.K., Ky H., Beh B.K., Liew W.C., Tan S.W., Ho W.Y., Boo S.Y., Chua Y.H.* 16S Metagenomic Microbial Composition Analysis of Kefir Grain using megan and basespace // *Food Biotechnol.* 2016. V. 30. № 3. P.219– 230.
103. *Zavala L., Roberti P., Piermaria J., Abraham A.G.* Gelling ability of kefir in the presence of sucrose and fructose and physicochemical characterization of the resulting cryogels // *J. Food Sci. Tech.* №. 8. P. 5039-5047.