

DOI: 10.7868/S3034574X26010069

Оригинальная статья

УДК: 637.055

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЕФИРНЫХ ЗЕРЕН ИЗ РАЗНЫХ ТЕРРИТОРИАЛЬНЫХ ЗОН ИХ ИСТОРИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА КЕФИРОВ, ПРИГОТОВЛЕННЫХ НА ИХ ОСНОВЕ

Дин Фань<sup>1,2</sup>, А.И. Нетрусов<sup>2,\*</sup>, Л.Г. Стоянова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэнь, Шэньчжэнь, Гуандонг, Китай

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Российская Федерация

\*E-mail: anetrusov@mail.ru

**Аннотация.** Проведены исследования по сравнительному изучению кефирных зерен (КЗ) кустарного производства из разных территориальных зон их исторического происхождения: Северная Осетия (Кавказ), Тибетский район Китая и Московский регион (Россия) и кефиров, приготовленных с использованием этих КЗ. Изучена морфология КЗ, их ростовые характеристики. Используя молекулярно-генетические методы высокопроизводительного секвенирования V4 фрагментов генов 16S рРНК бактерий и области ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК дрожжей, установлены различия бактериального и дрожжевого состава в микробиомах этих кефирных зерен. Изучен антимикробный спектр действия кефиров, приготовленных на их основе. Показано, что кефиры подавляли рост разных групп бактерий и микроскопических грибов. Представленные результаты можно рассматривать как системы взаимоотношений дрожжей и бактерий в природных экосистемах, способствующих выделению новых морфотипов потенциальных пробиотических культур.<sup>1</sup>

**Ключевые слова:** кефир, кефирные зерна, микробиота, антимикробная активность, патогены, плесени, дрожжи

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке за счет грантов от Программы стабильной поддержки высших учебных заведений города Шэньчжэнь (20231129000520001) 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 каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ИСМЖЕ. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ экспериментальных данных, написание и редактирование текста статьи.

**Ссылка для цитирования:** Дин Фань, Нетрусов А.И., Стоянова Л.Г. Сравнительный анализ кефирных зерен из разных территориальных зон их исторического происхождения и антимикробные свойства кефиров, приготовленных на их основе. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 1. С. 77–90. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010069>

© Дин Фань, А. И. Нетрусов, Л. Г. Стоянова, 2026

<sup>1</sup> Сокращения: КЗ — кефирное зерно, МКБ — молочнокислые бактерии, ЖКТ — желудочно-кишечный тракт.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF KEFIR GRAINS FROM DIFFERENT TERRITORIAL ZONES OF THEIR HISTORICAL ORIGIN AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF KEFIR PREPARED BASED ON THEM

Ding Fan<sup>1,2</sup>, A.I. Netrusov<sup>2,\*</sup>, L.G. Stoyanova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, Guangdong, China

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

\*E-mail: anetrusov@mail.ru

**Abstract.** A comparative study was conducted between kefir grains (KG) collected from various regions of their historical origin: North Ossetia (Caucasus), the Tibetan region of China, and the Moscow region (Russia), and kefirs prepared using these KG. The morphology and growth characteristics of the KG were studied. Using molecular genetics, high-throughput sequencing of the V4 fragments of the 16S rRNA genes of bacteria and the ITS1 region of the 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S rRNA complex of yeast, differences in the bacterial and yeast composition of the microbiomes of these KGs were identified. The presented data can be considered as a system of interactions between yeast and bacteria in natural ecosystems, facilitating the identification of new morphotypes of potential probiotic cultures.<sup>2</sup>

**Keywords:** kefir, kefir grains, microbiota, antimicrobial activity, pathogens, molds, yeasts

**Funding.** This work was supported by grants from the Shenzhen Higher Education Institutions Stable Support Program (20231129000520001) and as part of a research project to fulfill Moscow State University State Assignment No. 23-1-21 (registration number CITIS 121032300094-7).

**Ethics declarations.** This article does not contain any studies involving humans or animals.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflicts of interest related to the publication of this article.

**Authors contribution.** The authors declare that their authorship complies with the international criteria of the International Medical and Medical Journal of the World Journal of Medical Sciences (ICMJE). All authors contributed equally to the preparation of this publication: concept development, acquisition and analysis of experimental data, and writing and editing the text.

**For Citation:** Ding Fan, Netrusov A.I., Stoyanova L.G. Comparative analysis of kefir grains from different territorial zones of their historical origin and antimicrobial properties of kefir prepared based on them. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(1):77–90. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010069>

---

<sup>2</sup> Abbreviations: KG – kefir grain, LAB – lactic acid bacteria, GIT – gastrointestinal tract.

## ВВЕДЕНИЕ

Кефир — это кисломолочный продукт смешанного молочнокислого и спиртового брожения, для производства которого используют закваску на кефирных грибках. Кефирный грибок — уникальный естественный симбиотический консорциум, который содержит до 50 различных видов бактерий и дрожжей, заключенных в матрицу из белка и полисахаридов [8].

Многочисленные комбинации этих микроорганизмов на уровне видов приводят к получению кефиров с уникальными характеристиками. Кефир начали изготавливать на Кавказе, в тибетских или монгольских горах, где до 2000 года до нашей эры кефирное зерно традиционно передавали из поколения в поколение. Он считался 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. Повсеместное распространение кефирных зерен как в России, так и в других регионах произошло много лет назад. Однако при более детальном изучении выявлено, что микробный состав кефирных зерен из разных регионов может различаться, что и обуславливает различия органолептических и биотехнологических свойств изготовленных кефиров. Технологии производства уникальны в каждом отдельно взятом регионе, следовательно, в процессе селекции были отобраны наиболее устойчивые к конкретным сложившимся условиям виды симбионтов кефирного зерна [5]. Точный микробный состав кефирных зерен до сих пор остается спорным. Наиболее распространенными бактериями в зернах кефира и кефире являются молочнокислые бактерии (МКБ), на долю которых приходится от 37 до 90 % микробной популяции. Ассоциативная микробная комбинация кефирных зерен является устойчивым, высокоорганизованным сообществом, обладающим сложными вертикальными и горизонтальными трофическими связями. Сложные взаимодействия между дрожжами и бактериями, а также их зависимость от кефирных зерен еще не полностью изучены. Однако, когда бактерии выделяли из зерна, дрожжи не росли так эффективно [6, 8].

На протяжении веков кефиру приписывали многие полезные свойства, его даже употребляли в качестве натурального лекарства.

Основными продуктами ферментации кефира являются молочная кислота, этанол и  $\text{CO}_2$ , которые

придают этому напитку вязкость, кислотность и низкое содержание алкоголя. Также можно найти второстепенные компоненты, в том числе диацетил, ацетальдегид и аминокислоты, входящие в состав ароматизаторов [11]. Кефир и его компоненты обладают антимикробной, противоопухолевой, антиканцерогенной и иммуномодулирующей активностью, а также улучшают усвоение лактозы. Аминокислоты с разветвленной цепью, которые также содержатся в кефире, улучшают когнитивное восстановление пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой [1].

Имеются данные о благоприятном влиянии кефира, используемого при лечении COVID-19, что проявлялось в повышении уровня лимфоцитов, снижении скорости оседания эритроцитов, улучшении насыщения кислородом крови и позволило снизить пагубное влияние цитокинового шторма. Авторы объясняют эти результаты противовоспалительным действием микробиоты кефира [12].

В настоящее время ряд научных исследований подтвердил пользу кефира для здоровья как пробиотического напитка с большим потенциалом, который можно производить в домашних условиях, имеющего низкую себестоимость производства и легко включаемого в рацион питания.

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. Исторический опыт и научные сообщения свидетельствуют о том, что микробный состав кефирного зерна зависит от его происхождения, а также местных условий культивирования.

В связи с этим сравнительный анализ микробного состава сообщества кефирных зерен, показателей качества кефирного напитка помогут выявить роль разных групп микроорганизмов в формировании заквасок и готового кефирного продукта.

*Цель работы* — сравнительный анализ кефирных зерен из разных территориальных зон и изучение антимикробных свойств кефиров, приготовленных на их основе.

## МЕТОДИКА

Для проведения исследований получали кефирные зерна (КЗ) из частных домохозяйств исторически традиционных регионов их происхождения, включая Московский регион (N5), Северную Осетию (OS) и Тибетский район Китая (T2-3). Зерна

хранили в лиофильно высушенном состоянии в коллекции культур кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

***Культивирование кефирных зерен в лабораторных условиях.***

Лиофилизированные кефирные зерна (0,1 г) помещали в 20 мл стерильного молока (1,5 % жирности) и культивировали в пробирках Фалькон на 50 мл при комнатной температуре (21°C) в течение месяца для оживления культур при постоянных пересевах. 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 молоком. Кефирные зерна культивировали путем последовательного высева зерен в увеличивающихся объемах молока для поддержания концентрации массы КЗ до 10 % [2].

*Сканирующая электронная микроскопия кефирных зерен.* Кефирные зерна промывали стерильной водой и помещали в 2,5%-ный глутаровый альдегид, приготовленный на 0,1 М фосфатном буфере (мМ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,8;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  - 10;  $\text{NaCl}$  - 137;  $\text{KCl}$  - 2,7, затем обезвоживали в этиловом спирте возрастающей концентрации (30, 50, 70 %, 80, 90 и 100 %) с выдержкой по 10 мин. Далее образцы помещали в абсолютный спирт и высушивали гидратированный материал методом «критической точки» в HCP-2 Critical Point Dryer (Hitachi, Япония). Высушенные препараты прикрепляли на специальные столики двусторонней клейкой лентой и напыляли смесью Au-Pd в ионно-распылительной установке Eiko IB-3 Ion Coater (Hitachi, Япония). Морфологические характеристики изучаемых образцов кефирных зерен изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа SU-8010 (Hitachi, Япония).

*Высокопроизводительное секвенирование гена 16S рНК с бактериальными праймерами.* Состав микробиомов и их таксономическую принадлежность определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 16S рНК бактерий в области V4 фрагментов генов 16S рНК бактерий [4, 14, 16].

ДНК из образцов была выделена с использованием Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA) в соответствии с инструкцией производителя. Были использованы следующие праймеры: 515F (5' GTGBCAGCMGCCGCGGTAA 3'; [12] и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTTMTCTAATCC 3'. Секвенирование проводили на приборе MiSeq system (Illumina, США) с использованием набора

реагентов, считающих по 150 нуклеотидов с каждого конца. Демультимплексирование, последующую обработку и анализ полученных сиквенсов проводили с использованием соответствующих скриптов QIIME 2 программного обеспечения ver.2019.1.

*Высокопроизводительное секвенирование ДНК дрожжей по участку ITS1.* Область ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рНК была амплифицирована из ДНК выделенных дрожжей с использованием набора праймеров для ПЦР: ITS1F и ITS2R. После амплификации полученные участки очищали магнитными шариками AMPure XP (Beckman Coulter, США) 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 дуплицированы [4].

Операционные таксономические единицы (OTUs) были объединены в группы с идентичностью последовательности  $\geq 97$  %, из которых были удалены химеры. Таксономическая идентичность была установлена с использованием BLAST 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.

***Изучение антимикробного спектра 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 с использованием стандартных растворов коммерческих препаратов антибиотиков. Уровень активности рассчитывали по стандартной кривой с учетом разведений растворов стандартных антибиотиков, специфичных для каждой группы микробов [19].

При изучении спектра ингибирующего действия в качестве тест-культур использовали представителей разных групп бактерий: грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* 144; грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922 (из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова), а также штаммы микроскопических грибов из коллекции микроорганизмов ФГБУНИИ по изысканию новых антибиотиков —

*Aspergillus niger* INA 00760 и дрожжи *Candida albicans* INA 00763. Бактерии *E. coli*, *S. aureus* выращивали на мясо-пептонном агаре (МПА) при 37 °С. Микромицеты выращивали при 28 °С на среде Сабуро, следующего состава (г/л): глюкоза — 40,0; пептон — 10,0; агар-агар — 20,0; левомецетин — 10 мкг/мл. Таблетки левомецетина (Ирбитский химико-фармацевтический завод) по 0,5 г растворяли в стерильном буфере с рН 5,5 и добавляли в среду культивирования грибов.

Экстракцию антибиотика из кефиров 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 0,12 мкл растворов вносили в лунки на газон плотной агаровой среды в планшетах или в чашках Петри с засеянной тест-культурой. Уровень антимикробной активности определяли по величине зон подавления роста тест-культур вокруг лунки с дальнейшим пересчетом по калибровочной кривой. Фосфатный буфер с рН 5,5 для титрования антибиотика готовили на дистиллированной воде, растворяя в 1 л 6,64 г калия фосфорнокислого однозамещенного и 0,142 г калия фосфорнокислого двузамещенного. Буфер стерилизовали при 1 атм 20 мин. Растворы тест-культур в буфере с оптической плотностью ОП=0,7 при 540 нм ( $1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$  КОЕ/мл) вносили в лунки на агаризованную среду. Использовали суточные тест-культуры бактерий или грибов, которыми засеивали среды МПА или Сабуро, соответственно. По зоне задержки роста судили об ингибиторной способности кефиров по отношению к разным группам микроорганизмов.

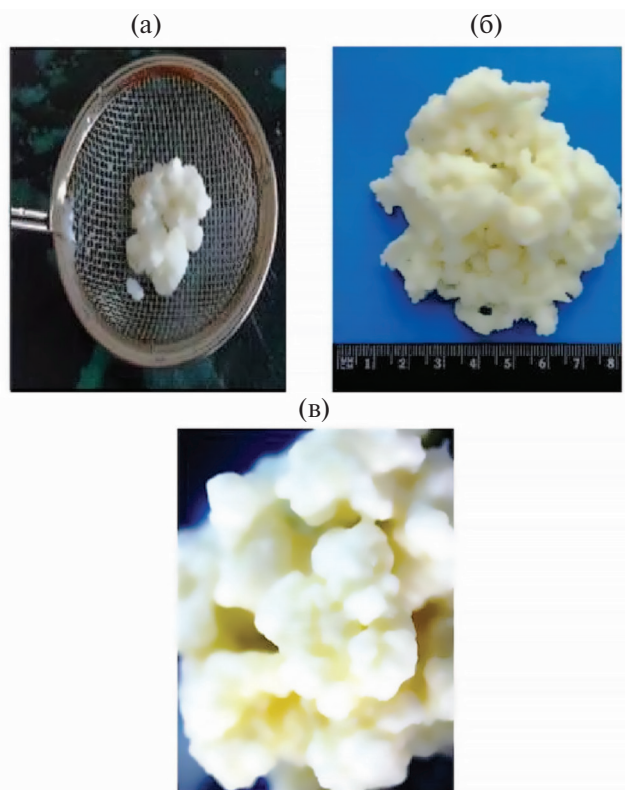
В качестве стандарта для подавления роста грамположительных бактерий использовали коммерческий препарат низина Nisaplin (Aplin&Barrett, Великобритания) с активностью  $1 \times 10^6$  МЕ/г, на грамотрицательные бактерии — растворы левомецетина в буфере с рН 5,5. (по 0,5 мг ОАО «Татхим-фармпрепараты», Россия) по 100, 50 и 25 ед./мл. Для подавления микромицетов использовали растворы по 100, 50, 40 ед./мл коммерческого препарата нистатин (Sigma, США) с активностью 4670 ед/мг.

Стерильные чашки Петри заливали 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 — коммерческих препаратов антибиотиков. После 24 ч инкубирования измеряли диаметр зон задержки роста тест-культур и рассчитывали уровень активности образцов кефиров.

*Статистическая обработка экспериментальных данных.* Опыты проводили в трехкратных биологических и аналитических повторностях. Статистическую обработку данных проводили с использованием MS Excel. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Обсуждались различия, достоверные при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кефирные зерна, полученные из частных домохозяйств в Осетии, Тибетском регионе Китая и Московском регионе, имели схожие морфологические характеристики: студенистые белые или слегка желтые массы эластичной консистенции, поверхность кефирных зерен бугристая, состоящая из скопления клеток, сверху покрытая желатиноподобным матричным веществом в виде тонкой полисахаридной пленки. Эти компактные образования неправильной формы со складчатой или бугристой поверхностью, с упругой консистенцией, по форме и цвету напоминают маленькие головки цветной капусты (рис.1).



**Рис. 1.** Вид кефирных зерен, выделенных из кефира: а — образец № 5 (Москва), б — OS (Осетия), в — N2-3 (Тибет)

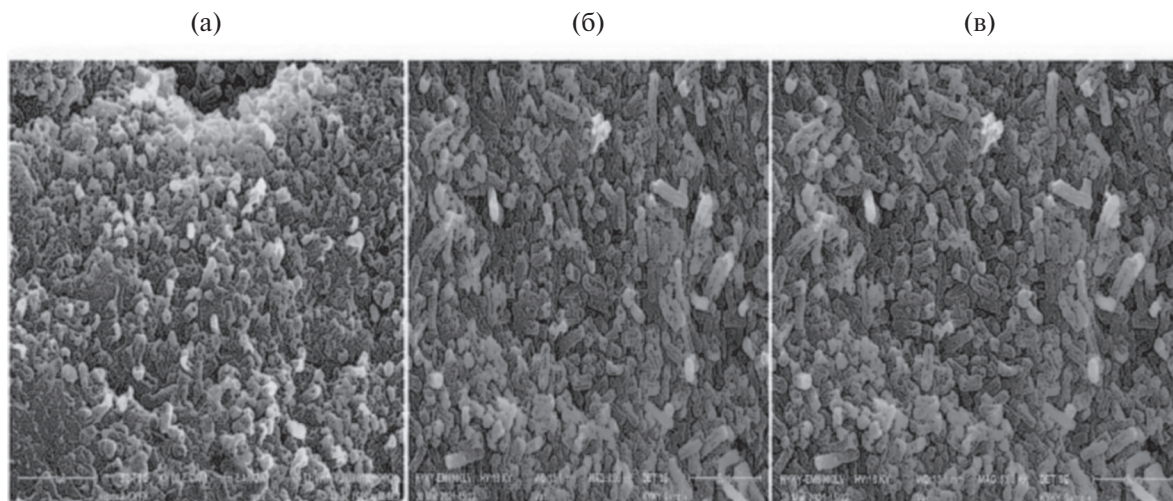
**Fig. 1.** Type of kefir grains isolated from kefir: a — sample No. 5 (Moscow), b — OS (Ossetia), c — N2-3 (Tibet)

Их размер варьирует от нескольких миллиметров до 2–4 см.

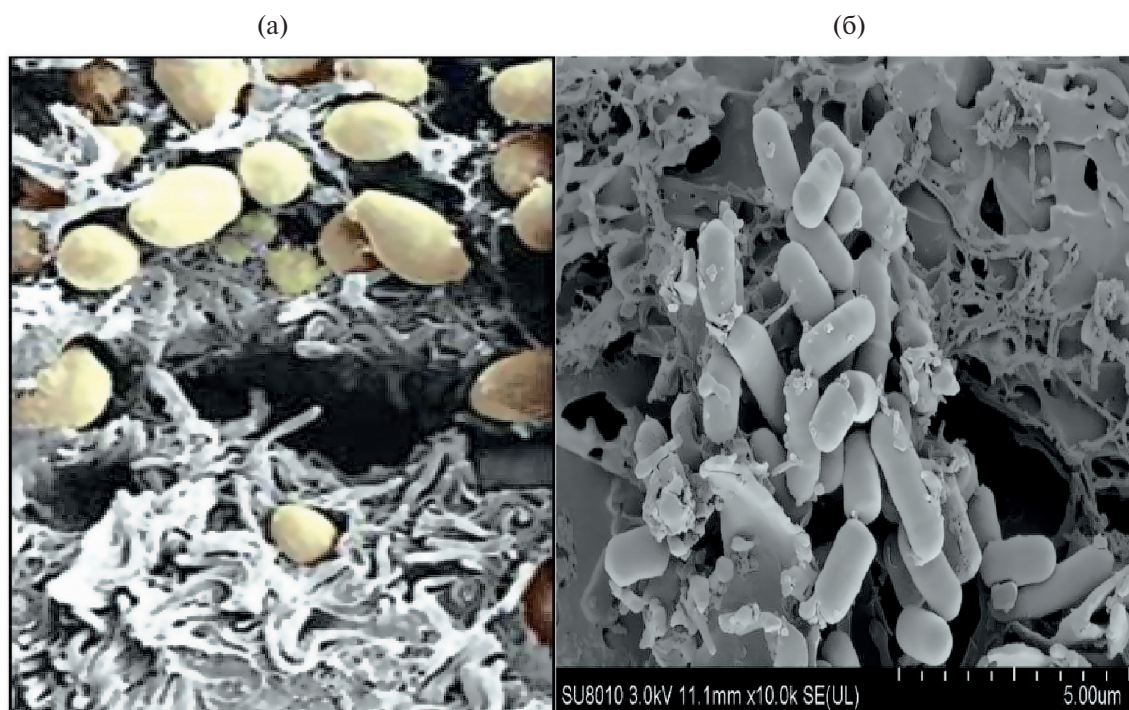
Электронно-микроскопические исследования кефирных зерен, полученных из Москвы, Осетии и Китая (район Тибета), показали, что микробиота кефирных зерен представлена дрожжевыми клетками лимонобразной и вытянутой

формы, которые находятся в тесном соседстве с кокками и короткими или длинными палочками (рис. 2 и 3).

В сканирующем электронном микроскопе при большем увеличении (рис. 3) показано пространственное распределение микроорганизмов в кефирных зернах.



**Рис. 2.** Вид кефирных зерен из разных регионов, выделенных из кефиров, в сканирующем электронном микроскопе (HITACHI SU-8010), увеличение 1x 5 000 раз. Примечание: а — Московского региона; б — Осетии; в — Тибета  
**Fig. 2.** View of kefir grains from different regions, isolated from kefirs, in a scanning electron microscope (HITACHI SU-8010), magnification 1x 5000 times. Note: a — Moscow region; b — Ossetia; c — Tibet



**Рис. 3.** Вид поверхности и середины кефирного зерна (образец КЗ из Москвы) в сканирующем электронном микроскопе (HITACHI SU-8010), увеличение — а и б в 5000; в — в 10000 раз  
**Fig. 3.** View of the surface and the middle of a kefir grain (sample KZ from Moscow) in a scanning electron microscope (HITACHI SU-8010), magnification — a and b 5000 times; c — 10000 times

Короткие палочки расположены ближе к поверхности грибка, а длинные и изогнутые тонкие палочки — 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 наиболее прочно связаны со стромой кефирных зерен, они концентрируются в большей степени на поверхности КЗ. Плотность расположения микробных клеток во внутренней части кефирных зерен ниже, чем на поверхности.

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. Распределение микроорганизмов на поверхности и внутри зерен зависит от их отношения к кислороду, а также связано с различиями значений pH. Распределение микроорганизмов в зернах из других регионов было сходным.

Внутри зерен очень низкое значение pH, которое ингибирует рост лактококков. В связи со слабой адгезирующей способностью у *Lactococcus lactis* многие исследователи при использовании

электронной микроскопии не обнаруживали присутствие кокков в составе кефирных зерен, несмотря на то, что *L. lactis* определяли как один из доминирующих видов в тех же зернах при использовании других методов выделения [3, 5, 8].

Используя молекулярно-генетические методы, включая метод высокопроизводительного секвенирования V4 фрагментов генов 16S рРНК бактерий и области ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК дрожжей, установлено разнообразие микроорганизмов в изучаемых образцах кефирных зерен (табл.1). Бактерии родов *Lactococcus* и *Lactobacillus* идентифицированы во всех исследуемых образцах КЗ, но в разных соотношениях, что согласуется с результатами исследований многих авторов [5, 6, 18]. Так, в кефирных зернах заквасок из московского региона их присутствие почти равное и составляет 41 и 40 % соответственно; в образцах из Тибета (Т2-3) присутствовало на 9 % больше лактобацилл, а в образцах КЗ из Осетии число бактерии рода *Lactococcus* на 16 % больше, чем *Lactobacillus* при их суммарном (84 %) доминировании в микробиоме (табл. 1).

**Таблица 1.** Бактериальный состав микробиоты кефирных зерен из разных регионов по результатам высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК ( $p \leq 0,05$ )

**Table 1.** Bacterial composition of the microbiota of kefir grains from different regions based on the results of high-throughput sequencing of 16S rRNA genes ( $p \leq 0.05$ )

Образцы кефирного зерна, шифр	Бактериальные культуры, род, %						
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Acetobacter</i>	Другие
№ 5	41	40	9	4	н/о	н/о	6
OS	34	50	11	1	2	н/о	2
Т2-3	45	32	2	1	2	18	н/о

Следовательно, представители именно этих двух родов несут основную ферментационную нагрузку в биотехнологическом процессе получения кефира.

Обращает также внимание факт наличия представителей рода *Leuconostoc* во всех исследованных нами образцах КЗ, хотя и в разных соотношениях: 9 % найдено в КЗ из московского региона, 11 % — из Осетии и лишь 2 % — из Тибета. Представители этого рода известны своими способностями образовывать полисахаридные пленки в аэробных условиях и проводить гетероферментативное молочнокислое брожение [1, 5].

В КЗ из Тибета идентифицированы 18 % уксуснокислых бактерий рода *Acetobacter*, что подтвердило результаты китайских исследователей [10]. Уксуснокислые бактерии *Acetobacter fabarum*, *Acetobacter pasteurianus* выделены из кефира, распространенных в странах Европы: Франции, Бельгии, Италии, Швейцарии [2, 8]. 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 уксуснокислое неполное окисление). Некоторые штаммы могут окислять ацетат и лактат до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , лактозу не гидролизуют. В образцах из Осетии и Тибета обнаружены в незначительных количествах (1–2 %) МКБ родов *Streptococcus* и *Enterococcus*.

В микробиоме КЗ из Осетии и Тибета идентифицированы бактерии родов *Streptococcus* и *Enterococcus*, составляющие всего 1–2 % от общего числа выявленных бактерий других родов. Термотолерантные МКБ *Streptococcus thermophilus* и *Enterococcus durans* были обнаружены также в составе микробиоты кефиров производства китайских и турецких фирм [5, 6, 8], что является естественным для КЗ из территорий с жарким климатом. Молочнокислые бактерии рода *Enterococcus*, включающие *E. durans* (ранее относилась к стрептококкам серологической группы D и E), колонизируют кишечник человека в первые недели его жизни и являются незаменимой культурой, участвующей в процессах переработки пищи.

Практически в любом кисломолочном продукте, приготовленном с использованием естественных заквасок, присутствуют дрожжи. Несмотря на их широкое распространение, кефирные дрожжи изучены меньше, чем бактерии, присутствующие в кефирных зернах. Рост и развитие дрожжей происходит во много раз медленнее деления молочнокислых бактерий (МКБ). Исходя из этого, их концентрация в продуктах гораздо меньше, чем МКБ, и, как следствие, обнаружение дрожжей происходит реже. Классические методы исследования микробного состава посредством высева на твердые среды отмытых и ресуспендированных фрагментов исследуемых кефирных зерен показали, что коли-

чество дрожжей в ассоциированном сообществе каждого зерна почти в 10 раз меньше количества бактерий (рис. 2, 3). МКБ расщепляют лактозу до простых сахаров, усваиваемых дрожжами. В свою очередь, дрожжи синтезируют витамины группы B, необходимые для роста и развития ауксотрофных МКБ [6].

Почкующиеся аскомицетные дрожжи, относящиеся к семейству *Saccharomycetaceae*, — повсеместно распространенные микроорганизмы, важные для производства продуктов питания и медицины. Благодаря недавним интенсивным геномным исследованиям таксономия дрожжей становится все более структурированной, основываясь на выявлении монофилетических таксонов, подразумевающих происхождение всех представителей таксона от одного общего предка, когда данный таксон включает в себя всех потомков соответствующего общего предка.

При сравнении дрожжевого состава микробиомов КЗ из разных территориальных зон установлено, что у всех КЗ присутствуют дрожжи *Kazachstania unispora* и *K. turicensis* — нетрадиционные виды дрожжей, относящиеся к семейству *Saccharomycetaceae*. Причем в КЗ из Тибета доминирующими (88 %) являются *K. unispora*, а в образце OS — *K. turicensis* (83 %).

В образце № 5 дрожжи *K. turicensis* составляют 45 % всего дрожжевого состава микробиома, но в этом образце присутствуют также дрожжи *Kluyveromyces maxianus* (38 %) и *K. dobzhenskii* (7 %). В небольшом количестве (4 %) были идентифицированы в КЗ из Осетии дрожжи *Pichia kluyveri*, которые не были идентифицированы в других КЗ.

В китайском образце T2-3 выявлены *Kluyveromyces maxianus* в количестве всего 3 % от общей суммы дрожжевого состава микробиома этих КЗ (табл.2).

**Таблица 2.** Дрожжевой состав микробиоты кефирных зерен из разных регионов, определенный высокопродуктивным методом метагеномного анализа ( $p \leq 0,05$ )

**Table 2.** Yeast composition of the microbiota of kefir grains from different regions, determined by a high-throughput metagenomic analysis method ( $p \leq 0.05$ )

Образцы кефирного зерна, шифр	Дрожжевые культуры, %				
	<i>Kazachstania unispora</i>	<i>Kazachstania turicensis</i>	<i>Kluyveromyces maxianus</i>	<i>Kluyveromyces dobzhenskii</i>	<i>Pichia kluyveri</i>
№ 5	10	45	38	7	н/о
OS	13	83	3	н/о	4
T2-3	88	9	н/о	н/о	н/о

Примечание: № 5 (Москва); OS (Осетия); T2-3 (Тибет); н/о — не обнаружено.

Представители дрожжевого сообщества кефирных зерен рода *Kazachstania* считаются специфичными для заквасочных культур и обладают пробиотическими свойствами.

*Kluuyveromyces marxianus* — это аэробные дрожжи, способные к респиро-ферментативному метаболизму, который заключается в одновременном генерировании энергии как за счет дыхания через цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), так и за счет спиртового брожения. Эти аскомицетовые дрожжи с выраженными термотолерантными свойствами применяют в биотехнологической промышленности для производства ферментов, в частности инулиназы,  $\beta$ -галактозидазы и пектиназы. *K. marxianus* также используют в сельском хозяйстве и в пищевой промышленности, в том числе для получения этанола, ароматических соединений и в качестве заквасочных культур. Установлена безопасность этих дрожжей для здоровья [17].

Представители дрожжей рода *Pichia* не способны усваивать лактозу. Ферментация других углеводов зависит от вида этих дрожжей. В частности, *Pichia kluyveri* сбраживают глюкозу и не сбраживают галактозу, сахарозу, мальтозу, рафинозу или трегалозу. Вышеуказанные дрожжи были ранее выделены из кефиров, производимых в Турции, Аргентине и в странах с жарким климатом [3, 5, 8, 2].

Для определения роста кефирных зерен в молоке гравиметрическим методом были взяты фрагменты зерен приблизительно одинаковой массы. Результаты исследований по изучению накопления биомассы КЗ при периодических пересевах через 24 ч инкубирования накопленной и отмытой от слизи биомассы разных зерен показали, что после 12 суток последовательного инкубирования КЗ в обрате биомасса зерна кефира из Осетии увеличилась на 61 %, из Тибета — на 56 %, а из Московской области — на 65 % по сравнению с исходным весом исследуемых КЗ (табл. 3).

**Таблица 3.** Прирост биомассы кефирных зерен, отобранных из разных регионов, при пересевах в течение 12 суток

**Table 3.** Increase in biomass of kefir grains selected from different regions during reseeded for 12 days

Шифр образца	Биомасса (г) кефирных зерен при пересевах, сутки				Прирост биомассы за 12 сут, %
	1	4	8	12	
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

За время проведения эксперимента были получены значения масс кефирных зерен установленной зависимости роста КЗ от времени созревания кефира. Прирост биомассы КЗ свидетельствовал о симбиотических взаимоотношениях микроорганизмов микробиоме кефирного продукта.

Во время сбраживания молока кефирные зерна увеличиваются в размере, в дальнейшем их обычно извлекают из кефира и промывают через сито (рис. 1), а затем повторно используют. При соблюдении режимов хранения КЗ могут сохранять свою активность в течение многих лет [15].

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

циума таксономически отдаленных микроорганизмов — сбалансированного сообщества. Основным маркером для оценки симбиотических отношений между различными микроорганизмами в сообществе является прирост биомассы во время ферментационного процесса.

Одним из важных показателей пробиотических культур и продуктов функционального питания является способность подавлять рост и развитие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Ингибиторный эффект консорциума кефирных зерен как закваски складывается из синтеза кислот, ацетоина, спиртов и других метаболитов, образующихся при сбраживании молока. Физиологическим свойством практически всех бактерий

является синтез бактериоцинов — белковых метаболитов, обладающих ингибиторным действием на разные группы бактерий. Имеет место штаммовая специфичность в отношении синтеза бактериоцинов [19]. В результате проведенных исследований *in*

*vitro* установлено, что кефир, полученный на основе изучаемых образцов КЗ, проявлял антимикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также антимикотическую активность в отношении грибов (табл. 4).

**Таблица 4.** Антимикробный спектр действия кефиров, приготовленных на основе кефирных зерен из разных территориальных зон, в динамике культивирования ( $p \leq 0,05$ )

**Table 4.** Antimicrobial spectrum of action of kefir prepared on the basis of kefir grains from different territorial zones, in the dynamics of cultivation ( $p \leq 0.05$ )

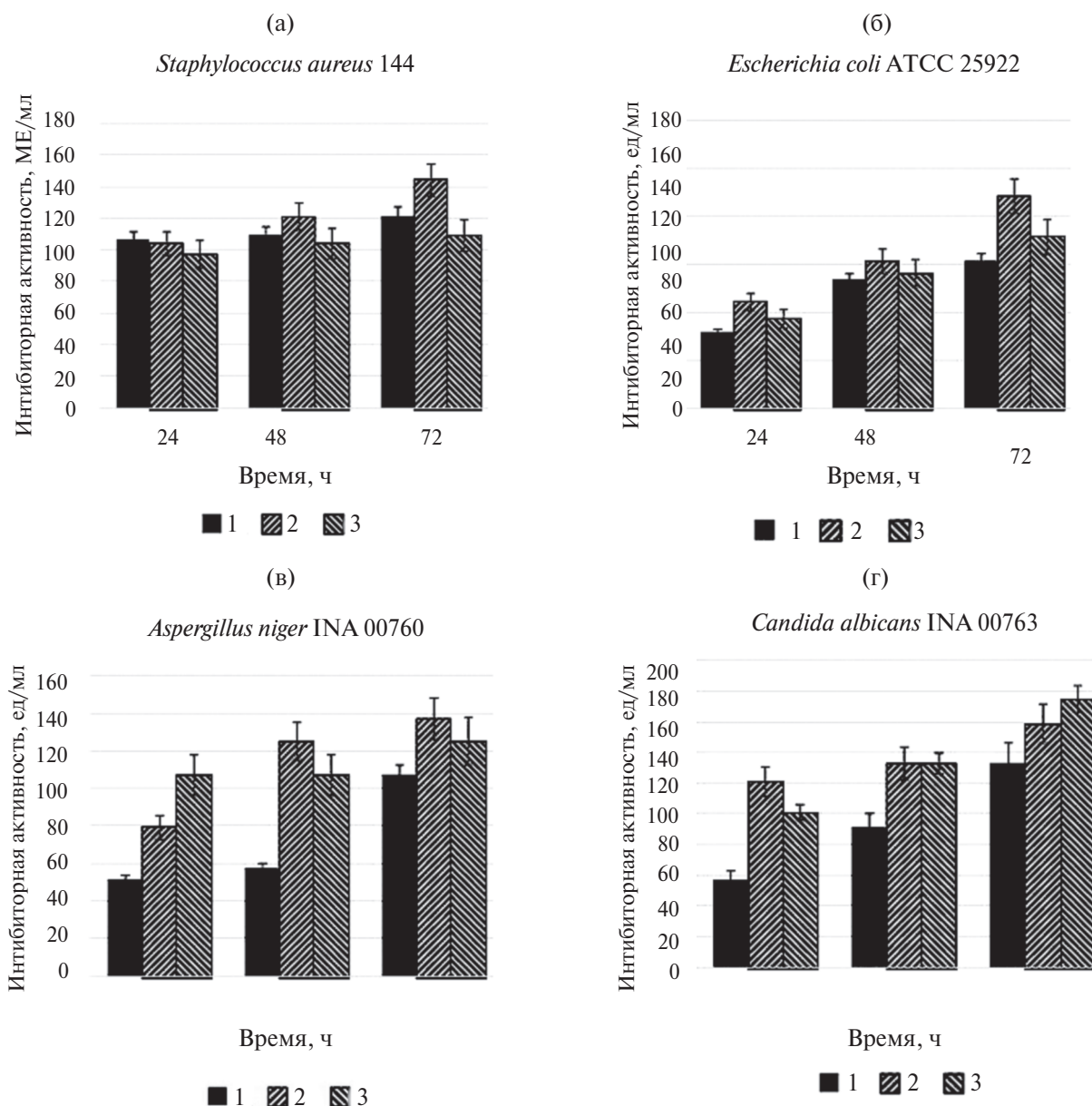
Тест-культура	Образец	Время культивирования в обороте, ч						Стандарты антибиотиков
		24		48		72		
		д, мм	А	д, мм	А	д, мм	А	
<i>Staphylococcus aureus</i> 144	1	14	106	15	110	16	122	Низин МЕ/мл
	2	13	105	16	122	17	145	
	3	12	98	13	105	15	110	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	14	32	18	54	20	62	Левометицин, ед./мл
	2	16	52	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	
	3	14	102	16	134	18	176	

Примечание: 1 — КЗ из Осетии; 2 — КЗ из Москвы; 3 — КЗ из Тибета; д, мм — диаметр зоны подавления роста тест-культуры; А — ингибиторная активность соответствующей концентрации антибиотика по калибровочной кривой: МЕ/мл — активность по низину; ед./мл — активность по левометицину/нистатину.

Изучение антимикробного спектра действия кефиров, полученных из КЗ Московского региона (№ 5), Осетии (OS) и Тибета (T2-3) показало, что наиболее активными относительно оппортунистических патогенов (*S. aureus* и *E. coli*) являются кефирные зерна из Москвы. Ингибиторная активность кефира против стафилококка увеличивалась по мере ферментации молока на 38 %: от 105 МЕ/мл по низаплину за 24 ч ферментации до 145 МЕ/мл за 72 ч культивирования, а по отношению к *E. coli* за 24 ч — на 19 %, за 72 ч — на 71 % (по отношению к левометицину). Этот кефир обладал и высокой фунгицидной активностью против грибов, которая

составила 138 ед./мл (по нистатину), за 48 ч ферментации увеличилась на 14 %, за 72 часа — на 28 %.

Максимальную антимикотическую активность по отношению к дрожжам *Candida albicans* проявлял кефир на основе зерен из Тибета — 176 ед./мл. Следует отметить, что кефир, приготовленный на КЗ из Московского региона, за первые 24 ч инкубации имел показав более высокую активность по сравнению с двумя другими кефирами (122 ед./мл). В последующие 24 ч активность кефира из КЗ тибетского района Китая увеличилась на 28 %, а за 72 ч сбраживания молока антимикотическая активность ингибирования повысилась на 62 % (рис. 4).



**Рис. 4.** Антимикробная активность кефиров, приготовленных на кефирных зернах из разных районов, в динамике ферментации

Примечания: образцы 1 (Москва); 2 (Осетия); 3 (Тибет); активность на: *Staphylococcus aureus* по низину в МЕ/мл; *Escherichia coli* по левомецитину в ед./мл; *Aspergillus niger* и *Candida albicans* по нистатину в ед./мл.

**Fig. 4.** Antimicrobial activity of kefirs prepared with kefir grains from different regions during fermentation dynamics  
Notes: Samples 1 (Moscow); 2 (Ossetia); 3 (Tibet); activity against: *Staphylococcus aureus* (nisin, IU/ml); *Escherichia coli* (chloramphenicol, U/ml); *Aspergillus niger* and *Candida albicans* (nystatin, U/ml).

Лактобактерии являются основными источниками образования молочной кислоты и, следовательно, определяющим фактором в развитии вкуса кефира. Молочная кислота, полипептиды и ацетальдегид являются основными вкусовыми соединениями в кефире [11]. В то же время кислота способствует проявлению антимикробной активности кефира и кефирных грибков и используется как антисептик и природный биоконсервант.

Ингибиторный эффект был зафиксирован во всех образцах кефиров. Причем активность против аспергиллов и дрожжей проявлялась в большей степени после 48 ч ферментации и увеличивалась к 72 ч, то есть после стационарной фазы роста, возможно, под действием вторичных антимикробных метаболитов. Бактерицидная активность кефиров проявлялась уже сразу после начала инкубирования КЗ, что косвенно свидетельство-

вало об ответственности бактериоцинов, которые синтезируются параллельно росту продуцентов, за ингибирующий эффект против бактериальных тест-культур, 19].

Китайские исследователи [15] выделили из тибетского кефира бактериоцин пептидной природы, который проявлял антибактериальные свойства в отношении кишечной палочки и золотистого стафилококка, что подтверждено и нашими результатами.

\*\*\*

В лабораторных условиях проведены исследования по сравнительному изучению кефиров, изготовленных из кефирных зерен, используемых для кустарного производства кефиров в разных территориальных зонах: Россия (Московский регион), Кавказ (Северная Осетия), Китай (Тибет). С помощью электронно-микроскопических исследований показано многообразие видов и морфотипов бактерий и дрожжей, входящих в уникальное сообщество кефирных зерен. Пространственное расположение микроорганизмов в структуре КЗ показывает их разную аэротолерантность: дрожжи в зерне располагаются близко к его поверхности, что отражает их облигатную зависимость от молекулярного кислорода, а в середине зерна обнаружены бактерии, в основном, лактобациллы, не нуждающиеся в кислороде.

Используя метод высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК бактерий и ITS1-области дрожжей КЗ, определен доминирующий состав бактерий и дрожжей в микробиоме кефирных зерен из разных регионов. Показано, что в их состав входят молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus* и *Lactococcus* в разных соотношениях (с преобладанием *Lactococcus* в образцах КЗ из Осетии или лактобацилл в образцах из Тибета), а также бактерии *Leuconostoc*, которые способны к синтезу экзополисахаридов, структурирующих строю КЗ. В зернах Т2-3 из Тибета выявлены еще и уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*, которые, как известно, также способны к синтезу экзополисахаридов и тем самым усиливающие антимикробные и адгезионные свойства кефиров, но в этих КЗ снижено содержание бактерий рода *Leuconostoc*.

Проведенные исследования показали некоторое филогенетическое разнообразие дрожжей, выделенных из кефирных зерен. Представителями дрожжевого сообщества КЗ чаще всего являются дрожжи родов *Kazachstania* и *Kluyveromyces* — аско-

мицетные почкующиеся дрожжи, относящиеся к семейству *Saccharomycetaceae*.

Изучение антимикробного спектра действия кефиров, полученных из КЗ разных регионов, позволило выявить наиболее активные КЗ, с помощью которых удастся получать кефиры с максимальным эффектом подавления роста оппортунистических патогенов (на примере стафилококков и кишечной палочки), а также микромицетов. Этими достоинствами обладали образцы кефиров, приготовленных на КЗ образца № 5 (Москва), они же отличались наиболее высокой скоростью роста. Как антимикотик (против дрожжей *Candida albicans*) наиболее эффективен кефир, приготовленный на закваске из Тибета. Представленные данные можно рассматривать не только как пример реакции биологической системы на неблагоприятные факторы внешней среды, но и как системы взаимоотношений дрожжей и МКБ в природных экосистемах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изготовление кефира — это процесс общего метаболизма сложных симбиотических микробных сообществ. Изучены ростовые характеристики кефирных зерен, которые необходимы для создания биотехнологического процесса и режимов ферментации. Биомасса зерен после 12 сут роста в коровьем молоке увеличивалась на 56–65 %, что подтверждало симбиотические взаимоотношения в микробиоте изучаемых образцов КЗ. Консорциум бактерий и дрожжей внутри экзополисахаридного матрикса ведет себя как единый организм, способный к росту, размножению и передающий свою структуру и свойства последующим поколениям кефирных грибков.

Полученные результаты исследований являются перспективными для выделения новых морфотипов микробов и пополнения коллекции потенциальных пробиотических культур. Эти исследования направлены на создание устойчивых пробиотических микробных сообществ и продуктов функционального питания, необходимых для лечения и профилактики ряда заболеваний, влияющих на здоровье человека. Эффективность применения кефира против инфекций желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистых, легочных и онкозаболеваний показана историческим опытом и многочисленными исследованиями ученых многих стран и народов [1, 5–9, 11–13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. 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. Pp. 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.010>
2. Azizi N.F., Kumar M.R., Yeap S.K., Abdullah J.O., Khalid M., Omar A.R. et al. Kefir and Its Biological Activities. *Foods.* 2021. V. 10. № 6. Pp. 1210. <https://doi.org/10.3390/foods1006>
3. Bifari F., Nisol E. Branched-chain amino acids differently modulate catabolic and anabolic states in mammals: a pharmacological point of view. *Br. J. Pharmacol.* 2017. № 174. Pp. 1366–1377. <https://doi.org/10.1111/bph.13624>
4. Bokulich N.A., Mills D.A. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. Vol. 79. № 8. pp. 2519–2526. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003117>
5. Farag M.A., Jomaa S.A., El-Wahed A.A., El-Seedi H.R. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety, Nutrients. 2020. V. 12. № 346. pp. 1–23. <https://doi.org/10.3390/nu12020346>
6. Cheng T., Zhang T., Zhang P., He X., Sadiq F.A., Li J., Sang Y., Gao J. The complex world of kefir: Structural insights and symbiotic relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2024. V. 23. № 4. e13364. <https://doi.org/10.3168/jds.2025-26986>
7. Dahiya D., Nigam P.S. Therapeutic and Dietary Support for Gastrointestinal Tract Using Kefir as a Nutraceutical Beverage: Dairy-Milk-Based or Plant-Sourced Kefir Probiotic Products for Vegan and Lactose-Intolerant Populations. *Fermentation.* 2023. V. 9. № 4. P. 388. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040388>
8. Ding Fan., Stoyanova L.G., Netrusov A.I. Microbiome and metabiotic properties of kefir grains and kefir based on them. *Microbiology.* V. 91. № 4. Pp. 339–355. <https://doi.org/10.1134/S0026261722100885>
9. 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. № 30. Pp. 43–53. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>
10. Gao Jie., Gu F., Abdella N.H., Ruan H., He G. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China. *J. Food Sci.* 2012. V. 77. № 8. P. 425–433. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02805>
11. Gökirmaklı C., Güzel-Seydim Z.B. Water Kefir Grains vs. Milk Kefir Grains: A Physical, Microbiological, and Chemical Comparison. *J. Appl. Microbiol.* 2022. V. 132. № 6. pp. 4349–4358. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>
12. Gooruee R., Pahlavani N., Hadi V., Hadi S. *Adv. Integr. Medicine.* 2024. V. 11. № 1. pp. 10–16. <https://doi.org/10.1186/s13063-019-4008-x>
13. Gut A.M., Vasiljevic T., Yeager T., Donkor O.N. Kefir characteristics and antibacterial properties-potential applications in control of enteric bacterial infection. *Intern. Dairy J.* 2021. pp. 105021. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105021>
14. Merkel A.Yu., Tarnovetskii I.Yu., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities. *Microbiology.* 2019. Vol. 13, № 6. pp. 671–680. <https://doi.org/10.1134/S0026261719060110>
15. Miao J., Liu G., Ke C., Fan W., Li C., Chen Y., Dixon W. et al. Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli*. *Food Control.* 2016. V. 65. pp. 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.023>
16. Moghimani M., Salari A., Hashemi M., Soleimanpour S., Ranjbar G., Afshari A. Iranian traditional kefir beverage: Isolation and identification of beneficial microorganisms and evaluation of antimicrobial activity against food-borne pathogens. *Nutrition & Food Science.* V. 53. № 8. pp. 1257–1267. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.009>
17. Karim A., Gerliani N., Aider M. *Kluyveromyces marxianus*: an emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *Int. J. Food Microbiology.* 2020. V. 333. pp. 108818. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro>
18. Rios D.L., da Silva P.C.L., Moura C.S.S., Villanoeva C.N.B.C., Fernandes G.d.R. et al. Comparative metatranscriptome analysis of Brazilian milk and water kefir beverages. *J. Microbiology.* 2023. №. 27. Pp. 807–818. <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00431-4>
19. 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. Pp. 41–61. (Russia). <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2017-5-41-61>

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Дин Фань — преподаватель Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Гуандонг, Китай  
E-mail: dingfan0110@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-9614-3388>

Нетрусов Александр Иванович — докт. биол. наук, проф. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, Москва, Российская Федерация  
E-mail: anetrusov@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-2803-3037>

Стойанова Лидия Григорьевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, Москва, Российская Федерация  
E-mail: stoyanovamsu@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1192-2863>

Поступила в редакцию 22.11.2025

После доработки 15.02.2026

Принята к публикации 28.02.2026

## ABOUT THE AUTHORS

Ding Fan — PhD in Biology Sciences, teacher at the University MSU-PPI University in Shenzhen, Guangdong, China  
E-mail: dingfan0110@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-9614-3388>

Netrusov, Alexander I. — Dr. Biol. Sci., prof. Department of Microbiology, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russian Federation  
E-mail: anetrusov@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-2803-3037>

Stoyanova, Lidia G. — Dr. Biol. Sci., Leading Researcher, Department of Microbiology, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russian Federation  
E-mail: stoyanovamsu@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1192-2863>

Received November 22, 2025

Revised February 15, 2026

Accepted February 28, 2026