

МИКРОБИОМ И МЕТАБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЕФИРНЫХ ЗЕРЕН И КЕФИРОВ НА ИХ ОСНОВЕ

© 2022 г. Дин Фань^{a, b}, Л. Г. Стоянова^{a, *}, А. И. Нетрусов^{a, c}

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119234 Россия

^bУниверситет МГУ-ППИ в Шэньчжэне (Shenzhen MSU-BIT University), Шэньчжэнь, КНР

^cВысшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Москва, 101000 Россия

*e-mail: stoyanova@mail.ru

Поступила в редакцию 20.03.2022 г.

После доработки 24.03.2022 г.

Принята к публикации 24.03.2022 г.

Кефир – полезный продукт смешанного молочнокислого и спиртового брожения, производимый с использованием эволюционно сложившихся ассоциативных культур, собранных в агрегированное состояние, называемое кефирными зёрнами. В обзоре дана общая характеристика кефирных зёрен из территориальных зон разных континентов (России, Европы, Азии и Америки), методы дифференциации и идентификации отдельных видов, а также взаимодействие в сообществе. Показано разнообразие их микробного состава в зависимости от местных условий культивирования, процессов хранения. Микробы, присутствующие в кефире, обладают рядом свойств, определяющих их метаболизм, взаимодействие в сообществе, благотворное воздействие на здоровье человека, его иммунную систему, что имеет важное значение для профилактики и борьбы с бактериальными и вирусными инфекциями, особенно в период пандемии COVID-19.

Ключевые слова: кефир, кефирные зёрна, микробиота, дифференциация, идентификация, взаимодействие в сообществе, метабиотические свойства

DOI: 10.31857/S0026365622100214

В условиях пандемии организм человека подвергается воздействию вирусной атаки и целого комплекса неблагоприятных факторов, влияющих на нормальное функционирование основных систем жизнедеятельности, что вызывает нарушение баланса кишечного микробиома и снижение иммунитета. Противостоять изменениям микробного состава организма под воздействием

экологических, лекарственных и других стрессовых агентов можно, обогатив микробиоту желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) полезными микробами, вносимыми извне (Шендеров, 2014). Это открытие дало импульс развитию целого направления в микробиологии – учению о пробиотиках – живых микроорганизмах, которые, попадая в организм при приеме пищи в определенных количествах, оказывают благотворный эффект на здоровье человека и животных (Meier, Steuerwald, 2005; Олескин и соавт., 2020). Последние десятилетия прошлого века и начало нынешнего характеризуются интенсивным развитием нутрициологии как науки о питании здорового человека, создании продуктов функционального питания с пробиотической микробиотой, заданными целебными свойствами. Нутрицевтики включают биологически активные вещества, которые оказывают благотворное влияние на организм человека, а также существенно влияют на профилактику некоторых заболеваний (Shenderov, 2014; Олескин и соавт., 2020). В 1998 г. создан центр функционального питания (FFC), который является ведущей мировой организацией по обучению науке о функциональном питании, и проведено 29 меж-

Список сокращений: АТФ – аденозиндифосфорная кислота; БГКП – бактерии группы кишечной палочки; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ман-ФТС – фосфотрансферная система маннозы; МКБ – молочнокислые бактерии; ПДГ – пируватдегидрогеназа; ПФЛ – пируват-формилатлиаза; РНК – рибонуклеиновая кислота; ФТС – фосфотрансферная система; ФГК – фосфоглицериновая кислота; ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; ЭПС – экзополисахариды; α -АЛС – α -ацетиллактатсинтаза; CD4 – сигнализирует о процессе инфекционного или аллергического свойства; CD8 – говорит о рисках развития онкологического процесса; CD4/CD8 – иммунорегуляторный индекс; ИЛ-1 – интерлейкин-1, цитокин, медиатор воспаления и иммунитета; ИЛ-6 – интерлейкин-6, индуцирует рост и дифференцировку Т-клеток; IgA – иммуноглобулин класса А – гликопротеин, является показателем гуморального иммунитета; IgG – иммуноглобулин, белковые соединения плазмы крови, антитела как ответ на инфицирование.

дународных конференций по функциональным продуктам питания и биологически активным добавкам к пище. Публикации периодически выходят в четырех журналах с открытым доступом: FFHDJ более 11 лет, BCHD более 4 лет, FFS более 6 мес. и DSN – новый журнал. Издано 38 книг, в том числе 9 учебников по функциональному питанию, более 150 печатных изданий, 30 полугодовых изданий. Создание Академического общества функциональных пищевых продуктов и биоактивных соединений (ASFFBC) насчитывает более 7000 членов. Науки о питании больного (диетология) и здорового человека (нутрициология) известны с давних времен. В старинных рукописях имеются указания на то, что еще до нашей эры египтяне, греки, евреи, римляне, арабские народности применяли различные пищевые продукты для лечения и предупреждения болезней (Farnworth, 2005). Кефир – полезный и питательный продукт с уникальными органолептическими свойствами, положительно влияющий на здоровье человека. Этот продукт 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, называемым кефирными зернами. Микробный состав кефирных зерен не стабилен, что влияет на качество и оздоравливающий эффект кефира (Stadie et al., 2013). Однако экспериментальные данные по структуре микробного сообщества кефира и трофических взаимоотношений компонентов сложившегося консорциума противоречивы и не позволяют разработать концептуальную модель, что могло бы расширить общие представления о структуре микробиома кефира.

Цель настоящего обзора состояла в сборе научной информации о составе кефирных зерен, взаимоотношений в сложном микробном сообществе, необходимой для разработки способов управления стабильностью состава кефирных зерен и создания на их основе продуктов функционального питания и фармацевтических препаратов, полезных для здоровья человека.

Характеристика кефира

Изготовление кефира берет свое начало на Кавказе, в тибетских или монгольских горах, где до 2000 г. до нашей эры кефирное зерно традиционно передавалось из поколения в поколение среди племен, считаясь источником семейного богатства. 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). Это кисломолочный продукт, полученный в результате комбинированного молочнокислого и спиртового сбра-

живания 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 в организме человека составляет 32%, а кисломолочные напитки, например, кефир, усваиваются полностью. Характеристика кефира как продукта включает основные показатели: кислотность продукта (рН 4.6), содержание спирта (0.5–2%), органолептические показатели – кислый вкус и дрожжевой аромат. Рекомендуемые стандарты качества кефира: содержание белка – не менее 2.8%, жира – менее 10% и не менее 0.6% молочной кислоты (ГОСТ 31454-2012). Также в составе кефира обнаруживаются и второстепенные компоненты, в том числе диацетил, ацетальдегид и аминокислоты, влияющие на вкусовую композицию (Градова и соавт., 2014). 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 соавт., 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 чистых культур молочнокислых микроорганизмов и дрожжей, при этом содержание молочнокислых микроорганизмов в готовом продукте в конце срока годности составляет не менее 10^7 КОЕ в 1 г продукта, а дрожжей – не менее 10^4 КОЕ в 1 г продукта.

Кефирные зерна: структура и функции

Кефирные зерна представляют собой дискретные структуры, состоящие из белка (4–5%), полисахарида (9–10%), называемого кефираном, в которых содержится сложная микробиота (Leite et al., 2013; Градова и соавт., 2014). Их можно описать как студенистые белые или слегка желтова-

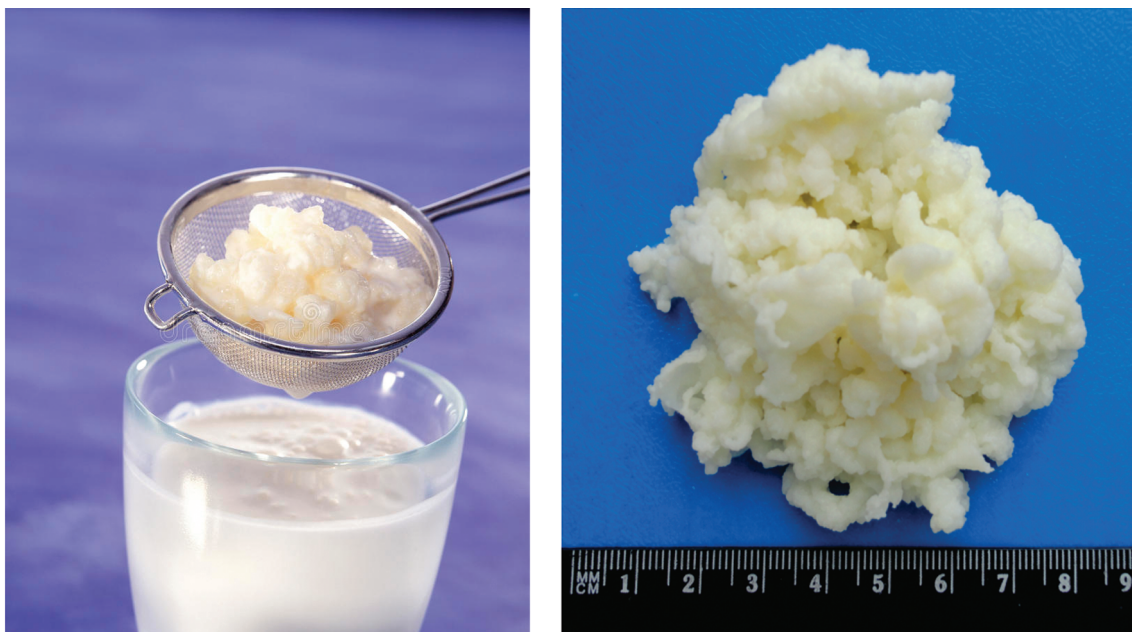


Рис. 1. Кефир и кефирное зерно (по Leitte et al., 2013).

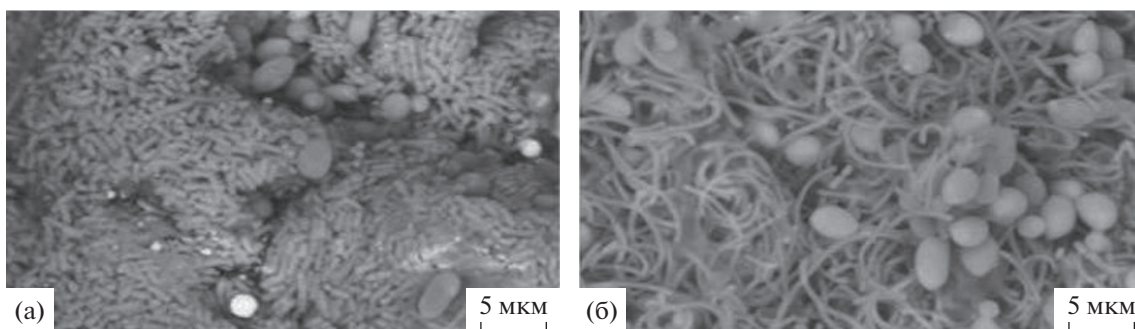


Рис. 2. Микроструктура кефирных зерен в электронном сканирующем микроскопе (JSM-7600F, Япония): наружный слой кефирного зерна (а); внутренний слой (б) (по Wang et al., 2012).

тые нерегулярные массы с эластичной консистенцией и размером от 0.3 до 3.5 см в диаметре (рис. 1, 2). 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.

Микробиота кефирных зерен представлена кокками и короткими и 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 поверхно-

сти 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 pH. Внутри зерен очень низкое значение pH, что 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, несмотря на то, что *L. lactis* определяли как один из доминирующих видов в тех же зернах при использова-

нии 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, выделенных 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 имеются и уксуснокислые бактерии, дрожжи и грибки (Witthuhn et al., 2005; Yang et al., 2007; Mayo et al., 2012; Gao et al., 2012, 2013). Различные сообщения (Prado et al., 2001; Kotova et al., 2016) свидетельствуют о том, что микробный состав кефирного зерна в значительной степени 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. kefirifaciens*, составляющие лишь 20% от общего количества МКБ (Gao et al., 2007; Wang et al., 2012; Zanirati 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, 2015), 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). В Китае выделены уксуснокислые бактерии, например, *Acetobacter fabarum* (Yang et al., 2007; Jianzhong et al., 2009; Gao et al., 2012), а *Acetobacter pasteurianus* — из кефиров, выработанных в странах Европы (Франция, Бельгия, Италия, Швейцария (Kok-Tas et al., 2012; Garofalo et al., 2015; Korsak 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. Окисляют спирт до уксусной кислоты в аэробных условиях (так называемое уксуснокислое брожение), некоторые могут окислять ацетат и лактат до CO₂ и H₂O, лактозу не гидролизуют (Montaghi et al., 1997).

В составе микробиоты кефиров производства китайских и турецких фирм обнаружены энтерококки *E. durans* (Yang et al., 2007; Kesmen, Kasmaz,

2011). 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 (Сычева, Карташова, 2015).

Кефир отличается от других кисломолочных продуктов тем, что он не является результатом метаболической активности одного или нескольких видов микроорганизмов.

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 *Kluveromyces marxianus*, *Candida kefir*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Torulospora delbrueckii*, *Pichia fermentans* и синонимы названий этих видов (табл. 2). Однако преобладающими видами являются *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kefir* и *Kluveromyces marxianus* ssp. *marxianus* (Fleet, 1990; Assadi, 2000; Loretan et al., 2003; Witthuhn et al., 2004, 2005; Kok-Tas et al., 2012; Diosma et al., 2014). 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, такие как аминокислоты и витамины, изменяют pH, выделяют этанол и производят CO₂. Дрожжи в кефире изучены менее, чем бактерии, хотя дрожжи в зернах явно обеспечивают среду, благоприятную для роста бактерий кефира, производя метаболиты, которые способствуют аромату и органолептическим свойствам (Farnworth, 2005). Более 23 различных видов дрожжей были выделены из зерен кефира и из ферментированных напитков различного происхождения.

Дифференциация и идентификация микробиома 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, 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

Таблица 1. Бактериальный состав кефирных зерен, выделенный из кефиров разных производителей

Бактериальный компонент	Источник – страна	Ссылка
<i>Lactobacillus</i> : <i>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</i> : <i>L. brevis</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. casei</i> ssp. <i>pseudoplanatarum</i> ; <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Болгария	Simova et al., 2002
<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, 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
<i>Enterococcus durans</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. kefir</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>	Китай	Yang et al., 2007 Jianzhong et al., 2009 Gao et al., 2012 Gao et al., 2013
<i>Lactobacillus kefir</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. paracasei</i> и <i>L. helveticus</i> , <i>Gluconobacter japonicus</i> , <i>Lactobacillus</i> : <i>L. uvarum</i> , <i>L. satsumensis</i> , <i>L. amylovorus</i> <i>L. buchneri</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. parakefir</i> ; <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. casei</i> ; <i>Leuconostoc</i> sp.	Бразилия	Miguel et al., 2010 Leite et al., 2012 Zanirati et al., 2015 Magalhães et al., 2011
<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> ; <i>Lactococcus lactis</i>	Италия	Garofalo et al., 2015
<i>Lactobacillus</i> : <i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> и <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Бельгия	Korsak et al., 2015
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> и <i>L. kefir</i>	Малайзия	Zamberi 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

Таблица 2. Дрожжевые компоненты, выделенные из кефиров разных стран

Дрожжевой компонент	Источник – страна	Ссылка
<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Kluyveromyces 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>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	Болгария	Simova et al., 2002
<i>Candida kefyр</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., 2011a
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Torulaspора delbrus</i> , <i>Torulaspора delbrueckii</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> sp., <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida holmii</i> , <i>Candida kefyр</i> , <i>Candida lambica</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Cryptococcus humicolus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Geotrichum candidum</i>	Южная Африка	Loretan et al., 2003 Witthuhn et al., 2004 Witthuhn et al., 2005
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Турция	Kok-Tas et al., 2012
<i>Brettanomyces anomalus</i> <i>Candida holmii</i> , <i>Candida kefyр</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 exiguous</i> <i>Saccharomyces unisporus</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Швейцария	Fröhlich-Wyder, 2003 Fleet, 1990

Таблица 2. Окончание

Дрожжевой компонент	Источник – страна	Ссылка
<i>Brettanomyces anomalus</i> <i>Candida friedrichii</i> , <i>Candida holmii</i> <i>Candida inconspicua</i> , <i>Candida kefyр</i> <i>Candida lambica</i> , <i>Candida maris</i> <i>Candida tenuis</i> , <i>Candida valida</i> <i>Candida tannotelerans</i> <i>Issatchenkia occidentalis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces dairensis</i> <i>Saccharomyces delbrueckii</i> <i>Saccharomyces exiguous</i> <i>Saccharomyces turicensis</i>	Канада	Farnworth, 2005
<i>Brettanomyces anomalus</i> <i>Candida famata</i> , <i>Candida firmetaria</i> <i>Candida friedrichii</i> , <i>Candida humilis</i> <i>Candida inconspicua</i> , <i>Candida kefyр</i> <i>Candida krusei</i> , <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida maris</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Cryptococcus humicolus</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Dekkera anomala</i> <i>Galactomyces geotrichum</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Kluyveromyces lodderae</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces exiguous</i> <i>Saccharomyces humaticus</i> <i>Saccharomyces pastorianus</i> <i>Saccharomyces turicensis</i> <i>Saccharomyces unispora</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Испания	Lopitz-Otsoa, 2006 Latorre-García et al., 2007
<i>Candida holmii</i> <i>Candida kefyр</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces fragilis</i> <i>Saccharomyces lactis</i>	Индия	Assadi, 2000
<i>Kazakhstania aerobia</i> <i>Kazakhstania salicola</i> <i>Kazakhstania serovazzii</i> <i>Kazakhstania turicensis</i> <i>Kazakhstania unispora</i>	Италия	Garofalo et al., 2015
<i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Kazakhstania unispora</i> <i>Kazakhstania exigua</i>	Китай	Jianzhong et al., 2009 Gao et al., 2012 Gao et al., 2013

бактерий проводили анаэробно при комнатной температуре (21°C) на агаризованной среде МРС в чашках Петри (90 мм). В таких условиях культуры вырастают за 3–5 сут. 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 морфологически, могут быть образованы одним и тем же микроорганизмом (Сычева, Карташова, 2015). Так, например, в неоптимальных или неблагоприятных для роста условиях при длительном воздействии физических, химических, биологических стрессов на микроорганизмы наблюдалось выщепление минорных фенотипов (субпопуляций) молочнокислых бактерий, образование жизнеспособных некультивируемых форм (Pachomov et al., 2018).

МКБ – филогенетически неродственные микроорганизмы, гетерогенные по морфологии: палочковидные и шаровидные (кокки сферической или эллипсоидной формы), которые характеризуют как грамположительные, не образующие капсул, спор (за исключением сем. *Sporolactobacillaceae*), не образуют пигмент, кроме *Leuconostoc citreum*, образующего капсулы и желтый пигмент, не восстанавливают нитраты в нитриты. Каталазо- и оксидазо-отрицательные, лишены цитохромов, аэро- и кислототолерантные, неподвижные, образующие в качестве конечного метаболита молочную кислоту в различном процентном содержании (Ленглер и соавт., 2005).

Исторически известны бактерии, относящиеся к родам *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Bifodobacterium*, но *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bifodobacterium* формируют ядро этой группы, а в последнее время к ним были добавлены такие рода как *Oenococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus* (Ленглер и соавт., 2005; 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 вы-

делить 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. 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 генов *groEL*, *rplB* и *rpoB* позволил выявить высокую полиморфность их нуклеотидных последовательностей 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 ген 16S рРНК. Нуклеотидные последовательности были анализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqScape 2.6.0 (“Applied Biosystems”).

К важным дифференцирующим признакам дрожжей относится их способность окислять и сбраживать различные углеводы, в том числе мальтозу, сахарозу, галактозу, трегалозу и др. Дрожжи способны расти в довольно широком диапазоне рН от 3 до 9, при этом предпочитают кислые среды (рН_{опт} 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 несколько десятков штаммов дрожжей разных таксономических групп предложено разделить 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, был использован 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 идентификацией с помощью анализа гена 16S рРНК, так и метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE) “без выделения чистых культур” (Magalhães et al., 2011; Shevtsov et al., 2011).

Комбинация всех вышеуказанных фено- и генотипических характеристик привела к возникновению нового полифазного метода дифференциации.

С целью молекулярной идентификации выделенных чистых культур бактерий проводили высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК с бактериальными праймерами. ДНК из образцов выделяли с использованием Fast DNA Spin Kit for Soil (“MP Biomedicals”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Коллекции ампликонов 16S рРНК были получены методом ПЦР с универсальными праймерами к V4 региону по ранее описанной методике (Yang et al., 2007; Mayoa et al., 2012). Были использованы следующие праймеры: 515F (5'-GTGBCAGCMGC-CGCGGТАА-3' (Стоянова, 2017) и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTMTСТААТСС-3' (Karaçali et al., 2018). Секвенирование проводили на приборе MiSeq system (“Illumina”, США) с использованием набора реагентов, считывающих по 150 нуклеотидов с каждого конца. Демультимплексирование, последующая обработка и анализ полученных сиквенсов были проведены с использованием соответствующих скриптов QIIME 2 программного обеспечения ver. 2019.1. Таблица OTU была составлена в программе SILVAngs (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>).

Высокопроизводительное секвенирование дрожжей по области ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК проводили после амплифи-

цирования ДНК выделенных дрожжей с использованием набора праймеров для ПЦР ITS1F и ITS1R. После амплификации полученные участки очищали магнитными шариками AMPure XP (“Beckman Coulter”, США) и готовили к секвенированию с помощью набора Nextera XT DNA в соответствии с инструкциями производителя (“Illumina”, США).

После каналов UPARSE сиквенсы были собраны, отфильтрованы и дереплицированы. 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. Таксономия и операционные таксономические единицы были преобразованы в таблицу с помощью программы biom-format V1.3.1 (Fonseca et al., 2007).

Программное обеспечение MEGAN использовалось для получения таксономической классификации микробов и отображения разнообразия кефирного зерна в соответствии с таксономией NCBI (Zamberi et al., 2016). На рис. 3 показан род *Lactobacillus* как наиболее распространенный (99.03%). Вторым по численности родом в зерне кефира была филлобактерия с общим содержанием 0.11%, за которой следовали ацинетобактер, стрептококк и бактероиды в следовых количествах. На рис. 4 показано разнообразие кефирного зерна на уровне видов, причем наиболее распространенными видами являются *Lactobacillus kefiranofaciens*, за которыми следует *L. kefir* (91.66 и 2.52% соответственно).

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

Метаболические и структурные взаимодействия дрожжей и бактерий

Полученные данные по идентификации позволили сделать вывод, что в кефирных зернах основным продуцентом системы могут быть молочнокислые бактерии, относящиеся к физиологической группе, активно использующих лактозу для молочнокислого брожения. Микроорганизмы, относящиеся к другой группе, используют продукты метаболизма лактозы (глюкозу и галактозу) и могут находиться между собой либо в отношениях пассивного антагонизма, либо кооперации. Изучая молочнокислое брожение в динамике развития культуры было установлено, что химические превращения в среде изменяются по ходу развития. При сбраживании углеводов ясно можно различить две фазы. В первый период (логарифмическая фаза роста бактерий) идет интенсивный синтез белков

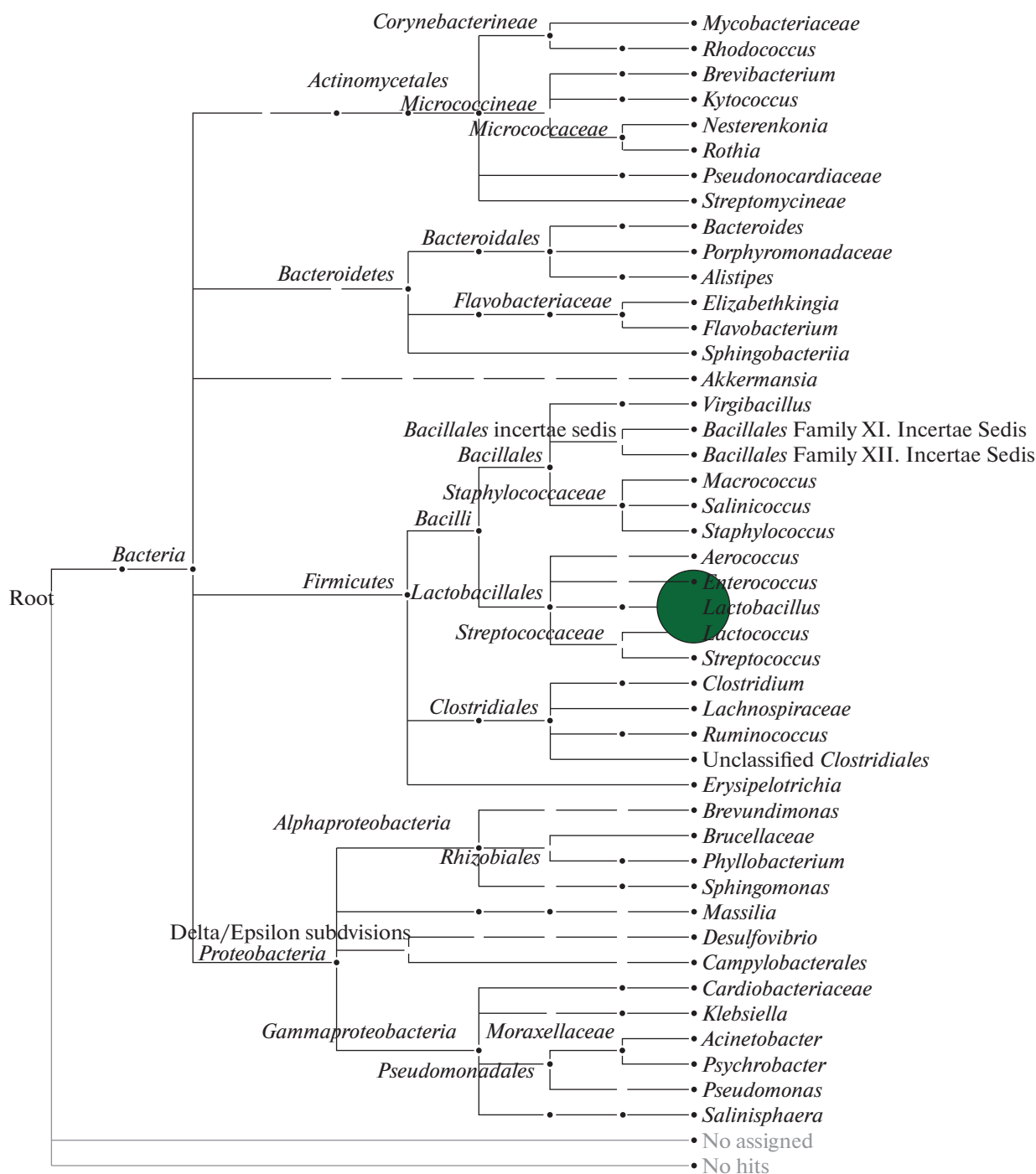


Рис. 3. Таксономическое дерево, полученное в результате анализа MEGAN для кефирного зерна на уровне рода (по Zanirat et al., 2015). Пятно указывает на наиболее распространенный род.

и других веществ клетки, которые являются более восстановленными, чем углеводы. В среде накапливаются более окисленные продукты обмена. Вторая фаза характеризуется замедлением биосинтеза, происходит постепенное снижение окислительно-восстановительного потенциала в культуре, что приводит к ускорению передачи протонов на

ФГК с последующим восстановлением ее в молочную кислоту. Двухфазность отражает перераспределение окислительно-восстановительных реакций по ходу биосинтеза структурных элементов клетки бактерий – конструктивных процессов и брожения – энергетического процесса. Тесные симбиотические отношения молочнокислых бактерий и

дрожжей, стимулирующее действие дрожжей на рост молочнокислых бактерий, показано многими исследователями (Motaghi et al., 1997; Aziza et al., 2012; Стоянова и соавт., 2017).

Сложные взаимодействия между дрожжами и бактериями, а также их зависимость от микробного состава кефирных зерен еще не полностью осознаны. Однако когда бактерии отделяются от зерна, дрожжи не будут расти так эффективно (Cheirsilp et al., 2003; Farnworth, Mainville, 2008; Rattray, 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.

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 pH 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 pH 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, единственного 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 ацетальдегидом” (комплекс фермент—оксиэтилтиаминпирофосфат). При восстановлении диацетила ацетоиндегидрогеназой образуется ацетоин (рис. 5).

Лактобациллы, такие как *Lactobacillus plantarum*, *L. reuteri*, *L. 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. Пируватоксидоза и фосфатацетилтрансфераза, используемые для синтеза ацетил-кофермента А (ацетил-КоА), индуцируются у *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *L. rhamnosus* в условиях кислотного стресса. Ацетил-КоА перенаправляется на биосинтез жирных кислот, которые могут усилить прочность и непроницаемость цитоплазматической мембраны (Leile et al., 2013).

Образование CO₂/удаление O₂. Углекислый газ может обеспечить подходящую атмосферу (пониженное содержание кислорода и повышенное содержание CO₂) 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 (Karaçali et al., 2018).

Обеспечение бактерий питательными веществами. Трофические взаимодействия и обмен метаболитами (перекрестное питание) позволяют нескольким группам микроорганизмов выживать при ограниченных ресурсах. Было показано, что дрожжи помогают бактериям, обеспечивая их витаминами, факторами роста и незаменимыми аминокислотами (Pahva et al., 2010; Ponomarova et al., 2017). Исследования показали (Stadie et al., 2013), что *Zygorhizopus florentinus* выделяет незаменимые аминокислоты, которые поддерживают рост *L. nagei* при совместном культивировании, 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 (Ponomarova et al., 2017) было замечено, что избыток азота в среде культивирования способствует возникновению мутуализма (форма взаимопользования сожительства, когда присутствие партнера становится обязательным условием существования каждого из них) дрожжей с *L. lactis*. Взаимодействие 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 важ-

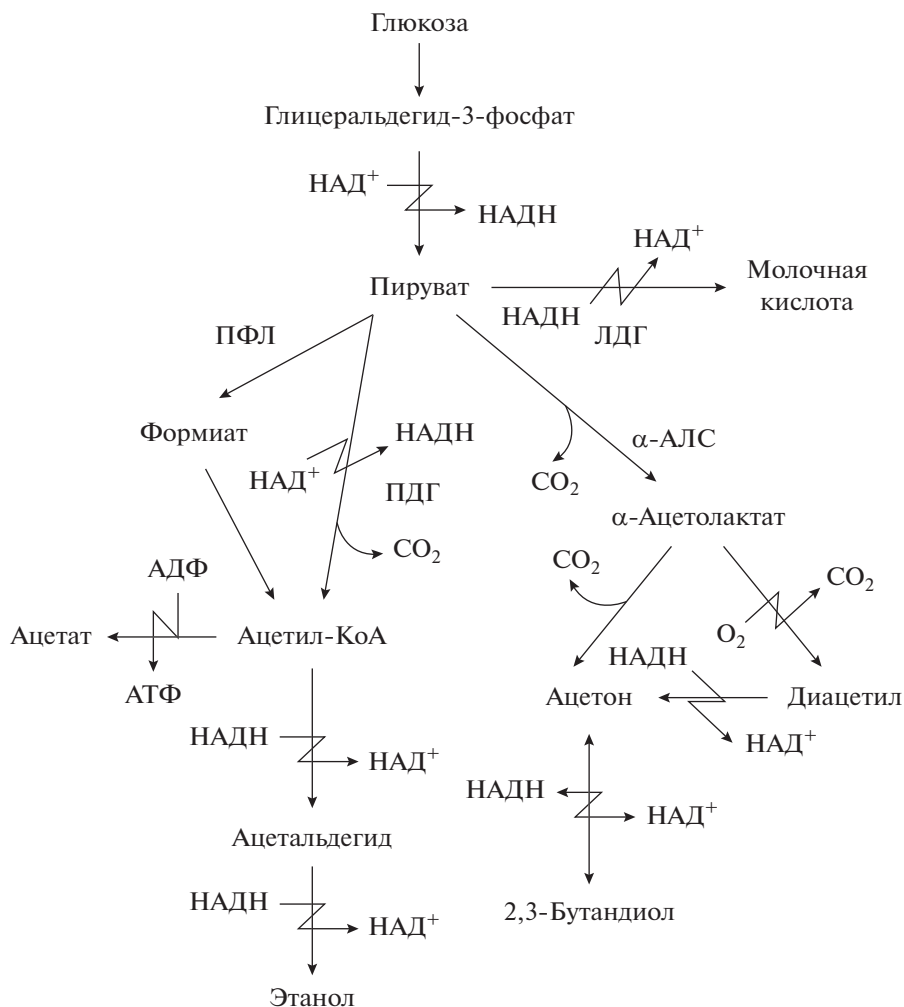


Рис. 5. Сбраживание глюкозы у *Lactococcus lactis* в аэробных условиях (по Miya et al., 2003): ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ПДГ – пируватдегидрогеназа; ПФЛ – пируват-формиатлиаза; α-АЛС – α-ацетолактатсинтаза.

ную роль в формировании межвидовых взаимодействий.

Сложные взаимодействия между дрожжами и бактериями, а также их зависимость в кефирных зернах еще не полностью изучены. Однако когда бактерии отделяются от зерна, дрожжи не будут расти так эффективно (Ratarura et al., 2010). Взаимодействие между дрожжами и МКБ занимает центральное место в широком спектре ферментированных продуктов, в том числе 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 физиологических групп молочнокислых бактерий по их способности

синтезировать фермент β-галактозидазу, необходимую для сбраживания лактозы, и показано, что выделенные дрожжи не обладали β-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 β-галактозидазной активностью, использующие лактозу для молочнокислого брожения и быстро закисляющие систему. Присутствие в системе нескольких видов молочнокислых бактерий, обладающих β-галактозидазной активностью, говорит о том, что между бактериями этой группы должны существовать определенные регулирующие факторы развития: либо конкурентные взаимоотношения

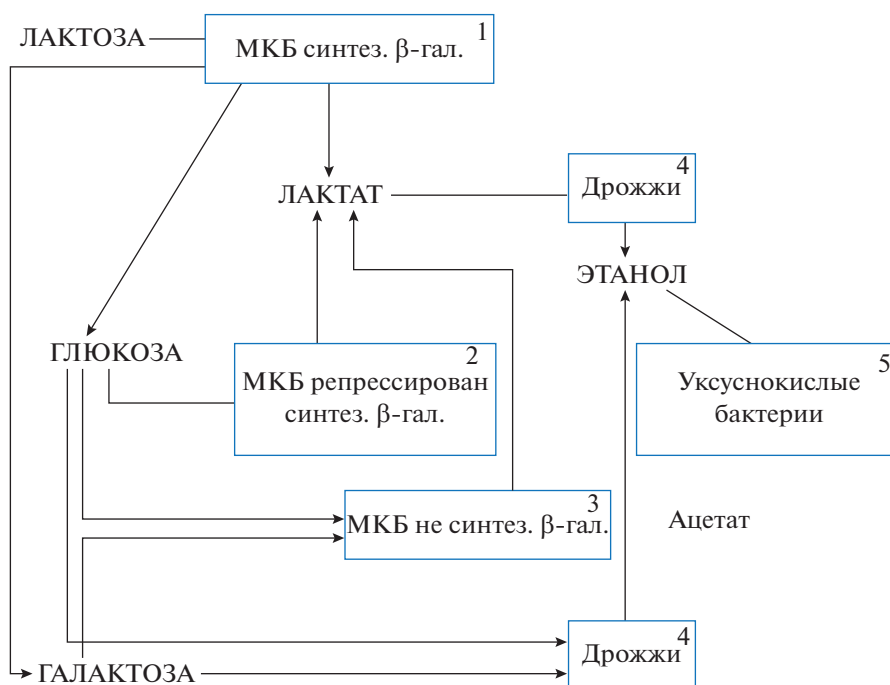


Рис. 6. Общая схема трофической цепи ассоциативной культуры кефирных зерен, сбраживающих и не сбраживающих лактозу (изменено по Cheirsilp, Radchabut, 2011). 1 – молочнокислые бактерии, синтезирующие β -галактозидазу; 2 – молочнокислые бактерии группы 1, у которых синтез β -галактозидазы репрессирован глюкозой; 3 – молочнокислые бактерии, не синтезирующие β -галактозидазу; 4 – дрожжи; 5 – уксуснокислые бактерии.

за субстрат, либо смена основного продуцента в зависимости от условий, в частности, изменение pH среды (Cheirsilp, Radchabut, 2011). Общая схема трофической цепи ассоциативной культуры кефирных зерен, в составе которых входят 3 группы МКБ: синтезирующие и не синтезирующие β -галактозидазу, с репрессивным синтезом β -галактозидазы группа МКБ, а также уксуснокислые бактерии и дрожжи представлена на рис. 6.

В зависимости от среды и условий культивирования микробиота кефирных зерен и кефирной закваски обладает уникальной способностью к саморегуляции. Симбиоз микроорганизмов в кефирных зернах обеспечивает сохранение на всем протяжении года качества кефира и микробного профиля кефирных зерен, лишь с незначительными изменениями соотношений основных групп микроорганизмов. 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. Так, например, молочнокислые бактерии р. *Lactococcus*, располагающиеся на поверхности кефирных зерен, легко десорбируются в культуральную жидкость и поэтому в кефире их достаточно много (Градова и соавт., 2014).

Ферментация и сохранение кефирных зерен

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 (в низком содержании) и CO_2 , которые придают этому напитку вязкость, кислотность и остроту. Также можно найти второстепенные компоненты, в том числе диацетил, ацетальдегид и аминокислоты, входящие в состав ароматизаторов (Ratray, O'Connell, 2011). Во время брожения зерна увеличиваются в размере и количестве и обычно извлекаются из ферментированного молока и повторно используются. При правильном хранении они могут сохранять свою активность в течение многих лет (Lopitz-Otsoa et al., 2006; Garrote et al., 2010; Rattra, O'Connell, 2011; Leite et al., 2013). 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 сниже-

нию метаболизма лактозы, а также изменениям бактериального профиля, который отличался от исходного профиля зерна (Farnworth et al., 2008). 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 изменяться 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 pH 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 в лабораторных условиях ограничена, он все еще может способствовать выработке свободных жирных кислот (Kim et al., 2002).

На производство кефира влияют несколько факторов: сырье, технология производства, условия хранения кефира и используемых кефирных зерен, которые необходимо оптимизировать параллельно для достижения наилучшего качества продукта. Повышение температуры культивирования с 20 до 30°C приводило к увеличению количества дрожжей (от 7.1×10^6 до 10^7 КОЕ/г кефирного зерна и от 1.2×10^5 до 1.7×10^6 КОЕ/мл в закваске), уксуснокислых бактерий (от 10^5 до 10^7 КОЕ/г в зерне и от 4.2×10^4 до 7.0×10^6 КОЕ/мл в закваске) и незначительно влияло на количество мезофильных молочнокислых бактерий в составе кефирных зерен (Schoevers, Britz, 2003; Хохлачева и соавт., 2006).

Однако в составе закваски более высокая температура ферментации 25°C приводила к быстрому снижению значений pH, что вызывало ингибирование роста гомо- и гетероферментативных молочнокислых стрептококков. В закваске, приготовленной при 25°C, отмечено большее количество молочнокислых палочек, чем в закваске, приготовленной при 18–20°C. 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. Биомасса, образованная при 25°C, превышает биомассу, образованную при 20°C, в 1.3–1.9 раз, а при 30°C – в 1.2–1.8 раз (Хамагаева, Ванданова, 2006). При встряхивании 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 из кефирных зерен и синтезированных 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.

Кефиран – это полисахарид кефирных грибков, который образуется уксуснокислыми бактериями и дрожжами, вовлеченных в процесс сбраживания молока. Он обладает противомикробным и ранозаживляющим свойствами, способностью снижать кровяное давление и уровень холестерина в сыворотке крови. Кефиран в концентрациях 5.9–14.3 г/л способен образовывать криогели, способные плавиться при 37°C, что может найти применение при разработке новых пищевых продуктов. Причем при добавлении сахарозы или фруктозы в разных концентрациях к растворам кефирана можно изменять вязкость полученных гелей (Градова и соавт., 2012; Zavala, 2015). Аэрация при культивировании кефирного зерна в молоке способствовала увеличению продукции экзополисахаридов и вызывала существенные различия в качественном и количественном составе зерен.

Кефирные зерна – это сложный симбиоз нескольких видов микроорганизмов: молочнокислых стрептококков и палочек, уксуснокислых бактерий и дрожжей. С помощью таких зерен можно каждый день получать кефир в домашних условиях. В последнее время популярность среди населения “кефирных зерен” неуклонно растет.

Кефирные зерна увеличивают свою массу в результате роста микроорганизмов и биосинтеза компонентов зерна – белков и полисахаридов. Микробиоту кефирного зерна можно считать биопленкой. Процессы, управляющие образованием биопленки, включают создание поверхности для прочного прикрепления клеток к этой поверхности, межклеточные взаимодействия и рост сложной структуры. Сообщалось о формировании биопленок некоторыми видами и описан ряд генов, которые, как полагают, отвечают за адгезию или образование

био пленки. Образование био пленки может помогает клеткам противостоять стрессу окружающей среды, такому как высокие концентрации кислоты и этанола.

Кефир содержит легкоусвояемые белки. 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 β -казеина; было обнаружено 236 пептидов, которые проявляли антимикробные, антиоксидантные, ингибирующие ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), иммуномодулирующие и анти тромботические эффекты (Nemet et al., 2013; Ebner et al., 2015). Выделенный из тибетского кефира и очищенный пептид F3 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). Продукт богат аминокислотами, такими как серин, треонин, аланин, лизин, валин, изолейцин, метионин, фенилаланин и триптофан, которые играют важную роль в центральной нервной системе, а также содержит метаболиты, которые способствуют перевариванию казеина и усвоению его организмом (Bensmira et al., 2015).

Известно, что пробиотические культуры кефира могут регулировать иммунную систему для подавления вирусных инфекций. Противовирусный механизм кефира включает усиленную продукцию макрофагов, усиленный фагоцитоз, повышенную продукцию с положительной дифференциацией CD4+/CD8+ как биомаркер ответа на лечение, иммуноглобулинов (IgG+ и IgA+), 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- α и II типа (IFN- γ) индуцируют анти вирусную защиту. Под влиянием чужеродных антигенов вырабатывается повышенное количество цитокинов — медиаторов воспалительного процесса, выполняющих регуляторные функции, которые, в свою очередь, продуцируют повышенное образование IL-6, вызывают 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; Boyoglu-Barnum et al., 2019; Bornstein et al., 2020).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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. Ферментация 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 отличия в количественных соотношениях, в кефирных зернах практически постоянно присутствуют четыре основные группы микроорганизмов: молочнокислые палочки, молочнокислые кокки, дрожжи и уксуснокислые бактерии. Каково синергетическое или антагонистическое влияние этих микробов друг на друга в процессе метаболизма смешанных бактерий? Можно ли определить один или несколько показательных микроорганизмов или показательных метаболитов для количественной оценки и оценки состояния ферментации кефирных бактерий? Ответы на эти вопросы не только закладывают теоретическую основу для изучения кефирных сообществ, но и служат руководством для исследования многих других микробных консорциумов. Противоречивы данные, позволяющие разработать концептуальную модель, включающую исследование микробного состава и трофических взаимоотношений компонентов сложившегося консорциума кефирных зерен, что является необходимым для конструирования новых сообществ и разработки способов управления стабильностью состава кефирных зерен при создании на их основе других продуктов функционального питания и фармацевтических препаратов, полезных для здоровья человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке правительства провинции Шэньчжэнь и Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне и в рамках научного проекта по выполнению государственного задания МГУ № 23-1-21 (регистрационный номер ЦИТИС 121032300094-7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ГОСТ 31454-2012. Кефир. Технические условия. gost-31454-2012.

Градова Н.Б., Хохлачева А.А., Мурзина Е.Д., Мясоедова В.В. Микробные компоненты кефирных грибов, как продуценты экзополисахарида кефирана // Биотехнология. 2014. № 6. С. 18–26.

Gradova N.B., Khokhlacheva A.A., Murzina E.D., Myasoe-dova V.V. Microbial components of kefir fungi, as a producer of kefiran exopolysaccharide // Biotechnology. 2014. № 6. P. 18–26.

Еникеев Р.Р. Описание, биосинтез и биологическое действие полисахарида кефирных грибов – кефирана // Биофармацевтический журн. 2011. Т. 3. № 3. С. 11–18.

Yenikeyev R.R. Description, biosynthesis and biological effect of kefir fungi polysaccharide – kefiran // Biopharmaceutical J. 2011. V. 3. № 3. P. 11–18.

Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты. М.: Мир, 2005. 656 с.

Lengeler J., Drews G., Schlegel G. (eds.) Biology of Prokaryotes. Wiley-Blackwell, 1999. 984 p.

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.

Oleskin A.V., Shenderov B.A. Probiotics, prebiotics and metabiotics: problems and prospects // Physical and Rehabilitation Medicine, Medical Rehabilitation. V. 2. № 3. P. 233–243.

Стоянова Л.Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2017. № 5. С. 41–61.

Stoyanova L.G. Isolation and identification of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* with antimicrobial action // News of the Timiryazev Agricultural Academy. 2017. № 5. P. 41–61.

Сычева М.В., Карташова О.Л. Биологические свойства энтерококков различного происхождения // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2015. № 4. С. 17–21.

Sycheva M.V., Kartashova O.L. Biological properties of enterococci of various origins // J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2015. № 4. P. 17–21.

Хамагаева И.С., Ванданова Е.В. Подбор условий культивирования симбиотической закваски для производства кефира // Пищевая и перерабатывающая промышленность. Реферативный журн. 2006. № 2. С. 95–98.

Khatmagayeva I.S., Vandanova Ye.V. Selection of conditions for the cultivation of symbiotic starter culture for the production of kefir // Food and Processing Industry. Abstract J. 2006. № 2. P. 95–98.

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. С. 466–447.

Khokhlacheva A.A., Egorova M.A., Kalinina A.N., Gradova N.B. Trophic patterns of functioning and microbial profile of an evolutionarily established associative culture of kefir grains // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 561–569.

Шендеров Б.А. Микробная экология человека и ее роль в поддержании здоровья // Метаморфозы. 2014. № 5. С. 72–80.

Shenderov B.A. Microbial ecology of man and its role in maintaining health // Metamorphoses. 2014. № 5. P. 72–80.

Amorim F.G., Coitinh L.B., Dias A.T., Friques A.G.F., Monteiro B.L., Rezende L.C.D., Pereira Th.M.C., Campagnaro B.P., Pauw E.D., Vasquez E.C., Quinton L. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteoepitomics: Bioprospection of antihypertensive molecules // Food Chem. 2019. V. 282. P. 109–119.

Assad 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.

Aziza M., Amrane A. Diauxic growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on amino acids and glucose // Braz. J. Chem. Engin. 2012. V. 29. P. 203–210.

Bornstein S.R., Rubin O.F., Khuntii K., Mingrone G., Hopkins D., Birkenfeld A.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.

Bourrie B.C.T., Willing B.P., Cotter P.D. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 647–664.

Boyoglu-Barnum S., Chirkova T., Anderson L.J. Biology of infection and disease pathogenesis to guide RSV vaccine development // Front. Immunol. 2019. V. 10. Art. 1675. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01675>

Cheirsilp B., Shimizu H., Shioya S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biotechnol. 2003. V. 100. P. 43–53.

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. P. 43–53.

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.

Fleet G.H. Growth of yeasts during wine fermentation // J. Wine Res. 1990. P. 211–223.

Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanh J., Mingsheng D. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis // Food Microbiol. 2009. V. 26. P. 770–775.

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. P. 346–359.

Farnworth E.R., Mainville I. Kefir – a fermented milk product // Handbook of Fermented Functional Foods / Ed. Farnworth E.R. 2nd edn. 2008. № 2. P. 89–127.

Farnworth E.R. Kefir a complex probiotic // Food Science and Technology Bull.: Functional Foods. 2005. V. 2. P. 1–17.

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.
- Gao J., 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. P. 425–433.
- Gao J., 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. P. 549–556.
- Garofalo C., Osimani A., Milanović 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. P. 123–133.
- Garrote G.L., Abraham A.G., De Antoni G.L. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios // J. Dairy Res. 1998. V. 65. P. 149–154.
- Garrote G.L., Abraham A.G., De Antoni G.L. Chemical and microbiological characterization of kefir grains // J. Dairy Res. 2001. V. 68. P. 639–652.
- 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. P. 25–29.
- 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 kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains // Food Microbiol. 2013. V. 36. P. 327–334.
- 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.
- 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. V. 86. P. 319–326.
- Karaçali 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. P. 921–933.
- 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. P. 276–283.
- Kim Y.J., Liu R.H. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria // J. Food Sci. 2002. V. 67. P. 1731–1737.
- 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. P. 126–131.
- Korsak N., Taminiu B., Leclerc, M., Nezer C., Crevecoeur S., Ferauche C., Detry E., Delcenserie V., Daube G. 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. P. 3684–3689.
- Kotova I.B., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process // Adv. Exp. Med. Biol. 2016. V. 4. P. 93–121.
- Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., von Wright A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 4th edn. CRC Press, 2011. 798 p.
- 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.
- Leite A.M.O., Leite D.C.A., del Aguila E.M., Alvares T.S., Peixoto R.S., Miguel M.A.I., Silva J.T., Paschoalin V.M.F. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes // J. Dairy Sci. 2013. V. 96. P. 4149–4159.
- Leite A.M.O., Miguel M.A., Peixoto R.S., Rosado A.S., Silva J.T., Paschoalin V.M.F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage // Braz. J. Microbiol. 2013. V. 44. P. 341–349.
- 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 characterization // J. Dairy Res. 2012. V. 79. P. 262–271.
- 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. P. 67–74.
- Loretan T., Mostert J.F., Viljoen B.C. Microbial flora associated with South African household kefir // South Afr. J. Sci. 2003. V. 99. P. 92–94.
- 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 // Braz. J. Microbiol. 2013. V. 44. P. 341–349.
- Mainville I., Robert N., Lee B., Farnworth E.R. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir // Syst. Appl. Microbiol. 2006. V. 29. P. 59–68.
- 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. P. 693–702.
- Mayoa 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. P. 215–221.
- Meier R., Steuerwald M. Place of probiotics // Curr. Opin. Crit. Care. 2005. V. 11. P. 318–325.
- 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.
- 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.
- 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.
- Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J.J., Le Loir Y., Costa Oliveira S., Langella P., Azevedo V. Oxidative stress in *Lactococcus* // Gen. Mol. Res. 2003. V. 3. P. 348–359.
- 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.
- 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. V. 7. P. 48.
- 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.
- Pakhomov Y.D., Blinkova L.P., Dmitrieva O.V., Berdyugina O.S., Stoyanova L.G. Non-culturable and nisin production of *Lactococcus lactis* // J. Bacteriol. Parasitol. 2013. V. 5. P. 2–8.

- Pogačić T., Sinko S., Zamberlin S., Samaržija D. Microbiota of kefir grains // *Mljekarstvo*. 2013. V. 63. P. 3–14.
- 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. P. 3972–3976.
- Prado M.R., Blandón L.M., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C., Castro G.R., Thomaz-Soccol V., Soccol C.R. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 01177.
- 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. P. 1–6.
- Schoevers A., Britz T.J. Influence of different culturing conditions on kefir grain increase // *Int. J. Dairy Technol.* 2003. V. 56. P. 183–187.
- 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 (Moscow)*. 2011. V. 80. P. 672–681.
- 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.
- Tamang J.P., Watanabe K., Holzapfel W.H. Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 377.
- Walsh A.M., Crispie F., Kilcawley K., O'Sullivan O., O'Sullivan M.G., Claesson M.J., Cotter P.D. Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir // *mSystems*. 2016. V. 1. e00052-16. P. 2–16.
- Wang S.Y., Chen K.N., Lo Y.M., Chiang M.-L., Chen H.-Ch., Liu J.-R., Chen M.-J. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain // *Food Microbiol.* 2012. V. 32. P. 274–285.
- Witthuhn R.C., Schoeman T., Britz T.J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains // *Int. J. Dairy Technol.* 2004. V. 57. P. 33–37.
- Witthuhn R.C., Schoeman T., Britz T.J. Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation // *Int. Dairy J.* 2005. V. 15. P. 383–389.
- 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.
- Yamane T., Sakamoto T., Nakagaki T., Nakano Y. Lactic acid bacteria from kefir increase cytotoxicity of natural killer cells to tumor cells // *Foods*. 2018. V. 7. P. 1–9.
- 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. P. 663–667.
- 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.
- Zamperi 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. P. 219–230.
- Zavala L. Gelling ability of kefir in the presence of sucrose and fructose and physicochemical characterization of the resulting cryogels // *J. Food Sci. Technol.* 2015. V. 52. P. 5039–5047. <https://ngs.arb-silva.de/silvangs>

Microbiome and Metabiotic Properties of Kefir Grains and Kefirs Based on Them

Ding Fan^{1, 2}, L. G. Stoyanova^{1, *}, and A. I. Netrusov^{1, 3}

¹Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

²Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, P.R. China

³Faculty of Biology and Biotechnology, High School of Economics, Moscow, 101000 Russia

*e-mail: stoyanova@mail.ru

Received March 20, 2022; revised March 24, 2022; accepted March 24, 2022

Abstract—The analysis of the literature on the microbiome composition and metabolic properties of kefir available at the RSCI and Web of Science was carried out. Kefir has been used by humans for centuries. It is a useful product of mixed lactic and alcoholic fermentation, produced using evolutionarily established associative cultures, collected in an aggregated state termed kefir grains. General characterization of kefir grains from the territorial zones of different continents (Russia, Europe, Asia, and America) is provided. The methods for differentiation and identification of individual species are described, as well as the interactions there within the community. The diversity of microbial composition of kefir grains depending on local cultivation conditions and storage processes is shown. The microorganisms present in kefir have a number of properties that determine their metabolism, interaction in the community, beneficial effects on human health and immune system, which is important for the prevention and control of bacterial and viral infections, especially during the COVID-19 pandemic.

Keywords: kefir, kefir grains, microbiota, differentiation, identification, community interaction, metabiotic properties