

# Микробиомы кефирных зёрен из регионов исторического происхождения и их пробиотический потенциал

ФАНЬ ДИН<sup>1,2</sup>, \*Л. Г. СТОЯНОВА<sup>1</sup>, А. И. НЕТРУСОВ<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Шэньчжэнь, КНР

<sup>3</sup> Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

## Microbiomes of Kefir Grains From Regions of Historical Origin and Their Probiotic Potential

FAN DING<sup>1,2</sup>, \*LIDIA G. STOYANOVA<sup>1</sup>, ALEXANDER I. NETRUSOV<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, China

<sup>3</sup> National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

### Резюме

Кефир вызвал интерес в научном сообществе благодаря своим полезным свойствам, такими как улучшение пищеварения, антимикробное действие, гиполипидемический, антигипертензивный, противовоспалительный эффекты, контроль уровня глюкозы в плазме, антиоксидантный, антиканцерогенный и антиаллергенный активности. Дана сравнительная характеристика микробиомов кефирных зёрен (КЗ), полученных из регионов их исторического происхождения (Кавказ и Китай). Показано разнообразие их составов с помощью классических микробиологических и молекулярно-генетических методов, включая метод высокопроизводительного секвенирования V4 фрагментов генов 16S рРНК бактерий и области ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК дрожжей. Из бактериальных культур в КЗ чаще всего встречаются виды рода *Lactobacillus*, а из дрожжей — *Pichia fermentans*, а также более редко встречающиеся виды *Yarrowia lipolytica* и *Galactomyces candidus*.

**Ключевые слова:** кефирные зёрна; выделение; идентификация; лактобациллы; дрожжи; секвенирование; 16S рРНК

**Для цитирования:** Дин Фань, Нетрусов А. И., Стоянова Л. Г. Микробиомы кефирных зёрен из регионов исторического происхождения и их пробиотический потенциал. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 7–8: 4–7. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-4-7>.

### Abstract

Kefir has attracted interest in the scientific community due to its beneficial properties, such as: improving digestion, antimicrobial action, hypocholesterolemic, antihypertensive, and anti-inflammatory effects, control of plasma glucose levels, antioxidant, anticarcinogenic, and antiallergic activity. The comparative characteristics of the microbiomes of kefir grains (KG) obtained from the regions of their historical origin (Caucasus and China) is given. The diversity of their compositions was shown using classical microbiological and molecular genetic methods, including high-throughput sequencing of V4-region of bacterial 16S rRNA genes and the ITS1 region of the 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S complex of yeast rRNA. The species of the *Lactobacillus* genus are the most common of the bacterial cultures in kefir grains, while the most common of the yeast cultures is *Pichia fermentans*, as well as the rarer species of *Yarrowia lipolytica* and *Galactomyces candidus*.

**Key words:** kefir grains; isolation; identification; lactobacteria; yeast; sequencing; 16S rRNA

**For citation:** Ding Fan, Netrusov A. I., Stoyanova L. G. Microbiomes of kefir grains from regions of historical origin and their probiotic potential. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67: 7–8: 4–7. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-4-7>.

## Введение

В связи с ухудшением эпидемиологической обстановки в мире увеличился спрос на продукты и безопасные препараты, полезные для здоровья. Традиционные продукты смешанного молочнокислого и спиртового брожения, включая кефир,

с древних времён зарекомендовали себя как средство для борьбы с инфекциями и преждевременной старостью. На протяжении веков кефир употребляли в качестве натурального лекарства. Питательные и лечебные свойства кефира на протяжении десятилетий находились в центре внимания многих научных исследований. Кефир

© Коллектив авторов, 2022

\*Адрес для корреспонденции: Ленинские горы, д. 1, стр. 12, МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия, 119234.  
E-mail: stoyanovamsu@mail.ru

© Team of Authors, 2022

\*Correspondence to: 1/12 Leninskiye Gory, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russian Federation.  
E-mail: stoyanovamsu@mail.ru

получают путём посева кефирных зёрен в молоко. Точный микробный состав кефирных зёрен до сих пор остаётся спорным. В кефирных зёрнах обнаружено до 50 различных видов бактерий и дрожжей, которые были выделены из разных мест [1]. Наиболее распространёнными бактериям в зёрнах являются молочнокислые бактерии (МКБ), на долю которых приходится 37–90% микробной популяции [2]. Микробы, присутствующие в кефире, обладают потенциалом пробиотиков. Пробиотические культуры кефира могут активировать иммунную систему для подавления вирусных инфекций. Показано, что молочнокислые бактерии из кефира повышают цитотоксичность натуральных клеток-киллеров по отношению к опухолевым клеткам, особенно в случае рака кишечника и толстой кишки [3].

Кефир может действовать как противовоспалительное средство за счёт снижения экспрессии интерлейкинов IL-1 и IL-6, синтезируемых макрофагами и Т-клетками и стимулирующих иммунный ответ, а интерфероны IFN- $\alpha$  и II типа (IFN- $\gamma$ ) индуцируют противовирусную защиту. Под влиянием чужеродных антигенов вырабатывается повышенное количество цитокинов — медиаторов воспалительного процесса, выполняющих регуляторные функции, которые в свою очередь продуцируют повышенное образование IL-6, активацию Т-лимфоцитов и других иммунных клеток и их миграцию, приводящее к развитию признаков «цитокинового шторма» при коронавирусной инфекции. Поэтому кефир может быть важным ингибитором «цитокиновой бури», способствующей развитию COVID-19 [4, 5]. Лечебный эффект кефира в основном определяется микробным составом кефирных зёрен.

Цель исследования — сравнить микробиомы кефирных зёрен, полученных из исторически регионов их происхождения — Кавказа и Китая.

## Материал и методы

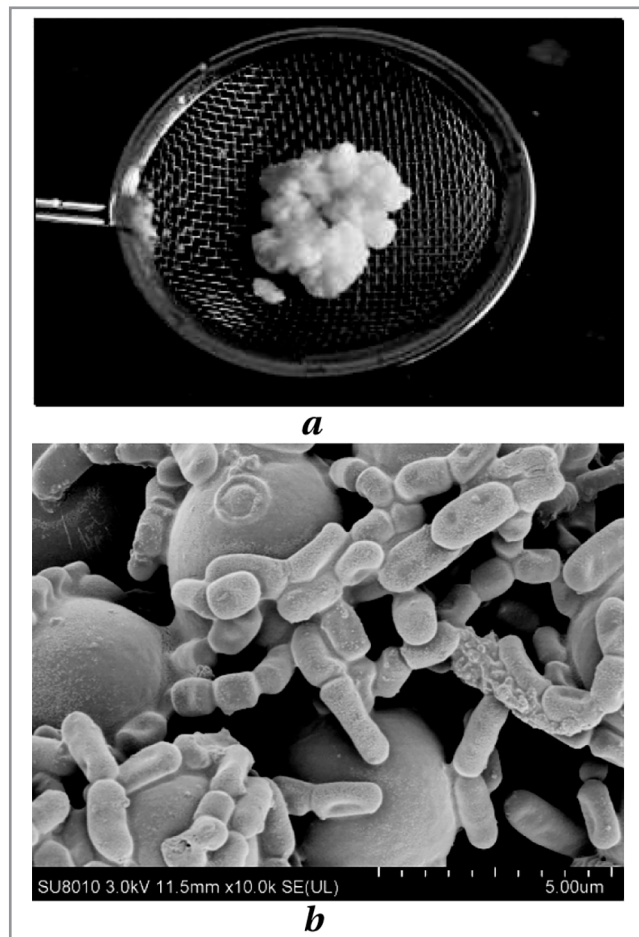
Для проведения исследований получали кефирные зёрна (КЗ) из частных домохозяйств исторических регионов их происхождения, включая Северную Осетию и Тибетский район Китая. Зёрна хранили в лиофильном состоянии в коллекции культур кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Лиофилизированные КЗ активировали в стерильном 1,5% молоке с регулярными пересевами частотой 2 раза в неделю. Морфологические свойства КЗ изучали под световым микроскопом Микромед 1 (вар. 2-20, фирмы ЛОМО, СПб, РФ) и сканирующем электронном микроскопе (СЭМ, фирма «HITACHI SU-8010»). Выделение чистых культур и их дифференциацию проводили стандартными микробиологическими методами, проводя культивирование в молоке с последующим высевом накопительных культур на агаризованные среды и культивируя в аэробных и анаэробных условиях [6–8]. Состав микробиомов и их таксономическую принадлежность определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК бактерий в области V4 фрагментов генов 16S рРНК бактерий и области ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК дрожжей [9, 10]. Статистическую

обработку данных проводили с использованием MS Excel. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Кефирные зёрна можно описать как студенистые белые или слегка жёлтые массы с эластичной консистенцией и размером от 0,3 до 3,5 см в диаметре, похожие на маленькие головки (кочанчики) цветной капусты (рис. 1, *a*). В электронном микроскопе видны крупные (7–8 мкм) клетки дрожжей с шрамами от отделившихся почек, и тесно прилегающие к ним клетки МКБ (1–3 мкм в длину) (рис. 1, *b*).

Кефирные зёрна имеют разнообразный состав микроорганизмов с преобладанием молочнокислых бактерий и дрожжей. Эти виды микроорганизмов подразделяются на четыре группы: гомоферментативные и гетероферментативные молочнокислые бактерии, и ассимилирующие и

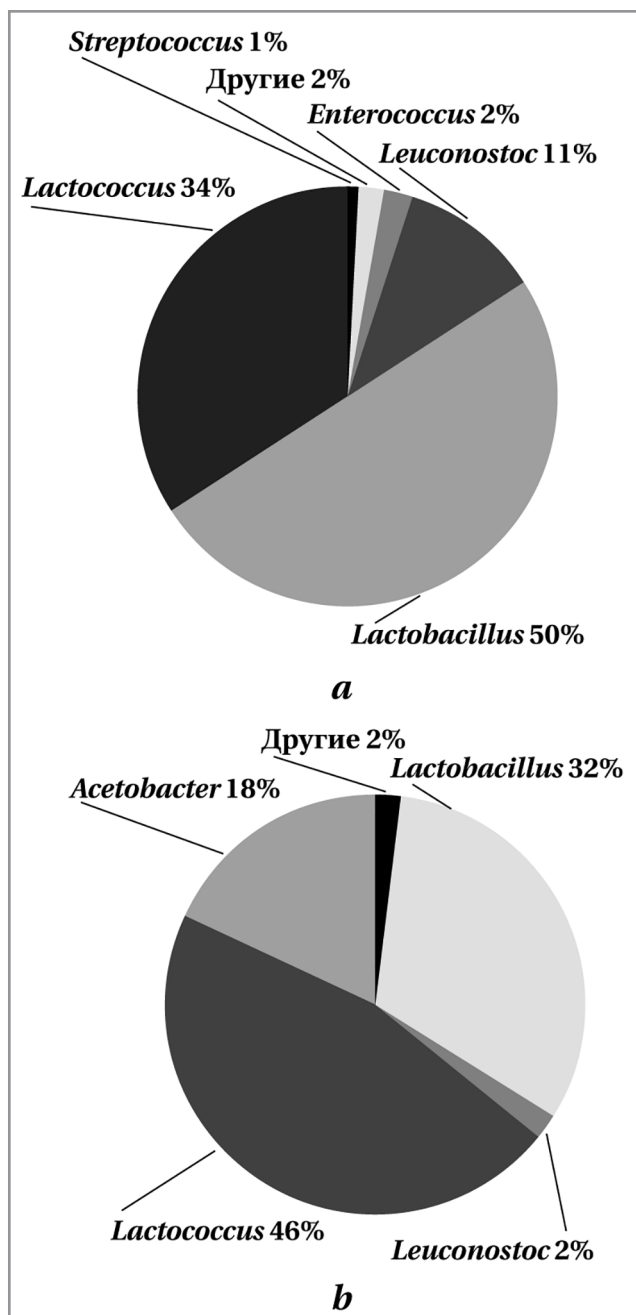


**Рис. 1. Фотографии кефирного зерна из Тибета.**

*a* — внешний вид кефирного зерна; *b* — его поверхность в сканирующем электронном микроскопе (HITACHI SU-8010, увеличение  $\times 10\,000$ ).

**Fig. 1. Photos of kefir grains from Tibet.**

*a* — the appearance of kefir grains; *b* — its surface in a scanning electron microscope image (HITACHI SU-8010,  $\times 10\,000$  magnification).

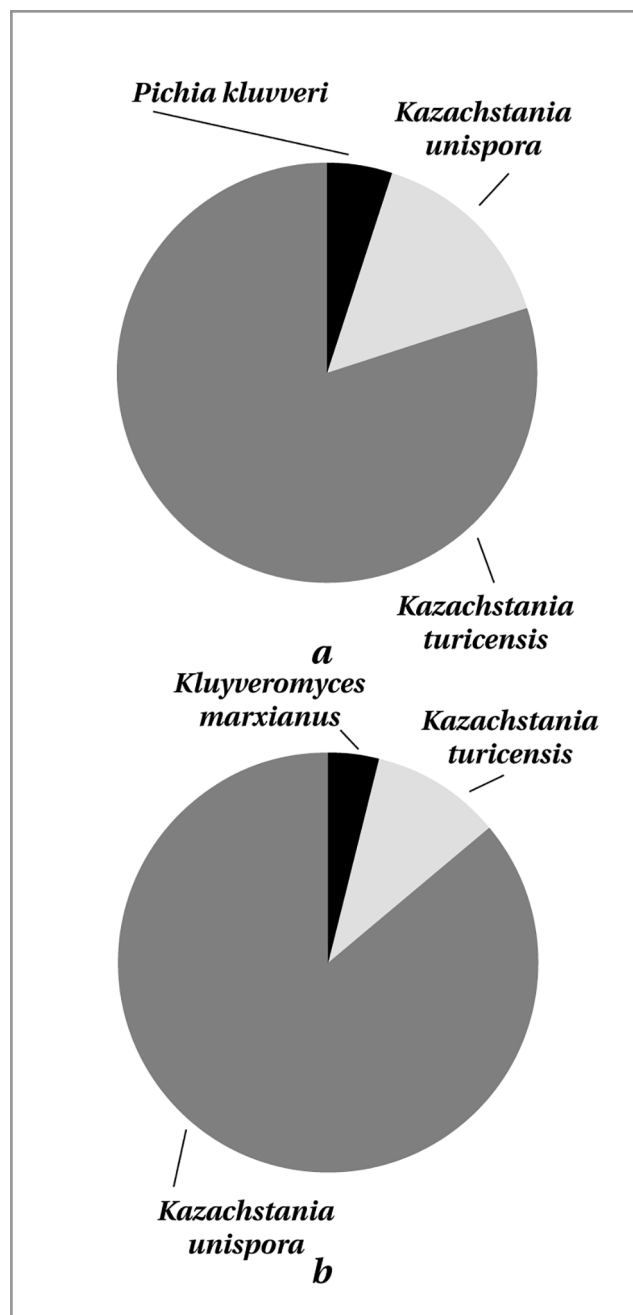


**Рис. 2.** Бактериальный состав микробиоты кефирных зёрен из Осетии (a) и Тибета (b).  
**Fig. 2.** Bacterial composition of the microbiota of kefir grains from Ossetia (a) and Tibet (b).

не ассимилирующие лактозу дрожжи. Выделенные чистые культуры МКБ растут в аэробных и анаэробных условиях на среде МРС по-разному, что отражает их различную аэротолерантность.

Микробиом кефирных зёрен из Осетии и Тибета, по результатам высокопроизводительного секвенирования, представлен разными представителями МКБ в разном процентном соотношении и неодинаковым дрожжевым составом (рис. 2, 3).

В бактериальном составе КЗ идентифицированы *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc*, а в Тибетском образце присутствовал *Acetobacter* (18%),



**Рис. 3.** Дрожжевой состав микробиоты кефирных зёрен из Осетии (a) и Тибета (b).  
**Fig. 3.** Yeast composition of the microbiota of kefir grains from Ossetia (a) and Tibet (b).

способный окислять этанол до уксусной кислоты, ацетат и лактат — до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

Из КЗ чаще всего выделяются дрожжи *Pichia fermentans*, а также *Yarrowia lipolytica* (вид аскомицетовых дрожжевых грибов), относящийся к порядку *Saccharomycetales*, которые были выделены из Тибетских кефиrow, что подтверждено работами китайских учёных [11].

Из образца кефирного зерна, полученного из Северной Осетии, выделены дрожжи *Galactomyces candidus*, редко встречающийся в КЗ.

## Заключение

Во время ферментации молока зёрнами кефира образуется множество функциональных соединений, таких как биоактивные пептиды, обладающие антигипертензивной, антиоксидантной, противоаллергенной, противоопухолевой, противомикробной, противовоспалительной и снижающей уровень холестерина активностью [12]. Для большого числа штаммов, выделенных из

кефира (например, *Lactobacillus kefirianofaciens*) и дрожжей *Kluyveromyces marxianus*), значительные пробиотические действия были продемонстрированы как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo* [5]. Во многих лабораториях мира постоянно ведутся исследования по дальнейшему изучению свойств кефира для разработки новых важных функциональных продуктов, биологически активных добавок и лекарственных средств.

## Литература/References

1. Prado M.R., Blandon L.M., Vandenberghe L.P.S. Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1177–1186. doi: 10.3389/fmicb.2015.01177. eCollection 2015.
2. 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; 43: 1523–1528.
3. 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; 12 (2): 346–359. doi: 10.3390/nu12020346.
4. Yamane T., Sakamoto T., Nakagaki T., Nakano Y., Yamane T., Sakamoto T., Nakagaki T., Nakano Y. Lactic acid bacteria from kefir increase cytotoxicity of natural killer cells to tumor cells. *Foods.* 2018; 7: 48. doi: 10.3390/foods7040048.
5. Boyoglu-Barnum S., Chirkova T., Anderson L. J. Biology of infection and disease pathogenesis to guide RSV vaccine development. *Front Immunol.* 2019; 10: 1675. doi: 10.3389/fimmu.2019.01675. eCollection 2019.
6. Стоянова Л.Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием. Известия ТСХА. 2017; 5: 41–61. [Stoyanova L.G. Isolation and identification of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* with antimicrobial activity. Izvestia TSHA. 2017; 5: 41–61 (in Russian)].
7. Klimko A.I., Cherdynseva T.A., Brioukhanov A.L., Netrusov A.I. *In vitro* evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2020; 12 (3): 1139–1148. doi: 10.1007/s12602-019-09599-6.
8. Kotova I.B., Cherdynseva T.A., Netrusov A.I. Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process. *Adv Exp Medicine, Biol.* 2016; 932: 93–121. doi: 10.1007/5584\_2016\_2.
9. 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; 13 (6): 671–680.
10. Willger S.D., Grim S.L., Dolben E.L., Shipunova A., Hampton T.H., Morrison H.G., Filkins L.M., O'Toole G.A., Moulton L.A., Ashare A., Sogin M.L., Hogan D.A. Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome.* 2014; 2 (1): 40. doi: 10.1186/2049-2618-2-40. eCollection 2014.
11. Gao X., Li B. Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review. *Food Agric.* 2017; 1–10.
12. Amorim E.G., Coitinho L.B., Dias A.T., Friques A.G.E., Monteiro B.L., de Rezende L.C.D., Pereira T.D.M.C., Campagnaro B.P., De Pauw E., Vasquez E.C. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food Chem.* 2019; 282: 109–119. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.010. Epub 2019 Jan 8.

## Информация об авторах

Дин Фань — аспирант кафедры микробиологии биологического факультета Московского Государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Стоянова Лидия Григорьевна — д. б. н., в. н. с. кафедры микробиологии, биологического факультета Московского Государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Нетрусов Александр Иванович — д. б. н., профессор кафедры микробиологии биологического факультета Московского Государственного университета им. М. В. Ломоносова; Факультет биологии и биотехнологии, Высшая школа экономики, Москва, Россия

## About the authors

Ding Fan — Ph. D. student of the Microbiology Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Lidia G. Stoyanova — D. Sc. in biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Alexander I. Netrusov — D. Sc. in biology, Professor in biology, Lomonosov Moscow State University; National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia