

Динамика микробного сообщества кисломолочного напитка, приготовленного с использованием кефирных грибков

Д.Д. Коваль, В.А. Ратайчук, А.В. Хан, Е.Г. Лазарева, О.Ю. Фоменко

Всероссийский
научно-исследовательский
институт молочной
промышленности, г. Москва,
Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: Несмотря на значительное количество исследований, посвященных микробному составу кефира, представления о динамике микробного сообщества в процессе ферментации остаются фрагментарными. Большинство исследований в этой области основано на 16S-rRNA-секвенировании или классических культуральных методах, которые ограничены по разрешающей способности.

Цель: Оценка динамики состава микробного сообщества кисломолочного напитка, приготовленного с использованием кефирных грибков, на протяжении всего процесса — от этапа активации кефирных грибков до образования продукта с истекшим сроком годности с целью выявления закономерностей перестройки микробного сообщества кефира с применением полногеномного метагеномного секвенирования, обеспечивающего таксономическую идентификацию микроорганизмов на уровне видов.

Материалы и методы: Исследование выполнено в лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»). Объектами исследования являлись лиофилизированные кефирные грибки и кефир, приготовленный на их основе. Отбор проб осуществляли на последовательных этапах: 0 ч — лиофилизированные грибки, 48 ч — метаболически активные грибки, 120 ч — кефирная закваска, 122 ч — внесение 5% закваски в молоко, 130 ч — окончание ферментации кефира при +20 °C, 138 ч — готовый кефир после созревания при +4 °C, и хранение при +4 °C в течение 7, 14 и 21 суток ($n = 10$). Из каждой пробы выделяли тотальную ДНК, на основе которой готовили библиотеки и проводили полногеномное метагеномное секвенирование на платформе GeneMind FASTASeq300 в режиме парно-концевого чтения (paired-end, 2x150 п. н.) при глубине секвенирования не менее 5 млн прочтений на временную точку с последующей фильтрацией прочтений и биоинформатическим анализом таксономической структуры микробного сообщества с идентификацией микроорганизмов до уровня вида применением Kraken2 и референсной базы данных PlusPF с последующей реклассификацией и оценкой представленности видов с использованием Bracken.

Результаты: Метагеномный анализ последовательных стадий активации кефирных грибков, ферментации и хранения кефира показал, что микроорганизмы из грибков последовательно заселяют жидкую фазу, где наблюдалась упорядоченная сукцессия: микробное сообщество кефирных грибков на ~80% представлено *Lactobacillus kefiranofaciens*, в то время как доминирующими видами в закваске и кефире являлись *L. cremoris*, *L. helveticus*, *L. lactis*. Дрожжевой компонент был представлен одним видом — *Kluyveromyces marxianus*, максимальная относительная представленность которого не превышала ~1,3 % на всех исследованных стадиях.

Выводы: Установлена динамика изменений микробного состава кисломолочного напитка, приготовленного с использованием кефирных грибков, на разных стадиях ферментации и хранения. Полученные данные подчеркивают важность дальнейших исследований динамики микробиома в производстве кефира для более глубокого понимания его влияния на качество и стабильность готового продукта. Результаты исследования могут быть полезны для разработки более эффективных методов управления составом микробных сообществ кисломолочных напитков, создания стандартизированных заквасок и прогнозирования стабильности качества ферментированных молочных продуктов.

Ключевые слова: кефирные грибки; молочный кефир; молочнокислая ферментация; полногеномное секвенирование; метагеномное секвенирование

Корреспонденция:

Дарья Дмитриевна Коваль
E-mail: d_koval@vniimi.org

Конфликт интересов:

авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 12.09.2025

Принята: 15.12.2025

Опубликована: 30.12.2025

Copyright: © 2025 Авторы



Для цитирования: Коваль, Д.Д., Ратайчук, В.А., Лазарева, Е.Г., Хан А.В., & Фоменко, О.Ю. (2025). Динамика микробного сообщества кисломолочного напитка, приготовленного с использованием кефирных грибков. *FOOD METAENGINEERING*, 3(4), 32-54. <https://doi.org/10.37442/fme.2025.4.94>

The Dynamics of the Microbial Community of a Fermented Milk Beverage Produced Using Kefir Grains

Daria D. Koval, Viktor A. Rataichuk, Alexey V. Khan, Ekaterina G. Lazareva, Oleg Yu. Fomenko

All-Russian Dairy Research Institute,
Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: Despite a significant amount of research devoted to microbial composition of kefir, our understanding of microbial community dynamics during fermentation remains fragmented. Most studies rely on 16S rRNA sequencing or traditional culture methods, which have limited resolution.

Purpose: To evaluate the dynamics of the microbial community composition of a fermented milk drink prepared using kefir grains throughout the entire technological process — from the activation stage of kefir grains to the formation of a product with an expired shelf life, using whole-genome metagenomic sequencing.

Materials and Methods: The study was conducted at the Laboratory of Applied Microbiology and Microbial Genomics, All-Russian Dairy Research Institute (VNIMI). The study objects were lyophilized kefir grains and kefir prepared from them, sampled at different stages of the fermentation process and subsequent storage. The objects of the study were lyophilized kefir grains and kefir prepared from them. Sampling was carried out at the following sequential stages: 0 h — lyophilized grains, 48 h — metabolically active grains, 120 h — kefir starter culture, 122 h — addition of 5% starter culture to milk, 130 h — end of kefir fermentation at +20 °C, 138 h — finished kefir after maturation at +4 °C, and storage at +4 °C for 7, 14, and 21 days ($n = 10$). Total DNA was isolated from each sample, which was used to prepare libraries and perform whole-genome metagenomic sequencing on the GeneMind FASTASeq300 platform in paired-end reading mode (2×150 bp) with a sequencing depth of at least 5 million reads per time point, followed by read filtering and bioinformatics analysis of the taxonomic structure of the microbial community with identification of microorganisms to the species level using Kraken2 and the PlusPF reference database, followed by reclassification and assessment of species representation using Bracken.

Results: Metagenomic analysis of the sequential stages of kefir grain activation, fermentation, and kefir storage revealed that microorganisms from the fungi sequentially colonize the liquid phase, where an ordered succession was observed: ~80% of the kefir grain microbial community was represented by *Lactobacillus kefirianofaciens*, while the dominant species in the starter culture and kefir were *L. cremoris*, *L. helveticus*, and *L. lactis*. The yeast component was represented by a single species, *Kluyveromyces marxianus*, whose maximum relative abundance did not exceed ~1.3% at all stages studied.

Conclusion: The dynamics of changes in the microbial composition of a fermented milk drink prepared using kefir grains were analyzed at different stages of fermentation and storage. The data obtained emphasizes the need for further research into the dynamics of the microbiome in kefir production to better understand its impact on the quality and stability of the final product. The results of the study may contribute to the development of more effective methods for managing the microbial community composition in fermented milk drinks, creating standardized starter cultures, and predicting the stability of fermented dairy product quality.

Keywords: kefir grains; milk kefir; lactic fermentation; whole-genome sequencing (WGS); metagenomic sequencing

Correspondence:

Daria D. Koval

E-mail: d_koval@vnimi.org

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 12.09.2025

Accepted: 15.12.2025

Published: 30.12.2025

Copyright: © 2025 The Authors



To cite: Koval, D.D., Rataychuk, V.A., Lazareva, E.G., Khan, A.V., & Fomenko, O.Yu. (2025). The Dynamics of the Microbial Community of a Fermented Milk Beverage Produced Using Kefir Grains. *FOOD METAENGINEERING*, 3(4), 32-54. <https://doi.org/10.37442/fme.2025.4.94>

ВВЕДЕНИЕ

Состав микробного сообщества кефира изучен достаточно широко: описано пространственное расположение дрожжей и бактерий в полисахаридной матрице кефирных зёрен (Marshall et al., 1984; Ding et al., 2022; Avila-Reyes et al., 2022), подтверждён их микробный состав (Dong et al., 2022; Baars et al., 2023; Walsh et al., 2023) и выявлены метаболиты, которые они синтезируют (Powell et al., 2007; Prado et al., 2015; Abdalla et al., 2021; Saleem et al., 2023; Encinas-Vazquez et al., 2023). Однако, временная динамика микробных сообществ на разных стадиях технологического процесса остаётся недостаточно изученной. Работы, посвящённые динамическим аспектам, ограничены методами с низкой разрешающей способностью. В исследовании Laureys & De Vuyst (2014), основанном на культуральных методах и PCR-DGGE, на всех временных точках выявлялся одинаковый набор доминирующих таксонов (*Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Saccharomyces*, *Dekkera*), что было интерпретировано как отсутствие заметных изменений в структуре сообщества. Однако учитывая низкую чувствительность используемых методов к минорным и некультивируемым видам, подобная «стабильность», вероятно, отражает ограничения методики, а не реальную статичность сообщества.

В то же время исследование молочного кефира Kotova et al. (2016), в котором сочетались культуральный анализ, PCR-DGGE и микроскопия, показало наличие таксономического перераспределения при переходе от кефирных зёрен к напитку: доминирование *Lactobacillus spp.* в зёрнах сменялось преобладанием *Lactococcus/Leuconostoc spp.* в жидкой фракции. Однако характер сукцессионных процессов оставался недостаточно прояснён: таксономическая идентификация была преимущественно на уровне рода, а минорные и некультивируемые компоненты сообщества не всегда обнаруживались. Эти ограничения не позволили охарактеризовать полную структуру консорциума и оценить возможный вклад малочисленных таксонов, что подчёркивает необходимость методов с более высоким разрешением.

Несмотря на развитие технологий высокопроизводительного секвенирования, исследования, отслеживающие динамику микробиоты кефира с высоким таксономическим разрешением, остаются немногочисленными (McGovern et al., 2024; Blasche et al., 2021). Между тем, понимание экологической перестройки микробного

сообщества в процессе ферментации и хранения имеет не только теоретическое, но и практическое значение. Характер сукцессионных изменений определяет скорость подкисления, формирование сгустка, стабильность микробиоты при хранении, а также воспроизводимость органолептических и функциональных свойств готового продукта. Знание временной динамики доминирующих и минорных таксонов позволит обосновывать выбор технологических параметров ферментации, прогнозировать стабильность качества кефира в течение срока годности и целенаправленно управлять составом микробного консорциума. Кроме того, учитывая показанную вариабельность микробного состава кефирных грибов различного происхождения (Walsh et al., 2023), анализ сукцессии в конкретных системах является необходимым этапом для разработки стандартизированных заквасок и повышения воспроизводимости ферментированных молочных продуктов. Таким образом, анализ динамики микробного сообщества кефира представляет собой ключ к интерпретации механизмов функционирования симбиотического консорциума и к его рациональному использованию в биотехнологической практике.

Гипотеза исследования: микробное сообщество кефирных зёрен характеризуется относительной таксономической стабильностью, тогда как микробиота жидкой фазы демонстрирует направленные изменения, обусловленные сукцессионными процессами.

Целью данного исследования являлась оценка динамики состава микробного сообщества кисломолочного напитка, приготовленного с использованием кефирных грибов, на протяжении всего процесса приготовления и хранения — от этапа внесения лиофилизированных кефирных грибов в молоко до образования продукта с истекшим сроком годности.

Исследовательские вопросы:

RQ#1: Как изменяется таксономический состав микробного сообщества на последовательных стадиях активации кефирных грибов, ферментации и хранения кефира?

RQ#2: Сохраняется ли стабильность микробного состава кефирных грибов в процессе ферментации и какова степень их участия в формировании микробиома жидкой фазы?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

В качестве исходного материала использовались лиофилизированные кефирные грибки, используемые на промышленных предприятиях Центрального федерального округа Российской Федерации. Образцы были получены из коллекции молочнокислых и пробиотических микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ» (Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, г. Москва).

Подготовка образцов

Восстановление сухого молока и пастеризация

Молоко восстанавливали путём растворения 20 г сухого обезжиренного коровьего молока в 200 мл дистиллированной воды, температура которой составляла 25–30 °С. Смесь перемешивали с использованием магнитной мешалки в течение 5 минут, после чего оставляли при комнатной температуре до полного рас-

творения. Пастеризация восстановленного молока осуществлялась на водяной бане при режиме 2–8 минут при 92,5 °С.

Выработка кефира

Приготовление кефира производилось согласно типовой технологической инструкции ТТИ ГОСТ Р 52093–005.

Активирование кефирных грибков

Для метаболической активации кефирных грибков 1 г лиофилизированного материала вносили в 200 мл восстановленного пастеризованного обезжиренного молока, предварительно подогретого до 20 °С. Инкубация проводилась в лабораторных стеклянных стаканах объёмом 250 мл, предварительно стерилизованных в автоклаве (121 °С, 20 мин) и негерметично закрытых стерилизованной алюминиевой фольгой. Смесь инкубировали в термостате ТС-1/20 (СКТБ СПУ, Россия) при температуре 20 °С в течение 48 часов (Рисунок 1). По окончании первой инкубации кефирные грибки отделяли от жидкости с помощью мелкоячеистого сита,

Рисунок 1

Технология приготовления кисломолочных напитков с использованием кефирных грибков

Figure 1

Technology for Preparing Fermented Milk Drinks Using Kefir Grains



после чего молочную среду заменяли на свежую и инкубировали 24 часа. Процедуру замены среды с последующей 24-часовой инкубацией повторяли трижды.

Приготовление кефирной закваски

Для приготовления закваски 3,3 г активированных кефирных грибов вносили в 100 мл пастеризованного обезжиренного молока, температура которого составляла 20 °С. Смесь инкубировали в термостате ТС-1/20 (СКТБ СПУ, Россия) при температуре 20 °С в течение 24 часов (Рисунок 1). По завершении инкубации образовывался плотный сгусток с характерной глянцевой поверхностью, что свидетельствовало о готовности закваски к использованию.

Ферментация и созревание кефира

Для непосредственного приготовления кефира полученную закваску гомогенизировали с использованием магнитной мешалки без предварительного удаления кефирных зёрен. В процессе зёрна частично разрушались, однако для последующего этапа ферментации отбирали исключительно 5 мл жидкой фракции закваски, содержащей микробную суспензию, без видимых включений целых зёрен, и вносили её в 95 мл пастеризованного молока. Смесь тщательно перемешивали и помещали в стерильный стеклянный сосуд с плотно закрывающейся крышкой. Инкубацию проводили в термостате ТС-1/20 (СКТБ СПУ, Россия) при температуре 20 °С в течение 8 часов. После окончания ферментации образовавшийся глянцевый сгусток вновь подвергали перемешиванию на магнитной мешалке в течение 5 минут. После этого образец помещали в холодильник Indesit (Россия) при температуре +4 °С на 8 часов для созревания. По завершении охлаждения продукт считался готовым (Рисунок 1).

Хранение

Готовый кефир хранили в холодильнике Indesit (Россия) при +4 °С.

Отбор образцов для молекулярно-генетического анализа

Для проведения молекулярно-генетических анализов отбор образцов осуществлялся на различных этапах ферментационного процесса и последующего хранения готового продукта. Все манипуляции проводились

в асептических условиях с соблюдением мер, направленных на предотвращение контаминации.

Отбор проводился на следующих стадиях ферментации:

- (1) Лиофилизированные кефирные грибки — по 50 мг образца.
- (2) Метаболически активные кефирные зёрна — после 48 ч культивирования в пастеризованном молоке отбирали по 50 мг разбухших зёрен.
- (3) Закваска — после завершения 48-часовой ферментации кефирные грибки удаляли, полученную закваску перемешивали и отбирали по 1 мл для анализа.
- (4) Нулевая точка ферментации — сразу после внесения 5 мл закваски в 95 мл пастеризованного молока и тщательного перемешивания отбирали по 1 мл.
- (5) Через 8 ч ферментации при 20 °С — отбирали по 1 мл продукта.
- (6) После завершения ферментации (8 ч при 20 °С и последующие 8 ч при хранении в холодильнике) — по 1 мл готового кефира.
- (7) После хранения готового продукта: через 7, 14 и 21 сут — по 1 мл на каждом этапе.

Для каждой точки отбора было выполнено 10 технических повторов. Пробоподготовка жидких образцов включала центрифугирование каждой пробы с использованием мини-центрифуги Microspin 12 (Biosan, Латвия) в стерильных пробирках типа «Эппендорф» при 10 000 × g в течение 5 минут. Надосадочную жидкость аккуратно удаляли, а полученный микробный осадок хранили при –20 °С до этапа выделения ДНК.

Выделение ДНК

Экстракция нуклеиновых кислот производилась с помощью набора «ГМО — МагноСорб» (Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию ДНК в полученных препаратах измеряли на флуориметре Qubit 4 (Invitrogen, США) с использованием набора реагентов QuDye® dsDNA BR (ООО «Люмипроб РУС», Россия). Объем исследуемой пробы составлял 5 мкл. Кроме того, производилось определение ряда качественных параметров образцов ДНК (A260, A280, A230 — оптической плотности при 260 нм, 280 нм и 230 нм соответственно) и их соотношений с использованием спектрофотометра Nano-500 (Allsheng, КНР) в объеме 1 мкл.

Секвенирование и биоинформатический анализ данных

Полученные пробы ДНК объединяли в равных количествах (20 мкл) для формирования объединённой усреднённой пробы для каждой временной точки.

Подготовка ДНК-библиотек для проведения полногеномного метагеномного секвенирования методом обратимого терминирования проводилась с помощью набора реагентов «SG GM Plus» производства ООО «Сесана» (Россия) с использованием магнитных частиц для селективной очистки ДНК «Smart beads» (ООО «Сесана», Россия). Ферментативная фрагментация ДНК проводилась в течение 25 минут при температуре 65 °С на амплификаторе MiniAmp Thermal Cycler торговой марки Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, США). Двойное индексирование осуществляли с использованием набора индексированных праймеров №1 «Plate1_SG_GM», используемых для подготовки полногеномных библиотек на платформе Illumina (ООО «Сесана», Россия). Контроль качества библиотек осуществляли на приборе Bioptric Qsep100 (Bioptric, КНР) с использованием картриджа для рутинного анализа ДНК S2 (Bioptric, КНР) со следующими параметрами: напряжение ввода образца 4 кВ в течении 10 секунд, разделение при 10 кВ — 200 секунд.

Секвенирование выполнено на платформе GeneMind FASTASeq300 (GeneMind, КНР) на базе ЦКП «ВНИМИ». Для проведения секвенирования использована прочная ячейка FCM и набор реагентов для секвенирования FASTASeq 300 Sequencing Reagent V 1.0 на 300 циклов в режиме PE150 (GeneMind, КНР).

Сырые данные секвенирования были обработаны с использованием программного обеспечения CutAdapt 5.2 (Marcel Martin, Германия) для удаления последовательностей адаптеров. Результирующие fastq-файлы были триммированы в приложении Trimmomatic v0.40 (Usadel Lab, Германия) путём отрезания с конца каждого прочтения нуклеотидов с качеством ниже 20. Анализ качества прочтений до и после очистки производился с помощью инструмента FastQC v0.12.1 (Babraham Bioinformatics, Великобритания).

Иерархическая метагеномная классификация проводилась с использованием программного обеспечения Kraken2 v2.17.0 (JHU CCB, США) (Wood, Lu & Langmead, 2019) на основе предварительно индексированной

базы данных PlusPF (сборка от 5 июня 2024 года) размером 83 Гб, включающей в себя индексированные референсные последовательности архей, бактерий, вирусов, человека, векторных конструкций, а также грибов и простейших (доступ по ссылке: https://genome-idx.s3.amazonaws.com/kraken/k2_pluspf_20240605.tar.gz). Реклассификация коротких прочтений и оценка распространённости видов в сообществах на основе метагеномных данных осуществлялась с применением специализированного программного продукта Bracken 2.7 (JHU CCB, США) (Lu et al., 2017). Вычисление метрик биоразнообразия выполнялось при помощи пакета прикладных программ KrakenTools 1.2 (JHU CCB, США) (Lu et al., 2022). Визуализация результатов классификации, полученных с помощью Kraken2, проводили при помощи веб-приложения Pavian v 1.0 (JHU CCB, США) (Breitwieser and Salzberg, 2019).

Процедура исследования

В ходе исследования был воспроизведён полный технологический цикл приготовления кефира с последовательным отбором проб для анализа микробного состава на всех его этапах. На первом этапе проводили восстановление сухого обезжиренного молока и его термическую обработку с последующим отбором проб. Одновременно отбирали образцы лиофилизированных кефирных грибов.

Далее восстановленное пастеризованное молоко инокулировали кефирными грибами. В процессе их метаболической активации выполняли последовательные пересевы с заменой молочной среды и отбором проб. После завершения стадии активации осуществляли приготовление кефирной закваски и кефира, отбирая образцы на различных стадиях ферментации, созревания и хранения готового продукта.

На заключительном этапе из отобранных образцов выделяли тотальную ДНК, готовили библиотеки для полногеномного метагеномного секвенирования, проводили секвенирование и биоинформатическую обработку данных с последующим анализом таксономического состава микробных сообществ.

Анализ данных

Анализ метагеномных данных был направлен на оценку таксономической структуры микробных сообществ и её изменений на различных стадиях ферментации

и хранения кисломолочного напитка. Относительную представленность таксонов на уровне вида рассчитывали, как долю прочтений таксона от общего числа классифицированных прочтений.

Оценку α -разнообразия проводили с использованием индексов Берга–Паркера, Шеннона, Симпсона и обратного Симпсона. Для оценки β -разнообразия использовали расстояния Брэй–Кёртиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования проанализирована динамика микробного сообщества на последовательных этапах активации кефирных грибов, ферментации и последующего хранения готового продукта с использованием полногеномного метагеномного секвенирования. Полученные данные позволили определить таксономический состав микробиоты кефирных зёрен и жидкой фазы на различных временных точках, а также выявить ключевые закономерности в перестройке сообщества. Были изучены количественные изменения доминирующих и минорных таксонов, оценены показатели альфа- и бета-разнообразия, а также прослежены сукцессионные процессы, которые формируют структуру микробного консорциума на всех стадиях технологического процесса. Ниже представлены основные результаты таксономического анализа, динамики численности отдельных видов и оценка их вклада в формирование микробной экосистемы кефира.

Полногеномное секвенирование метагеномной ДНК образцов отобранных на различных этапах активации, ферментации и хранения кефира платформе FASTASeq 300

В результате полногеномного секвенирования ДНК-библиотек, подготовленных из образцов метагеномной ДНК кефирных грибов, было получено 86,66 млн прочтений с качеством $Q30 = 95,09\%$. Плотность кластеров, сформированных в ходе мостиковой ПЦР, составила 534 тыс./мм². Уровень демультимплексирования достиг 88,13%, а средний GC-состав — 39,32%. Основные полученные в результате анализа метрики качества секвенирования приведены в Таблице 1.

Результаты метагеномной таксономической классификации

Полученные после очистки и фильтрации по качеству прочтения были использованы для проведения метагеномной классификации микробного сообщества кефирных зёрен и кефира на каждом из исследованных временных участков. Запуск программы Kraken2 производился с использованием прямых прочтений с параметром «--minimum-hit-groups», равным двум. В ходе запуска программы было установлено, что количество классифицированных коротких прочтений колебалось от 61,4% до 96,7% (Рисунок 2). Наибольшее относительное количество бактериальных видов наблюдалось

Таблица 1

Результаты работы FastQC на коротких прочтениях

Table 1

FastQC Results on Short Reads

	Сырые данные			Данные после фильтрации		
	Объём данных	Число прочтений	GC, %	Объём данных	Число прочтений	GC, %
Точка 1	1,8 Gbp	12075152	40	1,6 Gbp	12072151	39
Точка 2	2,1 Gbp	14397231	41	1,8 Gbp	14394818	40
Точка 3	826,9 Mbp	5513010	37	773,5 Mbp	5510207	36
Точка 4	756,7 Mbp	5044833	38	704,8 Mbp	5042944	37
Точка 5	1 Gbp	7291471	42	969,9 Mbp	7282521	41
Точка 6	875,5 Mbp	5837135	38	822 Mbp	5835137	37
Точка 7	561,5 Mbp	3743732	39	518,4 Mbp	3739558	38
Точка 8	1,1 Gbp	7859937	38	1 Gbp	7857234	37
Точка 9	1,1 Gbp	7930818	38	1,1 Gbp	7926960	37
Точка 10	1 Gbp	6673510	39	912,7 Mbp	6670356	37

Рисунок 2

Результаты проведения иерархической метатеномной классификации, отражающей изменения в видовом разнообразии микробного сообщества кефирных грибов в процессе приготовления и созревания кефира

Figure 2

Results of Hierarchical Metagenomic Classification Showing Changes in the Species Diversity of the Kefir Grain Microbial Community during Kefir Production and Ripening

Name	Number of raw reads	Classified reads	Chordate reads	Artificial reads	Unclassified reads	Microbial reads	Bacterial reads	Viral reads	Fungal reads	Protozoan reads
asenievskie_point_01	12,072,151	61.4%	0.0152%	0%	38.6%	61.3%	60.5%	0.0354%	0.798%	0.0122%
asenievskie_point_02	14,394,818	92.7%	0.00952%	0%	7.31%	92.5%	91.5%	0.224%	0.755%	0.00512%
asenievskie_point_03	5,510,207	65%	0.185%	0%	35%	59.2%	49.9%	8.91%	0.0265%	0.164%
asenievskie_point_04	5,042,944	94.9%	0.13%	0%	5.1%	92.7%	91.1%	1.25%	0.0319%	0.112%
asenievskie_point_05	7,282,521	66.6%	2.32%	0%	33.4%	63.2%	57.2%	0.713%	0.0119%	2.57%
asenievskie_point_06	5,835,137	95.4%	0.199%	0%	4.64%	93.7%	91.5%	1.47%	0.00374%	0.326%
asenievskie_point_07	3,739,558	89.9%	0.524%	0%	10.1%	87.1%	82.7%	2.9%	0.0953%	0.678%
asenievskie_point_08	7,857,234	96.7%	0.119%	0%	3.27%	95.2%	93.8%	1.09%	0.00177%	0.149%
asenievskie_point_09	7,926,960	94.8%	0.159%	0%	5.2%	92.1%	89.1%	2.46%	0.00185%	0.237%
asenievskie_point_10	6,670,356	94.5%	0.189%	0%	5.5%	92.1%	89.3%	2.18%	0.00232%	0.27%
A										
Name	Number of raw reads	Classified reads	Chordate reads	Artificial reads	Unclassified reads	Microbial reads	Bacterial reads	Viral reads	Fungal reads	Protozoan reads
asenievskie_point_01	12,072,151	7,409,520	1,836	0	4,662,631	7,405,291	7,298,294	4,272	96,289	1,476
asenievskie_point_02	14,394,818	13,342,069	1,371	0	1,052,749	13,318,654	13,173,014	32,313	108,704	737
asenievskie_point_03	5,510,207	3,580,516	10,216	0	1,929,691	3,263,322	2,752,308	490,898	1,460	9,031
asenievskie_point_04	5,042,944	4,785,623	6,551	0	257,321	4,673,870	4,595,724	63,155	1,610	5,629
asenievskie_point_05	7,282,521	4,849,543	168,850	0	2,432,978	4,600,763	4,165,668	51,892	863	187,371
asenievskie_point_06	5,835,137	5,564,253	11,631	0	270,884	5,466,659	5,341,361	85,776	218	18,998
asenievskie_point_07	3,739,558	3,361,855	19,613	0	377,703	3,256,263	3,092,229	108,330	3,562	25,369
asenievskie_point_08	7,857,234	7,600,134	9,321	0	257,100	7,483,943	7,372,049	85,911	139	11,722
asenievskie_point_09	7,926,960	7,515,059	12,598	0	411,901	7,301,574	7,065,573	195,275	147	18,804
asenievskie_point_10	6,670,356	6,303,519	12,620	0	366,837	6,141,616	5,956,790	145,590	155	17,993
B										

Примечание. А — относительная представленность различных таксонов; В — соответствующее им количество коротких прочтений

Note. A — relative abundance of the different taxa; B — corresponding number of short reads

в точке № 8 и составляло 93,8 % прочтений, в то время как наибольшей представленностью грибов характеризовалась точка №1 — 0,798 % от всех полученных коротких прочтений. Вирусные последовательности были наиболее обильны в точке № 3 (8,91 %), в то время как лиофилизированные кефирные грибки отличались их наименьшим содержанием — всего лишь 0,0354 %.

Таксономический и численный состав лиофилизированных кефирных зёрен

Микробиота лиофилизированных грибков характеризовалась высокой степенью доминирования одного вида. Абсолютное количество прочтений составило в сумме более 7.34 миллионов. Наибольшую численность продемонстрировал таксон *Lactobacillus kefiranofaciens*., составивший 5 891 484 прочтения, что соответствует 80,22 %

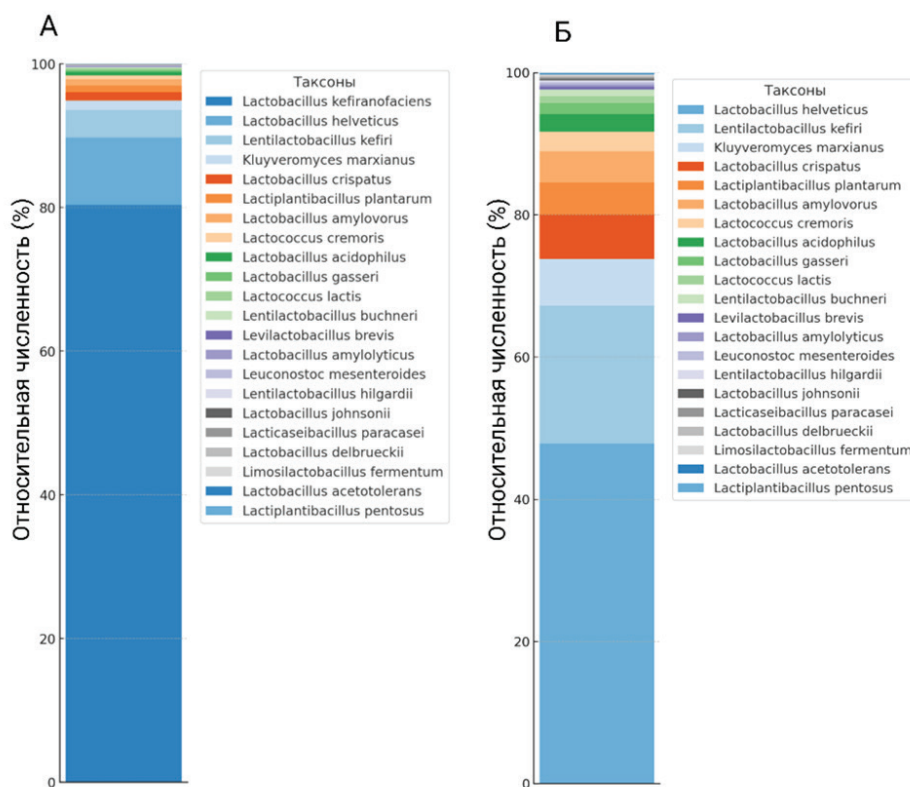
от общего микробного пула. Этот вид однозначно доминирует в составе и отражает его важную структурную и метаболическую роль в кефирных зёрнах. Вторым по численности оказался *Lactobacillus helveticus* (693 071 прочтений или 9,44 %), а третьим — *Lentilactobacillus kefir* (284 643 прочтений, 3,88 %). Эти три вида суммарно составляли более 93,5 % от общего числа секвенированных прочтений, что свидетельствует о выраженном доминантном ядре микробиоты. К субдоминантам относились *Kluyveromyces marxianus* (1,29 %), *Lactobacillus crispatus* (1,23 %), *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus amylovorus* и *Lactococcus cremoris* — от 0,6 до 0,8 %. Остальные виды, включая *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactocaseibacillus paracasei* и *Limosilactobacillus fermentum*, присутствовали в следовых количествах (<0,1 %) и формировали дополнительный микроразнообразный фон сообщества (Рисунок 3, 4).

Рисунок 3

Относительная численность (%) микроорганизмов лиофилизированных кефирных грибков на уровне видов

Figure 3

Relative Abundance (%) of Microorganisms in Lyophilized Kefir Grains at the Species Level



Примечание. А — полный профиль; Б — относительный состав микробного сообщества без доминирующего микроорганизма *L. kefiranofaciens*

Note. A — complete profile; B — relative composition of the microbial community without the dominant microorganism *L. kefiranofaciens*

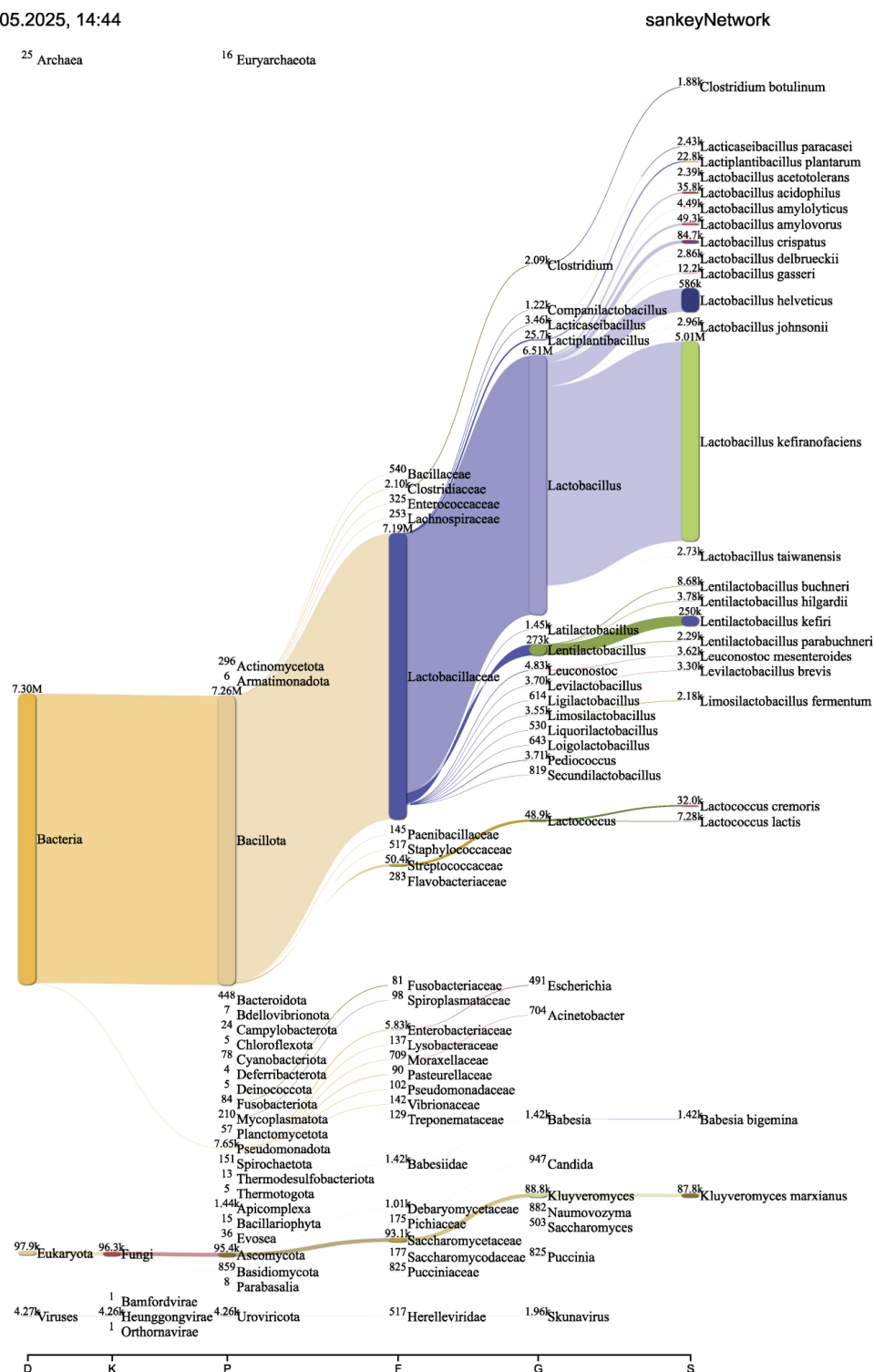
Рисунок 4

Таксономический профиль микробного сообщества лиофилизированных кефирных грибов

Figure 4

Taxonomic Profile of the Microbial Community of Lyophilized Kefir Grains

16.05.2025, 14:44



Примечание. Ось X соответствуют таксономическим уровням: D — домен; K — царство; P — тип; C — класс; O — отряд; F — семейство; G — род; S — вид.
Note. The X-axis corresponds to the taxonomic levels: D — domain; K — kingdom; P — phylum; C — class; O — order; F — family; G — genus; S — species.

Таким образом, микробное сообщество лиофилизированных кефирных грибов отличалось низким уровнем таксономического разнообразия и высокой степенью неравномерности распределения видов, что подтверждается низкими значениями индексов Шеннона (0.93) и Симпсона (0.36).

Большинство идентифицированных видов относятся к гомоферментативным молочнокислым бактериям, осуществляющим преимущественно образование молочной кислоты. К данной группе относятся *Lactococcus lactis*, *L. cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. acetotolerans*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *L. paracasei* и *L. johnsonii*. Гетероферментативные молочнокислые бактерии, продуцирующие наряду с молочной кислотой также CO₂, этанол и/или уксусную кислоту, представлены видами: *L. mesenteroides*, *L. brevis*, *L. kefir*, *L. fermentum*,

L. kefiranofaciens и *Lentilactobacillus hilgardii*, *L. buchneri*. Дрожжевой компонент микробиоты был представлен одним видом — *K. marxianus*.

Через 48 часов ферментации микробное сообщество кефирных зёрен претерпело заметные изменения (Рисунок 5).

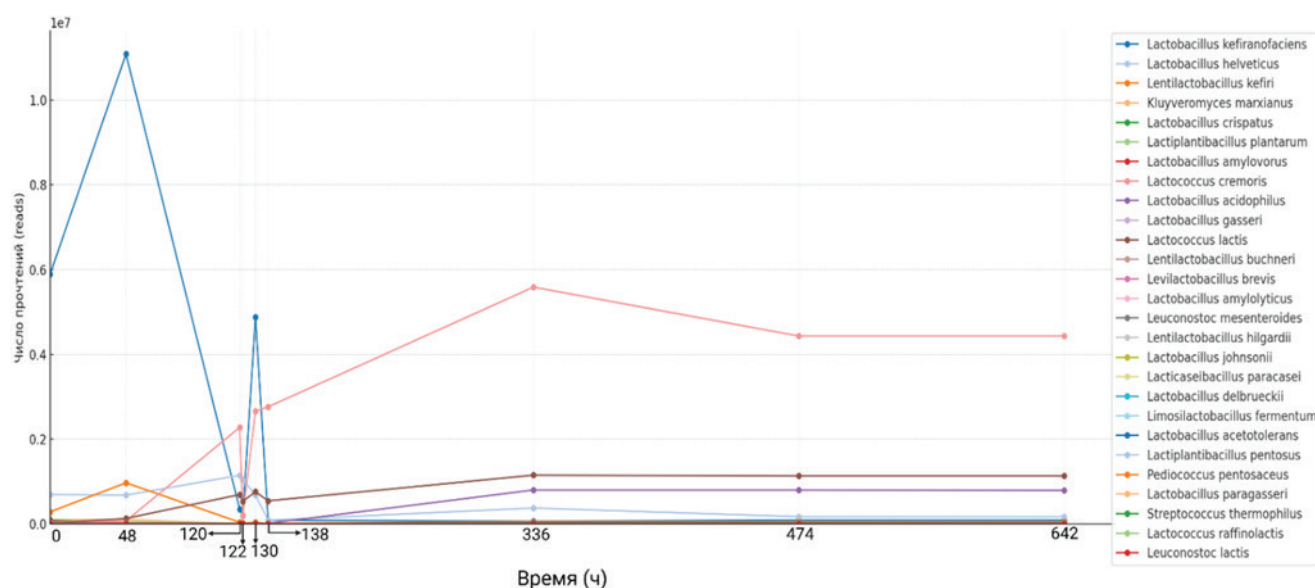
К 48 часам микробиота по-прежнему характеризовалась доминированием *L. kefirifaciens*, доля которого составляла 82,4% от общего микробного пула. Это подтверждает его ключевую роль в структуре и функционировании зрелого зерна. Вторым по численности остался *L. helveticus* (5,1 %), а третье место занял *L. kefir*, доля которого увеличилась по сравнению с исходным уровнем, достигнув 7,3%. Существенный рост также наблюдался у представителей рода *Lactococcus*: *L. cremoris* и *L. lactis* составили соответственно 0,53% и 0,97%. Многочисленные исследования рассматрива-

Рисунок 5

Динамика микробного сообщества на последовательных этапах активации кефирных грибков, формирования закваски и ферментации кефира

Figure 5

Dynamics of the Microbial Community at Successive Stages of Kefir Grain Activation, Starter Formation and Kefir Fermentation



Примечание. 0 ч — лиофилизированные грибки, 48 ч — метаболически активные (разбухшие) кефирные грибки, 120 ч — кефирная закваска, 122 ч — внесение 5% закваски в молоко, 130 ч — спустя 8 часов после ферментации при +20°C, 138 ч — спустя 8 часов после ферментации при +4°C, 336 ч — микробное сообщество кефира после 7 дней хранения при +4°C, 474 ч — микробиом кефира спустя 14 дней хранения при +4°C, 642 ч — микрофлора кефира спустя 21 день после хранения при +4°C.

Note. 0 h — lyophilized fungi, 48 h — metabolically active (swollen) kefir fungi, 120 h — kefir starter, 122 h — adding 5 % starter to milk, 130 h — 8 hours after fermentation at +20 °C, 138 h — 8 hours after fermentation at +4 °C, 336 h — kefir microbial community after 7 days of storage at +4 °C, 474 h — kefir microbiome after 14 days of storage at +4 °C, 642 h — kefir microflora after 21 days of storage at +4 °C.

ют *L. kefiranofaciens* как один из наиболее стабильных и доминирующих компонентов кефирных грибов, а совместное присутствие *L. kefiranofaciens* и представителей вида *L. kefir* описывается как типичная характеристика микробного ядра (Plessas et al., 2016).

Одновременно *L. helveticus* также нередко фиксируется в составе кефирных грибов и относится к числу часто встречающихся доминантных/субдоминантных видов, что согласуется с его сохранением в нашем эксперименте на стадии активации (González-Orozco et al., 2023).

Доля дрожжевого таксона *K. marxianus* также увеличилась, достигнув 0,79%. На фоне роста ряда ключевых молочнокислых бактерий численность некоторых ранее присутствующих видов, напротив, значительно снизилась. Так, *L. crispatus* уменьшился до 0,16%, *L. amylovorus* — до 0,15%, *L. acidophilus* — до 0,06%, а *L. gasseri* — до 0,03%. Примечательно, что к этому времени впервые в составе микробиоты были выявлены *Pediococcus pentosaceus* (0,01%) и *Lactobacillus paragasseri* (0,01%), доля которых в лиофилизированных зёрнах была менее 0,01%.

Таким образом, спустя 48 часов ферментации микробное сообщество сохраняло выраженное доминирование *L. kefiranofaciens*, при этом отмечалось увеличение таксономического разнообразия, обусловленное метаболической активацией отдельных таксонов, приводящей к выявлению видов, ранее не детектированных в лиофилизированных кефирных зёрнах.

Микробиом готовой кефирной закваски (120 ч)

На 120-м часу ферментации наблюдаются выраженные количественные изменения в структуре микробного сообщества (Рисунок 5). Численность ряда таксонов существенно изменилась по сравнению с предыдущим временным интервалом (0–48 ч): *L. cremoris* увеличился более чем в 32 раза: с 71 028 до 2 275 901 прочтений, став доминирующим видом на данном этапе. *L. helveticus* также продемонстрировал значительный рост — с 678 251 до 1 146 310 прочтений. *L. lactis* увеличился с 129 135 до 692 205 прочтений, что соответствует росту в ~5,4 раза. Одновременно произошло резкое снижение численности ранее доминирующего таксона: *L. kefiranofaciens* уменьшился с 11 081 207 до 346 473 прочтений, потеряв более 96% своей численности. Снижение численности также наблюдалось у: *L. kefir* — с 969 214 до 38 778 прочтений (уменьшение

на 96%). В составе микробиоты на 120 ч был впервые зафиксирован таксон: *Streptococcus thermophilus* — присутствует на уровне 4 605 прочтений, не обнаруженный на предыдущих временных точках. В то время как обнаруженные на предыдущем этапе таксоны, как *P. pentosaceus* и *L. paragasseri* не были детектированы, так как их численность оказались ниже порога обнаружения (0,1%). Вероятно, это связано с селективным давлением среды на поздних этапах ферментации (снижение pH) и конкурентным доминированием лактококков, типично наблюдаемым в готовом кефире, в результате чего ряд минорных компонентов консорциума сохраняется на следовых уровнях.

Временная точка 120 часов характеризуются переходом к новому микробному балансу с преобладанием *L. cremoris*, *L. lactis* и *L. helveticus*, а также значительным сокращением популяции *L. kefiranofaciens*.

Сукцессия микробиоты при производстве кефира

Микробный состав начальной точки приготовления кефира — этап внесения кефирной закваски в молоко (122 часа)

На 122-м часу ферментации, соответствующем моменту добавления 5% закваски в молоко, микробное сообщество характеризовалось преобладанием представителей молочнокислых бактерий (Рисунок 5). Доминирующим видом на данном этапе являлся *L. helveticus* — 1 045 059 прочтений, что составляет 52% от общего микробного пула. Далее следовали *L. lactis* — 535 682 прочтения (26,7%) и *L. cremoris* — 206 697 прочтений (10,3%).

Несмотря на снижение численности по сравнению с ранними этапами, *L. kefiranofaciens* продолжал присутствовать в составе сообщества, составив 200 068 прочтений (10%). В умеренном количестве сохранялся также *L. kefir* — 20 766 прочтений, что соответствует 1% от общего числа секвенированных фрагментов.

Этап ферментации кефира в термостате продолжительностью 8 часов (временная точка — 130 ч)

После внесения закваски и восьмичасовой ферментации в термостате (130 ч) микробное сообщество демонстрирует признаки активной ферментативной фазы. На этом этапе наблюдается значительное увеличение

численности ряда таксонов. *L. kefiranofaciens* вновь усиливает свои позиции, достигнув 4 878 051 прочтений (54,1%), что свидетельствует о его реактивации и участии в поддержании экзополисахаридного матрикса. *L. cremoris* достигает 2 662 544 прочтений (29,5%), *L. lactis* продолжает наращивать численность — 759 435 прочтений (8,4%), способствуя дальнейшему подкислению среды. *L. helveticus* сохраняется на стабильном уровне — 680 793 прочтений (7,5%), обеспечивая протеолитическую активность. *L. kefir* фиксируется в количестве 36 789 прочтений, что составляет 0,4% от общего числа секвенированных фрагментов.

Микробное сообщество готового кефира (138 часов)

После термостатной инкубации следует восьмичасовой этап дозревания и стабилизации продукта в условиях охлаждения при +4°C. После охлаждения (временная точка — 138 часов) напиток считается готовым. К 138 часу ферментации микробное сообщество претерпевает значительные изменения, указывающие на завершение активной фазы брожения. *L. cremoris* остаётся доминирующим таксоном, его численность составляет 2 760 970 прочтений (~55%), что подтверждает его ключевую роль в поддержании молочно-кислого метаболизма. *L. lactis* сохраняется в числе доминирующих видов, несмотря на снижение численности до 321 501 прочтения (~6,4%). *L. kefiranofaciens*, ранее демонстрировавший высокую активность, на этом этапе резко снижает свою численность до 88 024 прочтений (~1,8%), что указывает на завершение его участия в формировании экзополисахаридного матрикса. Схожая тенденция наблюдается и для *L. helveticus*, численность которого составляет 88 108 прочтений (~1,8%), что может отражать угасание протеолитической активности. *L. acidophilus* сохраняется на низком уровне — 14 000 прочтений (~0,3%), оставаясь минорным компонентом микробного сообщества на данной стадии ферментации.

Сукцессия микробного сообщества кефира в процессе хранения

Кефир 7 дней

На 306-м часу эксперимента микробное сообщество кефира демонстрирует значительные сдвиги в структуре, свидетельствующие о стабилизации процесса и смещении метаболической активности к устойчивым молоч-

нокислым формам. В сравнении с предыдущим этапом (138 ч), наблюдаются следующие ключевые изменения: *L. cremoris* продолжает занимать лидирующее положение и демонстрирует интенсивный рост численности: с 2 760 970 до 5 585 568 прочтений, более чем удваиваясь за рассматриваемый период. Это свидетельствует о его центральной роли в поддержании молочно-кислого брожения и стабильности заквасочной активности. *L. lactis* также увеличивает численность с 544 785 до 1 149 690 прочтений, оставаясь вторым по значимости видом в кокковом доминантном ядре. *L. acidophilus* демонстрирует внезапный рост — с 14 000 до 800 000 прочтений, что может указывать на активацию его популяции на поздней фазе ферментации, возможно, благодаря снижению конкурентного давления или адаптации к среде, насыщенной метаболитами. *L. helveticus* восстанавливает численность после снижения, увеличиваясь с 88 108 до 373 804 прочтений, что может отражать его участие в поздней протеолитической активности и формировании вкусового профиля продукта. Напротив, численность *L. kefiranofaciens* продолжает снижаться (с 88 347 до 62 168 прочтений), что, вероятно, связано с исчерпанием субстрата, необходимого для его экзополисахаридообразующей активности.

Этап 306 часов характеризуется консолидацией молочно-кислых кокков (*L. cremoris* и *L. lactis*) как ключевых игроков, а также включением дополнительных лактобацилл (в частности, *L. acidophilus*) в поддержание микробной стабильности и метаболической активности на поздних стадиях ферментации.

Кефир 14 дней

На 474-м часу ферментации наблюдаются следующие изменения: *L. cremoris*, оставаясь ведущим таксоном, снизил численность с 5 585 568 до 4 431 993 прочтений. Несмотря на уменьшение, он продолжает играть ключевую роль в поддержании молочно-кислой среды. *L. lactis* сохранил численность на прежнем уровне (снижение на ~18 тыс. прочтений). *L. acidophilus* остаётся на стабильном уровне (800 000 прочтений). *L. helveticus* демонстрирует снижение численности более чем в 2 раза (с 373 804 до 170 870 прочтений), что может указывать на спад его протеолитической функции. Примечательно, что *L. kefiranofaciens*, напротив, увеличил численность с 62 168 до 89 682 прочтений, что может свидетельствовать о временной реактивации.

Д.Д. Коваль, В.А. Ратайчук, А.В. Хан, Е.Г. Лазарева, О.Ю. Фоменко

Кефир 21 день

На 642-м часу ферментации микробное сообщество демонстрирует максимальную стабильность: численность всех ключевых таксонов либо сохраняется, либо изменяется незначительно. *L. cremoris* остаётся неизменным доминантом (4 431 993 прочтений), поддерживая стабильную кислотность среды. *L. lactis* также демонстрирует абсолютную стабильность (1 131 730 прочтений), подтверждая завершённую заквасочную активность. *L. acidophilus* слегка снизился — с 800 000 до 790 000 прочтений (–1,25%), однако сохраняет высокую численность, указывая на его роль в поздних фазах ферментации и возможной консервации. *L. helveticus* и *L. kefiranofaciens* остались на прежнем уровне (170 870 и 89 682 прочтений соответственно), что говорит о завершении всех фаз роста и метаболической активности этих видов.

Индексы биоразнообразия микробных сообществ кефирных грибов и готовой продукции

Альфа-разнообразие в контексте настоящего исследования отражает степень таксономического разнообразия микробных сообществ внутри каждого отдельного образца, включая как кефирные зёрна, так и жидкую фазу на различных этапах ферментации. Этот показатель позволяет количественно оценить, насколько сложным и сбалансированным является сообщество в каждый конкретный момент времени, а также отслеживать изменения в его структуре по мере протекания ферментационных процессов. Альфа-разнообразие включает в себя два ключевых аспекта: богатство видов (общее число таксонов, представленных в образце) и равномерность распределения (насколько равномерно представлены эти таксоны по численности).

Оценка альфа-разнообразия микробиоты проводилась с использованием индексов Берга–Паркера, Шеннона, Симпсона и обратного Симпсона.

На начальных стадиях (точка 1 — лиофилизированные кефирные зёрна, точка 2 — зёрна после метаболической активации) наблюдается высокая доля доминирующего таксона (индекс Берга–Паркера 0.796 и 0.831 соответственно), а также низкие значения индексов Шеннона (0.926 и 0.780) и Симпсона (0.356 и 0.302), что указывает на низкое разнообразие и выраженную неравномерность в распределении таксонов (Таблица 2). Это характерно для неактивных или только что ак-

тивированных сообществ, в которых преобладает ограниченное число видов.

С началом ферментации (точки 3–5) происходит значительное увеличение таксономического разнообразия: индекс Шеннона достигает максимума на Точке 5 (1.974), как и индекс Симпсона (0.760) и обратный индекс Симпсона (4.165), что свидетельствует о росте богатства видов и выравнивании их относительного обилия. Одновременно отмечается резкое снижение значения индекса Берга–Паркера (до 0.414), указывающее на ослабление доминантности одного вида. Эти

Таблица 2
Значения индексов альфа-разнообразия, вычисленных для экспериментальных точек

Table 2
Values of Alpha Diversity Indices Calculated for Experimental Points

Образец	Индекс разнообразия Берга — Паркера	Индекс разнообразия Шеннона	Индекс разнообразия Симпсона	Обратный индекс Симпсона
Точка 1	0.796	0.926	0.356	1.554
Точка 2	0.831	0.780	0.302	1.432
Точка 3	0.562	1.886	0.651	2.862
Точка 4	0.476	1.633	0.690	3.223
Точка 5	0.414	1.974	0.760	4.165
Точка 6	0.659	1.327	0.532	2.137
Точка 7	0.658	1.496	0.537	2.162
Точка 8	0.735	1.087	0.434	1.766
Точка 9	0.653	1.378	0.532	2.139
Точка 10	0.704	1.230	0.472	1.892

Примечание. Точка 1 — лиофилизированные зёрна (0 ч), точка 2 — метаболически активные (разбухшие) кефирные зёрна (48 ч), точка 3 — молочная среда, в которой культивировались зёрна (48 ч), 4 точка — кефирная закваска (120 ч), 5 точка — внесение 5% закваски в молоко (122 ч), 6 точка — спустя 8 часов после ферментации при +20 °C (130 ч), 7 точка — спустя 8 часов после ферментации при +4 °C (138 ч), 8 точка — микробное сообщество кефира после 7 дней хранения при +4 °C (336 ч), 9 точка — микробиом кефира спустя 14 дней хранения при +4 °C (474 ч), 10 точка — микрофлора кефира спустя 21 день после хранения при +4 °C (642 ч).

Note. Point 1 — lyophilized grains (0 h), point 2 — metabolically active (swollen) kefir grains (48 h), point 3 — milk medium in which the grains were cultivated (48 h), point 4 — kefir starter (120 h), point 5 — adding 5% starter to milk (122 h), point 6–8 hours after fermentation at +20 °C (130 h), point 7–8 hours after fermentation at +4 °C (138 h), point 8 — kefir microbial community after 7 days of storage at +4 °C (336 h), point 9 — kefir microbiome after 14 days of storage at +4 °C (474 h), point 10 — kefir microflora after 21 days of storage at +4 °C (642 h).

изменения отражают активную фазу микробной сукцессии, сопровождающуюся метаболической активацией ранее подавленных таксонов.

На более поздних этапах (Точки 6–10), соответствующих завершению ферментации и хранению продукта, отмечается умеренное снижение всех индексов разнообразия по сравнению с пиком в Точке 5. Индекс Шеннона снижается до 1.230 (Точка 10), а индекс Берга–Паркера возрастает до 0.704, что свидетельствует о частичной реструктуризации сообщества и селективном сохранении более устойчивых или метаболически активных таксонов (Таблица 2). Тем не менее, уровень разнообразия в этих точках остаётся выше, чем в исходных кефирных зёрнах, что указывает на формирование стабилизированного, но более разнообразного микробного сообщества в готовом продукте.

Бета-разнообразие (β -разнообразие) отражает степень различий в составе микробных сообществ между образцами, отобранными на разных этапах ферментации и хранения. Этот показатель позволяет оценить, насколько существенно изменяются таксономический состав и структура микробиоты в динамике.

На основе матрицы расстояний Брэй–Кёртиса была построена тепловая карта, отражающая таксономические различия между микробными сообществами в образцах, отобранных на различных этапах ферментации (Рисунок 6). Более тёмные оттенки красного соответствуют более высоким значениям индекса, указывающим на существенные различия в составе микробиоты.

Наибольшие различия в таксономическом составе наблюдаются между лиофилизированными кефирными зёрнами (точка 1) и микробным сообществом жидкой среды на стадии активации (точка 3), что указывает на выраженную перестройку микробиоты при переходе к ферментативной активности. В то же время состав самих кефирных зёрен после начала ферментации претерпевает менее значительные изменения, оставаясь более стабильным по сравнению с микробиотой жидкой фазы (точка 2). В то же время, минимальные различия выявлены между: кефиром, хранящимся 14 дней (9 точка) и кефиром, хранящимся 21 день (10 точка), что говорит о стабилизации микробной структуры в зрелом напитке после завершения ферментации и периода хранения.

Рисунок 6

Матрица бета-разнообразия между микробными сообществами различных временных точек

Figure 6

Beta Diversity Matrix between Microbial Communities at Different Time Points

	Точка 1	Точка 2	Точка 3	Точка 4	Точка 5	Точка 6	Точка 7	Точка 8	Точка 9	Точка 10
Точка 1	0	0,305	0,958	0,8	0,83	0,857	0,949	0,921	0,903	0,941
Точка 2			0,951	0,849	0,87	0,885	0,948	0,928	0,913	0,942
Точка 3				0,613	0,655	0,632	0,578	0,629	0,558	0,575
Точка 4					0,163	0,226	0,23	0,41	0,384	0,37
Точка 5						0,311	0,258	0,485	0,458	0,453
Точка 6							0,28	0,214	0,194	0,154
Точка 7								0,423	0,404	0,33
Точка 8									0,087	0,113
Точка 9										0,088
Точка 10										0

Примечание. Точка 1 — лиофилизированные зёрна (0 ч), точка 2 — метаболически активные (разбухшие) кефирные зёрна (48 ч), точка 3 — молочная среда, в которой культивировались зёрна (48 ч), 4 точка — кефирная закваска (120 ч), 5 точка — внесение 5 % закваски в молоко (122 ч), 6 точка — спустя 8 часов после ферментации при +20 °C (130 ч), 7 точка — спустя 8 часов после ферментации при +4 °C (138 ч), 8 точка — микробное сообщество кефира после 7 дней хранения при +4 °C (336 ч), 9 точка — микробиом кефира спустя 14 дней хранения при +4 °C (474 ч), 10 точка — микрофлора кефира спустя 21 день после хранения при +4 °C (642 ч).

Note. Point 1 — lyophilized grains (0 h), point 2 — metabolically active (swollen) kefir grains (48 h), point 3 — milk medium in which the grains were cultivated (48 h), point 4 — kefir starter (120 h), point 5 — adding 5% starter to milk (122 h), point 6–8 hours after fermentation at +20 °C (130 h), point 7–8 hours after fermentation at +4 °C (138 h), point 8 — kefir microbial community after 7 days of storage at +4 °C (336 h), point 9 — kefir microbiome after 14 days of storage at +4 °C (474 h), point 10 — kefir microflora after 21 days of storage at +4 °C (642 h).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты демонстрируют чёткую последовательную смену доминирующих микроорганизмов в ходе ферментации молока с использованием кефирных грибов. Кефирный гриб сам по себе является носителем микробиоты, в которой преобладают молочнокислые бактерии, при этом один или несколько видов молочнокислых бактерий составляют подавляющее большинство сообщества, а дрожжи присутствуют в меньшем количестве (Kalamaki & Angelidis, 2020; González-Orozco et al., 2023). Полученные нами результаты согласуются с результатами предыдущих исследований кефирных грибов: микробное сообщество лиофилизированных образцов характеризовалось выраженным преобладанием представителей рода *Lactobacillus*, прежде всего *L. kefirifaciens* и *L. helveticus*. Дрожжевой компонент составлял 1,29% и был представлен *K. marxianus*. В исследовании González-Orozco et al. (2023) доля эукариотической составляющей была сопоставимой (0,9%), однако включала три вида — *K. marxianus*, *K. africana* и *N. dairenensis*.

L. kefirifaciens является ключевым структурообразующим компонентом, ответственным за синтез экзополисахарида кефирана и формирование полисахаридного матрикса зёрен. Данный вид обнаруживается в большинстве описанных кефирных грибов по всему миру, включая азиатские, европейские и южноамериканские образцы (Luo, et al., 2023; Tingirikari, J.M.R., et al., 2024; McGovern et al., 2024; Ströher, et al., 2025). Его присутствие в изученных культурах кефирных грибов может свидетельствовать о едином происхождении симбиотического сообщества. Вторым по численности видом в микробиоте кефирных грибов являлся *L. helveticus*, что согласуется с данными других исследований, где данный таксон описывается как типичный представитель микробного ядра кефирных грибов (McGovern et al., 2024). *L. helveticus* принимает участие в гомоферментативном молочнокислом брожении, сопровождающемся интенсивным образованием молочной кислоты и быстрым снижением pH. По литературным данным, данный вид обладает более высокой кислотогенной активностью по сравнению с *Lactobacillus bulgaricus* и *St. thermophilus* (Warakaulle et al., 2025), что обусловлено его эффективным метаболизмом лактозы, обеспечивающим ускоренное подкисление среды и рост титруемой кислотности. Кроме того, данный вид обладает выраженной протеолитической активностью, обеспе-

чивающей расщепление молочных белков и образование аминокислот и пептидов, используемых другими участниками сообщества в качестве источников азота и факторов роста. Предположительно, *L. helveticus* в исследуемых нами кефирных грибах вносит наибольший вклад в формирование белковой составляющей их матрикса. На ранних стадиях ферментации его численность возрастает, что, вероятно, связано с активным протеолизом и участием в формировании сгустка. Вероятно, после образования плотной коагуляционной структуры *L. helveticus* переходит в состояние низкой метаболической активности, что обусловлено истощением белковых субстратов и снижением pH до неблагоприятных значений. Оптимальный диапазон роста *L. helveticus* составляет pH 5,5–5,8 (Zhao et al., 2024), тогда как при pH < 4,5 может наблюдаться угнетение его роста (Guron et al., 2023).

Сохранение высокой численности *L. helveticus* как в структуре кефирных зёрен, так и в закваске согласуется с данными других исследований (McGovern et al., 2024) и указывает на устойчивую вовлеченность данного вида в симбиотический консорциум. Его присутствие в обеих фазах — прикрепленной (кефирные грибки) и планктонной (жидкой) — отражает экологическую пластичность *L. helveticus* и способность адаптироваться к различным микросредам в процессе ферментации. Помимо *L. helveticus*, в «планктонной» заквасочной микробиоте, т.е. после удаления кефирных грибов из жидкой фракции и получения закваски, обнаруживаются *L. cremoris* и *L. lactis*, при этом обнаруживается и немногочисленный *L. kefirifaciens*.

Постепенно рост *L. helveticus* угнетается, уступая место более кислотоустойчивым видам — *L. cremoris* и *L. lactis*, которые способны сохранять метаболическую активность при снижении pH до ≈ 4.7 –5,0 (Carvalho, 2013). Такая перестройка согласуется с данными других исследований, где на поздних стадиях ферментации наблюдается переход от доминирования палочковидных лактобацилл к кокковым формам, адаптированным к повышенной кислотности (Alraddadi, 2022). Микробное сообщество готового кефира также характеризуется доминированием *L. cremoris* и *L. lactis*, что согласуется с их пиковым развитием на поздних стадиях активной ферментации.

После формирования сгустка продукт помещается в холодильную камеру при +4 °C, и именно эти мезофильные, но сравнительно холодоустойчивые виды сохраняют численность и метаболическую активность в условиях

пониженной температуры (Dimitreli et al., 2025), в то время как рост термофильных и менее адаптированных таксонов, таких как *L. helveticus* и *L. kefiranofaciens*, угнетается. Во время хранения при +4°C (от 7 до 21 суток) фиксируется наличие — *L. acidophilus*, что указывает на его участие в поздних стадиях созревания, где данный вид метаболизирует остаточные углеводы и способствуя формированию органолептического профиля продукта. Подавленный рост термофильных видов и сохранение метаболической активности мезофильных представителей обеспечивает протекание постферментационных процессов (созревание и стабилизацию аромата). Данный вид известен своей способностью к выживанию в кислой среде, богатой продуктами первичного метаболизма и пептидами, образованными в ходе протеолиза (Gao et al., 2022). Его всплеск на завершающем этапе ферментации может быть связан со снижением конкурентного давления со стороны быстрорастущих лактококков и с переходом сообщества к фазе вторичных метаболических взаимодействий, направленных на переработку остаточных субстратов. *L. acidophilus* в этих условиях может вносить вклад в постферментационное «дозревание» кефира, участвуя в формировании органолептических характеристик продукта за счёт синтеза органических кислот и летучих соединений (Gao et al., 2022).

Анализ β -разнообразия выявил выраженную пространственно-функциональную дифференциацию между «структурным ядром» зёрен и «планктонной» фазой на начальном этапе активной ферментации. Такая дихотомия отражает фундаментальные различия между прикреплённой и свободноживущей микробиотой: первая представляет собой устойчивое симбиотическое ядро, поддерживающее стабильный состав ключевых таксонов, тогда как вторая характеризуется высокой динамичностью и быстрой сменой доминирующих видов в ответ на изменение условий среды. В то же время минимальные различия между микробными сообществами на 14-е и 21-е сутки ферментации свидетельствуют о достижении так называемого «экологического плато» — состояния относительного равновесия, при котором сообщество зрелого напитка стабилизируется и дальнейшие сукцессионные сдвиги минимальны.

Полученные данные согласуются с представлением о грибах как об устойчивом доноре микробного потока, обеспечивающем заселение жидкой фазы микроорганизмами, в то время как сама жидкая фаза является динамич-

ной средой, в которой происходят последовательные сукцессионные изменения в ответ на метаболическую активность микробов (Biçer et al., 2025). Эту динамику формируют сами микроорганизмы, чья метаболическая активность последовательно изменяет параметры среды — pH, состав и доступность субстратов, концентрацию метаболитов и сигнальных молекул. Эти изменения, в свою очередь, определяют дальнейшую сукцессию: так, виды, активно растущие на ранних этапах, истощают доступные ресурсы и создают новые ниши, благоприятные для роста других участников сообщества.

Ограничения исследования

Настоящее исследование было ограничено анализом микробной динамики в пределах одного типа кефирных грибов и на основе лабораторно контролируемого процесса ферментации. Полученные данные могут не полностью отражать вариабельность микробного состава кефира, получаемого с использованием других штаммов грибов, различных молочных сырьевых материалов или промышленных технологий ферментации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование позволило охарактеризовать сукцессионные процессы, происходящие в микробных сообществах при ферментации молока с использованием кефирных грибов. Установлено, что кефирные грибки выступают как устойчивый источник микробиоты, обеспечивающий формирование сбалансированного симбиотического сообщества в жидкой фазе. Полученные данные не только уточняют представления о механизмах микробной сукцессии в ферментированных системах, но и демонстрируют потенциал кефирных грибов в качестве модели естественного симбиотического биоценоза. Практическая значимость работы заключается в возможности использования выявленных закономерностей для оптимизации биотехнологических параметров ферментации, разработки стандартизированных заквасок и прогнозирования стабильности качества кисломолочных продуктов. Перспективным направлением дальнейших исследований является изучение межвидовых взаимодействий и метаболической кооперации микроорганизмов кефирных грибов с применением метатранскриптомного и метаболомного анализа, что позволит глубже понять принципы устойчивости и самоорганизации симбиотических микробных систем.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Коваль Дарья Дмитриевна: разработка концепции; формальный анализ; проведение исследования; визуализация; написание черновика рукописи.

Ратайчук Виктор Александрович: формальный анализ; визуализация.

Хан Алексей Владимирович: проведение исследования; написание рукописи –рецензирование и редактирование.

Лазарева Екатерина Германовна: проведение исследования; написание рукописи — рецензирование и редактирование.

Фоменко Олег Юрьевич: разработка концепции; формальный анализ; написание рукописи –рецензирование и редактирование; научное руководство.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Koval Daria Dmitrievna: conceptualization; formal analysis; investigation; visualization; writing — original draft preparation.

Rataichuk Viktor Aleksandrovich: formal analysis; visualization.

Khan Alexey Vladimirovich: investigation; writing — review & editing.

Lazareva Ekaterina Germanovna: investigation; writing — review & editing.

Fomenko Oleg Yurievich: conceptualization; formal analysis; writing — review & editing; supervision.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дин Фань, Стоянова Л. Г., & Нетрусов А. И. (2022). Микробиом и метаболитические свойства кефирных зерен и кефира на их основе. *Микробиология*, 91(4), 391–409. <https://doi.org/10.31857/S0026365622100214>
- Abdalla, A. K., Ayyash, M. M., Olaimat, A. N., Osaili TM, Al-Nabulsi, A.A., Shah, N.P., & Holley, R.I. (2021). Exopolysaccharides as antimicrobial agents: Mechanism and spectrum of activity. *Frontiers in Microbiology*, 12, 664395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664395>
- Alraddadi, F., Ross, T., & Powell, S. (2022). Evaluation of the microbial communities in kefir grains and kefir over time. *International Dairy Journal*, 136, 105490. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105490>
- Avila-Reyes, S. V., Márquez-Morales, C. E., Moreno-León, G. R., Jiménez-Aparicio, A. R., Arenas-Ocampo, M. L., Solorza-Feria, J., García-Armenta, E., & Villalobos-Espinosa, J. C. (2022). Comparative analysis of fermentation conditions on the increase of biomass and morphology of milk kefir grains. *Applied Sciences*, 12(5), 2459. <https://doi.org/10.3390/app12052459>
- Baars, T., van Esch, B., van Ooijen, L., Zhang, Z., Dekker, P., Boeren, S., et al. (2023). Raw milk kefir: Microbiota, bioactive peptides, and immune modulation. *Food & Function*, 14(2), 1000–1017. <https://doi.org/10.1039/D2FO03248A>
- Bıçer, Y., Telli, A. E., Turkal, G., Telli, N., & Uçar, G. (2025). From raw to fermented: Uncovering the microbial wealth of dairy. *Fermentation*, 11(10), 552. <https://doi.org/10.3390/fermentation11100552>
- Blasche, S., Kim, Y., Mars, R. A. T., Machado, D., Maansson, M., Kafkia, E., et al. (2021). Metabolic cooperation and spatiotemporal niche partitioning in a kefir microbial community. *Nature Microbiology*, 6(2), 196–208. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00816-5>
- Breitwieser, F. P., & Salzberg, S. L. (2019). Pavian: Interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. *Bioinformatics*, 35(20), 4180–4182. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz715>

- Dimitreli, G., Exarhopoulos, S., Apidopoulou, P., Groztidou, O., Georgiou, D., Kalogianni, E. P., & Goulas, A. (2025). Effect of final fermentation pH and pre-drying storage temperature on properties of kefir powder produced by kefir grains. *Applied Sciences*, 15(5), 2509. <https://doi.org/10.3390/app15052509>
- Ding, F., Krasilnikova, A. A., Leontieva, M. R., Stoyanova, L. G., & Netrusov, A. I. (2022). Analysis of kefir grains from different regions of the planet using high-throughput sequencing. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 77(4), 286–291. <https://doi.org/10.3103/S0096392522040010>
- Dong, X., Shu, G., Kang, J., Zhang, Q., Ma, L., Zhang, M., Chen, H., & Wan, H. (2022). Microbial diversity of six commercially available kefir grains. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 26, 287–292. <https://doi.org/10.2478/aucft-2022-0023>
- Encinas-Vazquez, I. A., Carrillo-Pérez, E., Martín-García, A. R., Del-Toro-Sánchez, C. L., Márquez-Ríos, E., Bastarrachea, L. J., & Rodríguez-Figueroa, J. C. (2023). Effects of high-intensity ultrasound pretreatment on the exopolysaccharide concentration and biomass increase in cheese whey kefir. *Processes*, 11(7), 1905. <https://doi.org/10.3390/pr11071905>
- Gao, H., Li, X., Chen, X., Hai, D., Wei, C., Zhang, L., & Li, P. (2022). The functional roles of *Lactobacillus acidophilus* in different physiological and pathological processes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(10), 1226–1233. <https://doi.org/10.4014/jmb.2205.05041>
- González-Orozco, B. D., García-Cano, I., Escobar-Zepeda, A., Jiménez-Flores, R., & Álvarez, V. B. (2023). Metagenomic analysis and antibacterial activity of kefir microorganisms. *Journal of Food Science*, 88(7), 2933–2949. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16614>
- Guron, G. K. P., Chelladurai, K., et al. (2023). Differential behavior of *Lactobacillus helveticus* B1929 and ATCC 15009 during milk fermentations. *Journal of Dairy Science*, 106(7), 4502–4515. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22769>
- Kalamaki, M. S., & Angelidis, A. S. (2020). High-throughput, sequence-based analysis of the microbiota of Greek kefir grains from two geographic regions. *Food Technology and Biotechnology*, 58(2), 138–146. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6581>
- Kotova, I. B., Cherdynseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2016). Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 932, 93–121. https://doi.org/10.1007/5584_2016_2
- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2564–2572. <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>
- Lu, J., Breitwieser, F. P., Thielen, P., & Salzberg, S. L. (2017). Bracken: Estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science*, 3, e104. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>
- Lu, J., Rincon, N., Wood, D. E., Breitwieser, F. P., Pockrandt, C., Langmead, B., Salzberg, S. L., & Steinegger, M. (2022). Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nature Protocols*, 18(2), 423–445. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00738-y>
- Luo, J., Liu, S., Lu, H., Chen, Q., & Shi, Y. (2023). Microbial community variations and bioconversion improvements during soybean-based fermentation by kefir grains. *Foods*, 12(8), 1588. <https://doi.org/10.3390/foods12081588>
- Marshall, V. M., Cole, W. M., & Brooker, B. E. (1984). Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. *Journal of Applied Bacteriology*, 57(3), 491–497.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, 17(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- McGovern, C. J., González-Orozco, B. D., & Jiménez-Flores, R. (2024). Evaluation of kefir grain microbiota, grain viability, and bioactivity from fermenting dairy processing by-products. *Journal of Dairy Science*, 107(7), 4259–4276. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24364>
- Powell, J. E., Witthuhn, R. C., Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2007). Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal*, 17(3), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.02.012>

- Plessas, S., Nouska, C., Mantzourani, I., Kourkoutas, Y., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2017). Microbiological exploration of different types of kefir grains. *Fermentation*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010001>
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1177. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177>
- Saleem, K., Ikram, S., Saeed, F., Afzaal, M., Ateeq, H., Hussain, M., Raza, A., Rasheed, A., Asghar, A., & Shah, M.A.I. (2023). Nutritional and functional properties of kefir: Review. *International Journal of Food Properties*, 26, e2280437. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2280437>
- Ströher, J. A., Oliveira, W. d. C., de Freitas, A. S., Salazar, M. M., da Silva, L. d. F. F., Bresciani, L., Flôres, S. H., & Malheiros, P. d. S. (2025). A global review of geographical diversity of kefir microbiome. *Fermentation*, 11(3), 150. <https://doi.org/10.3390/fermentation11030150>
- Tingirikari, J. M. R., Sharma, A., & Lee, H. J. (2024). Kefir: A fermented plethora of symbiotic microbiome and health. *Journal of Ethnic Foods*, 11, 35. <https://doi.org/10.1186/s42779-024-00252-4>
- Walsh, L. H., Coakley, M., Walsh, A. M., Crispie, F., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2023). Analysis of the milk kefir pan-metagenome reveals four community types, core species, and associated metabolic pathways. *iScience*, 26(10), 108004. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108004>
- Warakulle, S., Ayyash, M. M., & Kamal-Eldin, A. (2025). Profiling protein hydrolysis and amino acid metabolism in camel and bovine milk fermented by *Lactobacillus helveticus*, *L. bulgaricus*, and *Streptococcus thermophilus*. *Scientific Reports*, 15(1), 18371. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-02944-6>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20, 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Zhao, J., Zeng, X., Xi, Y., & Li, J. (2024). Recent advances in the applications of *Lactobacillus helveticus* in the fermentation of plant-based beverages: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 147, 104427. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104427>

REFERENCES

- Abdalla, A. K., Ayyash, M. M., Olaimat, A. N., Osaili TM, Al-Nabulsi, A.A., Shah, N.P., & Holley, R.I. (2021). Exopolysaccharides as antimicrobial agents: Mechanism and spectrum of activity. *Frontiers in Microbiology*, 12, 664395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664395>
- Alraddadi, F., Ross, T., & Powell, S. (2022). Evaluation of the microbial communities in kefir grains and kefir over time. *International Dairy Journal*, 136, 105490. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105490>
- Avila-Reyes, S. V., Márquez-Morales, C. E., Moreno-León, G. R., Jiménez-Aparicio, A. R., Arenas-Ocampo, M. L., Solorza-Feria, J., García-Armenta, E., & Villalobos-Espinosa, J. C. (2022). Comparative analysis of fermentation conditions on the increase of biomass and morphology of milk kefir grains. *Applied Sciences*, 12(5), 2459. <https://doi.org/10.3390/app12052459>
- Baars, T., van Esch, B., van Ooijen, L., Zhang, Z., Dekker, P., Boeren, S., et al. (2023). Raw milk kefir: Microbiota, bioactive peptides, and immune modulation. *Food & Function*, 14(2), 1000–1017. <https://doi.org/10.1039/D2FO03248A>
- Bıçer, Y., Telli, A. E., Turkal, G., Telli, N., & Uçar, G. (2025). From raw to fermented: Uncovering the microbial wealth of dairy. *Fermentation*, 11(10), 552. <https://doi.org/10.3390/fermentation11100552>
- Blasche, S., Kim, Y., Mars, R. A. T., Machado, D., Maansson, M., Kafkia, E., et al. (2021). Metabolic cooperation and spatiotemporal niche partitioning in a kefir microbial community. *Nature Microbiology*, 6(2), 196–208. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00816-5>
- Breitwieser, F. P., & Salzberg, S. L. (2019). Pavian: Interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. *Bioinformatics*, 35(20), 4180–4182. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz715>

- Dimitreli, G., Exarhopoulos, S., Apidopoulou, P., Groztidou, O., Georgiou, D., Kalogianni, E. P., & Goulas, A. (2025). Effect of final fermentation pH and pre-drying storage temperature on properties of kefir powder produced by kefir grains. *Applied Sciences*, 15(5), 2509. <https://doi.org/10.3390/app15052509>
- Ding, F., Krasilnikova, A. A., Leontieva, M. R., Stoyanova, L. G., & Netrusov, A. I. (2022). Analysis of kefir grains from different regions of the planet using high-throughput sequencing. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 77(4), 286–291. <https://doi.org/10.3103/S0096392522040010>
- Ding, F., Stoyanova, L. G., & Netrusov, A. I. (2022). Microbiome and metabiotic properties of kefir grains and kefir based on them. *Microbiology*, 91(4), 339–355. <https://doi.org/10.1134/S0026261722100885>
- Dong, X., Shu, G., Kang, J., Zhang, Q., Ma, L., Zhang, M., Chen, H., & Wan, H. (2022). Microbial diversity of six commercially available kefir grains. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 26, 287–292. <https://doi.org/10.2478/auaft-2022-0023>
- Encinas-Vazquez, I. A., Carrillo-Pérez, E., Martín-García, A. R., Del-Toro-Sánchez, C. L., Márquez-Ríos, E., Bastarrachea, L. J., & Rodríguez-Figueroa, J. C. (2023). Effects of high-intensity ultrasound pretreatment on the exopolysaccharide concentration and biomass increase in cheese whey kefir. *Processes*, 11(7), 1905. <https://doi.org/10.3390/pr11071905>
- Gao, H., Li, X., Chen, X., Hai, D., Wei, C., Zhang, L., & Li, P. (2022). The functional roles of *Lactobacillus acidophilus* in different physiological and pathological processes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(10), 1226–1233. <https://doi.org/10.4014/jmb.2205.05041>
- González-Orozco, B. D., García-Cano, I., Escobar-Zepeda, A., Jiménez-Flores, R., & Álvarez, V. B. (2023). Metagenomic analysis and antibacterial activity of kefir microorganisms. *Journal of Food Science*, 88(7), 2933–2949. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16614>
- Guron, G. K. P., Chelladurai, K., et al. (2023). Differential behavior of *Lactobacillus helveticus* B1929 and ATCC 15009 during milk fermentations. *Journal of Dairy Science*, 106(7), 4502–4515. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22769>
- Kalamaki, M. S., & Angelidis, A. S. (2020). High-throughput, sequence-based analysis of the microbiota of Greek kefir grains from two geographic regions. *Food Technology and Biotechnology*, 58(2), 138–146. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6581>
- Kotova, I. B., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2016). Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 932, 93–121. https://doi.org/10.1007/5584_2016_2
- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2564–2572. <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>
- Lu, J., Breitwieser, F. P., Thielen, P., & Salzberg, S. L. (2017). Bracken: Estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science*, 3, e104. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>
- Lu, J., Rincon, N., Wood, D. E., Breitwieser, F. P., Pockrandt, C., Langmead, B., Salzberg, S. L., & Steinegger, M. (2022). Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nature Protocols*, 18(2), 423–445. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00738-y>
- Luo, J., Liu, S., Lu, H., Chen, Q., & Shi, Y. (2023). Microbial community variations and bioconversion improvements during soybean-based fermentation by kefir grains. *Foods*, 12(8), 1588. <https://doi.org/10.3390/foods12081588>
- Marshall, V. M., Cole, W. M., & Brooker, B. E. (1984). Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. *Journal of Applied Bacteriology*, 57(3), 491–497.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet:journal*, 17(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- McGovern, C. J., González-Orozco, B. D., & Jiménez-Flores, R. (2024). Evaluation of kefir grain microbiota, grain viability, and bioactivity from fermenting dairy processing by-products. *Journal of Dairy Science*, 107(7), 4259–4276. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24364>

- Powell, J. E., Witthuhn, R. C., Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2007). Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal*, 17(3), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.02.012>
- Plessas, S., Nouska, C., Mantzourani, I., Kourkoutas, Y., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2017). Microbiological Exploration of Different Types of Kefir Grains. *Fermentation*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010001>
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1177. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177>
- Saleem, K., Ikram, S., Saeed, F., Afzaal, M., Ateeq, H., Hussain, M., Raza, A., Rasheed, A., Asghar, A., & Shah, M.A. (2023). Nutritional and functional properties of kefir: Review. *International Journal of Food Properties*, 26, e2280437. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2280437>
- Ströher, J. A., Oliveira, W. d. C., de Freitas, A. S., Salazar, M. M., da Silva, L. d. F. F., Bresciani, L., Flôres, S. H., & Malheiros, P. d. S. (2025). A global review of geographical diversity of kefir microbiome. *Fermentation*, 11(3), 150. <https://doi.org/10.3390/fermentation11030150>
- Tingirikari, J. M. R., Sharma, A., & Lee, H. J. (2024). Kefir: A fermented plethora of symbiotic microbiome and health. *Journal of Ethnic Foods*, 11, 35. <https://doi.org/10.1186/s42779-024-00252-4>
- Walsh, L. H., Coakley, M., Walsh, A. M., Crispie, F., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2023). Analysis of the milk kefir pan-metagenome reveals four community types, core species, and associated metabolic pathways. *iScience*, 26(10), 108004. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108004>
- Warakulle, S., Ayyash, M. M., & Kamal-Eldin, A. (2025). Profiling protein hydrolysis and amino acid metabolism in camel and bovine milk fermented by *Lactobacillus helveticus*, *L. bulgaricus*, and *Streptococcus thermophilus*. *Scientific Reports*, 15(1), 18371. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-02944-6>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20, 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Zhao, J., Zeng, X., Xi, Y., & Li, J. (2024). Recent advances in the applications of *Lactobacillus helveticus* in the fermentation of plant-based beverages: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 147, 104427. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104427>

ОБ АВТОРАХ

Коваль Дарья Дмитриевна, младший научный сотрудник лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Федерального государственного автономного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (115093, Российская Федерация, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, 7), ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-1491-7423>, SPIN-код: 2698-1652, d_koval@vnimi.org

Ратайчук Виктор Александрович, аспирант лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Федерального государственного автономного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (115093, Российская Федерация, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, 7), ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0153-8756>, SPIN-код: 4255-6098, vrataychuk@gmail.com

Хан Алексей Владимирович, кандидат технических наук, младший научный сотрудник лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Федерального государственного автономного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (115093, Российская Федерация, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, 7), ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-6106-6088>, SPIN-код: 1235-9645, a_khan@vnimi.org

Лазарева Екатерина Германовна, кандидат технических наук, научный сотрудник лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Федерального государственного автономного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (115093, Российская Федерация, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, 7), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8069-9661>, Scopus ID: 57212864480, Researcher ID: AAG-3173-2020, SPIN-код: 4159-8123, e_lazareva@vnimi.org

Фоменко Олег Юрьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Федерального государственного автономного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (115093, Российская Федерация, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, 7), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7852-3790>, Scopus ID: 21933831600, Researcher ID: G-4792-2015, SPIN-код: 6833-5707, o_fomenko@vnimi.org

ABOUT THE AUTHORS

Koval Daria Dmitrievna, Junior Researcher of the Laboratory of Applied Microbiology and Microbial Genomics, All-Russian Dairy Research Institute (115093, Russian Federation, Moscow, Lyusinovskaya Street, 35, 7), ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-1491-7423>, SPIN-code: 2698-1652, d_koval@vnimi.org

Rataichuk Viktor Aleksandrovich, Postgraduate Student of the Laboratory of Applied Microbiology and Microbial Genomics, All-Russian Dairy Research Institute (115093, Russian Federation, Moscow, Lyusinovskaya Street, 35, 7), ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0153-8756>, SPIN-code: 4255-6098, vrataychuk@gmail.com

Khan Alexey Vladimirovich, Cand. Sci. (Eng.), Junior Researcher of the Laboratory of Applied Microbiology and Microbial Genomics, All-Russian Dairy Research Institute (115093, Russian Federation, Moscow, Lyusinovskaya Street, 35, 7), ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-6106-6088>, SPIN-code: 1235-9645, a_khan@vnimi.org

Lazareva Ekaterina Germanovna, Cand. Sci. (Eng.), Researcher of the Laboratory of Applied Microbiology and Microbial Genomics, All-Russian Dairy Research Institute (115093, Russian Federation, Moscow, Lyusinovskaya Street, 35, 7), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8069-9661>, Scopus ID: 57212864480, Researcher ID: AAG-3173-2020, SPIN-code: 4159-8123, e_lazareva@vnimi.org

Fomenko Oleg Yurievich, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Applied Microbiology and Microbial Genomics, All-Russian Dairy Research Institute (115093, Russian Federation, Moscow, Lyusinovskaya Street, 35, 7), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7852-3790>, Scopus ID: 21933831600, Researcher ID: G-4792-2015, SPIN-code: 6833-5707, o_fomenko@vnimi.org